

МЕДИЦИНСКИ ФАКУЛТЕТ ВМА
УНИВЕРЗИТЕТ ОДБРАНЕ
МИНИСТАРСТВО ОДБРАНЕ СРБИЈЕ

Потпуковник асистент др Горан Рондовић

**ПРОЦЕНА ФУНКЦИЈЕ НЕУТРОФИЛА И
МОНОЦИТА У СИСТЕМСКОЈ ЦИРКУЛАЦИЈИ
КРИТИЧНО ОБОЛЕЛИХ ПАЦИЈЕНТА СА
СЕКУНДАРНОМ СЕПСОМ**

Докторска дисертација

Београд

Садржај:

1. УВОД.....	7
1.1. Дефиниција сепсе	7
1.2. Имунопатогенеза сепсе.....	10
1.3. Параметри инфламаторног одговора као биомаркери	20
1.3.1. Пресепсин	21
1.3.2. Прокалцитонин.....	22
1.3.3. Ц-реактивни протеин (ЦРП).....	22
1.3.4. Средњи волумен тромбоцита (<i>MeanPlateletVolume</i>) МПВ и однос МПВ са бројем тромбоцита – МПВ/ТР	23
1.3.5. Међусобни односи неутрофила, моноцита, тромбоцита и лимфоцита код критично оболелих са сепсом.....	24
1.4. Лактати код критично оболелих са сепсом	24
1.5. Активациони статус неутрофила у целуларном имуно-инфламаторном одговору код критично оболелих са сепсом	28
1.6. Активациони статус моноцита у целуларном имуно-инфламаторном одговору код критично оболелих са сепсом	39
1.7. Експресија ЦД64 (<i>Cluster of Differentiation 64</i>) на моноцитима и неутрофилима.....	43
1.8. Експресија ЦД14 (<i>Cluster of Differentiation 14</i>) на моноцитима и неутрофилима	44
1.9. Експресија ПД-Л1 (<i>Programmed cell death-ligand 1-PD-L1</i> ; <i>Cluster of Differentiation 274</i>) на моноцитима и неутрофилима.....	48
1.10. Експресија ХЛА-ДР (<i>Human Leukocyte Antigen – D Related isotype</i>) на моноцитима – мХЛА-ДР	51

1.11. Индекс дивергенције неутрофила - ИДН код критично оболелих са сепсом	54
1.12. Имунопатогенеза КОВИД-19	55
2. ХИПОТЕЗА И ЦИЉЕВИ ИСТРАЖИВАЊА	70
2.1. Хипотеза	71
2.2. Циљеви истраживања	71
3. ИСПИТАНИЦИ И МЕТОДЕ	71
3.1. Пацијенти и здраве контролне особе	71
3.2. Узорковање и анализе	73
3.3. Имунофенотипска испитивања	73
3.4. Статистичка анализа	74
4. РЕЗУЛТАТИ	74
4.1. Демографске карактеристике пацијената	74
4.2. Параметри инфламаторног одговора	78
4.2.1. Пресепсин	78
4.2.2. Прокалцитонин	80
4.2.3. Ц-реактивни протеин (ЦРП)	81
4.2.4. Средњи волумен тромбоцита (<i>MeanPlateletVolume</i>) – МПВ	83
4.2.5. Лактати	84
4.2.6. Параметри инфламаторног одговора у три временска интервала унутар група према исходу (преживели, умрли)	86
4.2.7. Корелација између параметара инфламаторног одговора у три временска интервала унутар група према исходу (преживели, умрли)	90
4.2.8. Параметри инфламаторног одговора као предиктори леталног исхода	93

4.2.8.1. Комбинација пресепсина, МПВ и лактата у композитни биоскор	94
4.2.8.2. Независни прогностички значај параметара инфламаторног одговора у предикцији леталног исхода.....	96
4.2.8.3. Време преживљавања у односу на терциле концентрације пресепсина првог дана.....	97
4.3. Међусобни односи неутрофила, моноцита, тромбоцита и лимфоцита.....	98
4.3.1. Повезаност МПВ/Тр, НЛ, МЛ и ТЛ са основним обољењем које је довело до секундарне сепсе	99
4.3.2. Повезаност МПВ/Тр, НЛ, МЛ и ТЛ са бактеријским проузроковачем у хемокултури.....	101
4.3.3. Повезаност МПВ/Тр, НЛ, МЛ и ТЛ са исходом (преживели, умрли).....	103
4.4. Активациони статус неутрофила	105
4.5. Активациони статус моноцита.....	106
4.6. Повезаност параметара активационог статуса неутрофила и моноцита са основним обољењем које је довело до секундарне сепсе	107
4.6.1. Повезаност нЦД64, нЦД14, нПД-Л1 и ИДН са основним обољењем које је довело до секундарне сепсе	107
4.6.2. Повезаност мХЛА-ДР, мЦД14, мПД-Л1 и мЦД64 са основним обољењем које је довело до секундарне сепсе.....	111
4.7. Повезаност параметара активационог статуса неутрофила и моноцита са исходом (преживели, умрли)	118
4.7.1. Повезаност нЦД64, нЦД14, нПД-Л1 и ИДН са исходом (преживели, умрли)	118
4.7.2. Повезаност мХЛА-ДР, мЦД14, мПД-Л1 и мЦД64 са исходом (преживели, умрли)	120
4.8. Параметри активационог статуса неутрофила и моноцита у два временска интервала унутар група према исходу (преживели, умрли).....	124

4.8.1. Повезаност нЦД64, нЦД14, нПД-Л1 и ИДН у два временска интервала према исходу (преживели, умрли)	124
4.8.2. Повезаност мХЛА-ДР, мЦД14, мПД-Л1 и мЦД64 у два временска интервала унутар група према исходу (преживели, умрли)..	128
4.9. Корелација између параметара активационог статуса неутрофила и моноцита ...	132
4.9.1. Корелација између нЦД64, нЦД14, нПД-Л1 и ИДН у два временска интервала	132
4.9.2. Корелација између мХЛА-ДР, мЦД14, мПД-Л1 и мЦД64 у два временска интервала	133
4.9.3. Корелација између параметара активационог статуса неутрофила и моноцита унутар група према исходу (преживели, умрли)	134
4.9.4. Корелација између пресепсина (Солубилни ЦД14 – сЦД14), нЦД14 и мЦД14 у два временска интервала	135
4.10. Параметри активационог статуса неутрофила и моноцита као предиктори леталног исхода	139
4.11. Комбинација ИДН, мХЛА-ДР % и мПД-Л1 W/m ² у композитни биоскор	140
4.12. Независни прогностички значај параметара активационог статуса неутрофила и моноцита у предикцији леталног исхода	142
4.13. Време преживљавања у односу на вредности ИДН, мХЛА-ДР% и мПД-Л1 W/m ² првог дана	143
4.14. Повезаност параметара активационог статуса неутрофила и моноцита са врстом бактеријског проузроковача	146
4.15. Контролна група здравих добровољаца	146
4.15.1. Међусобни односи неутрофила, моноцита, тромбоцита и лимфоцита у контролној групи здравих добровољаца.....	147
4.15.2. Параметри активационог статуса неутрофила у контролној групи здравих добровољаца.....	147

4.15.3. Параметри активационог статуса моноцита у контролној групи здравих добровољаца.....	148
5.ДИСКУСИЈА.....	149
5.1. Параметри инфламаторног одговора (Пресепсин, Прокалцитонин, Ц-Реактивни протеин, МПВ) и вредности лактата као предиктори исхода.....	150
5.2. Повезаност међусобних односа неутрофила, моноцита, тромбоцита и лимфоцита (МПВ/ТР, НЛ, МЛ, ТЛ) са врстом бактеријског проузроковача, основним обољењем које је довело до секундарне сепсе и исходом.....	158
5.3. Повезаност параметара активационог статуса неутрофила и моноцита са врстом бактеријског проузроковача, основним обољењем које је довело до секундарне сепсе и исходом.....	163
6.ЗАКЉУЧЦИ.....	179
7.ЛИТЕРАТУРА.....	180

1. УВОД

Сепса је у фокусу интензивне медицине јер представља важан клинички и истраживачки проблем у лечењу критично оболелих у јединицама интензивне медицине (ЈИМ) широм света. Још пре две деценије сепса је била водећи узрок смрти критично оболелих. Тада је било евидентно да се она јавља код преко 750 000 људи годишње у Сједињеним Америчким Државама (САД), а да од ове популације оболелих више од 210 000 умре (1). Упркос савременим достигнућима у интензивној медицини, овај тренд се наставио до данашњег дана и представља велико оптерећење и за најразвијеније здравствене системе (2-7). Епидемиолошка истраживања сепсе су показала да се годишње, широм света, евидентира 30 милиона случајева сепсе и 6 милиона смртних случајева повезаних са сепсом (8).

1.1. ДЕФИНИЦИЈА СЕПСЕ

Сепса је једна од првих описаних болести. Појам сепсе помиње се још у античким списима из периода 400-те године пре нове ере. Хипократ тада сепсом дефинише процес труљења меса и ослобађања гаса у мочварама али и процес у коме инфициране ране постају пурулентне (9). Аулус Корнелиус Целзус и Гален су описали карактеристике инфламације: црвенило, оток, грозница, бол и губитак функције. Тек више од два миленијума касније поставља се прва дефиниција сепсе у савременој медицини којом се јасно наглашава да није патоген, сам по себи, већ одговор организма кључни елемент развоја симптома. Прва консензус конференција о дефиницији и стандардизовању терминологије сепсе одржана је тек 1991. године и тада је уведен појам синдрома системског инфламаторног одговора - СИРС (*systemic inflammatory response syndrome - SIRS*) (10). Већ тада је постало јасно да СИРС постоји и у другим стањима која нису у вези са инфекцијом (нпр. опекотине, панкреатитис, траума и слично). Дефинисано је да сепса представља СИРС индукован инфекцијом. Такође је наведено да тај системски инфламаторни одговор мора бити праћен са два или више клиничких знакова како би се поставила дијагноза. Знаци су: телесна температура $> 38^{\circ}\text{C}$ или $< 36^{\circ}\text{C}$; срчана фреквенца > 90 откуцаја/мин; респираторна фреквенца > 20 удаха/мин или да су вредности парцијалног притиска угљен-диоксида у артеријској крви (PaCO_2) < 32 mmHg (4.3 kPa); број леукоцита > 12000 у mm^3 или < 4000 у mm^3 или $> 10\%$ незрелих форми леукоцита (10).

Због тога што се СИРС често компликује дисфункцијом органа, тада је дефинисан и синдром мултипле дисфункције органа (*multiple organ dysfunction syndrome - MODS*). Код

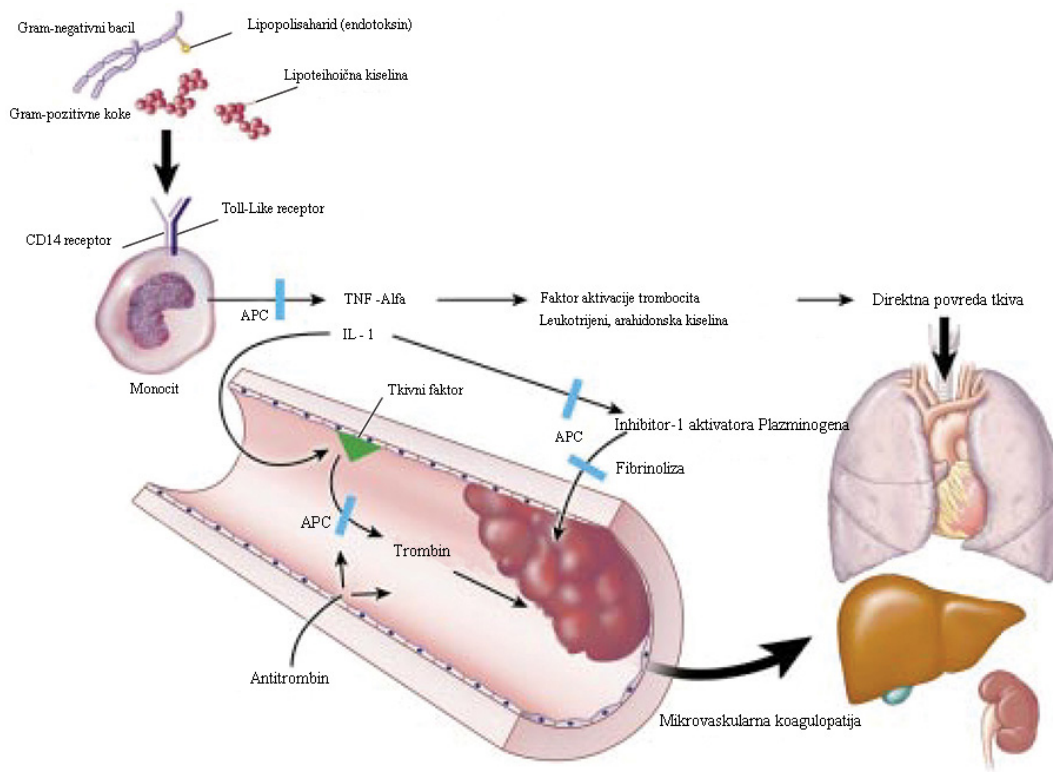
критично оболелих, по дефиницији, постоји измењена функција органа тако да хомеостаза не може да се одржи без мера у ЈИМ, као што су механичка вентилација, вазоактивна потпора кардиоваскуларном систему, различити облици хемодијализе и хемофилтрације. Критично оболели најчешће имају дисфункцију најмање два органска система. Сепса компликована органском дисфункцијом је означена као тешка сепса; она може да прогредира у септички шок који се дефинише као сепсом индукована хипоперфузија и хипотензија која перзистира упркос адекватној надокнади волумена. Хипоперфузија органа може се манифестовати на различите начине, на пример као лактатна ацидоза, олигурија или промена менталног статуса. Дакле, ако се тешка сепса одржава упркос терапији надокнадом циркулаторног волумена и не дође до реверзије хипотензије и хипоперфузије органа, то стање је означено као септични шок (10).

Упркос постојању бројних неслагања и недоследности у првој дефиницији сепсе, следећа консензус конференција која је одржана 10 година касније, није довела до битније трансформације постојеће дефиниције (11). Криеријуми за дијагнозу сепсе су проширени и уведен је скор за тешку сепсу (*Sequential [Sepsis-related] Organ Failure Assessment Score – SOFA*). Овим скором додељују се бодови на основу патофизиолошких промена у шест органских система (респираторни, коагулациони, хепатобилијарни, кардиоваскуларни, ренални и централни нервни систем). Повећање за 2 бода у укупном скору указује на дисфункцију органа. Уколико је та дисфункција повезана са инфекцијом може се поставити дијагноза сепсе. Базична вредност скорa је 0 код пацијената код којих су сви скорирани параметри у физиолошким границама. Повећање СОФА скорa за ≥ 2 бода повезано је са ризиком од леталног исхода од 10%. Пацијенти са претходно постојећом органском дисфункцијом могу имати погоршање стања, чиме се акценат ставља на потребу за континуираним мониторингом виталних функција и за брзом терапијском интервенцијом.

Паралелно са радом на дефиницији сепсе, од 2002 године покренута је и кампања за преживљавање сепсе (*Surviving Sepsis Campaign - SSC*). Водичи за збрињавање тешке сепсе и септичког шока су објављени 2004. године први пут (12), а потом ревидирани и објављивани сваке четврте године. Према водичима *Surviving Sepsis Campaign* из 2008. и 2012. године, дефиниција сепсе је слична. То стање се дефинише као инфекција са различитим елементима системске манифестације, док се тешка сепса дефинише као сепса са органском дисфункцијом или ткивном хипоперфузијом. Септички шок, као посебан ентитет, је дефинисан као сепсом индукована хипотензија рефракторна на адекватну надокнаду циркулаторног волумена. Сепсом индукована хипотензија је дефинисана као систолни артеријски притисак < 90 mmHg или средњи

артеријски притисак < 70 mmHg или смањење систолног артеријског притиска за > 40 mmHg или 2 стандардне девијације испод нормале дефинисане за старосну групу и у одсуству других узрока хипотензије. Сепсом индукована ткивна хипоперфузија је дефинисана порастом вредности серумских лактата или манифестном олигуријом. Тешка сепса (акутна органска дисфункција као последица инфекције) и септички шок (тешка сепса праћена хипотензијом рефракторном на надокнаду циркулаторног волумена), и тада су истакнути као један од главних здравствених проблема широм света, са великом смртношћу и трендом повећања инциденце (13, 14). Заједно са новом дефиницијом сепсе (*Sepsis-3*), 2016. године објављене су и последње смернице за терапију (15).

Нова дефиниција сепсе, Сепсис-3, приказује сепсу као животно угрожавајућу дисфункцију органа узроковану поремећеном регулацијом одговора домаћина на инфекцију (16). Тиме је стављен акценат на имуноинфламаторну каскаду сепсе, приказану на слици 1.1.1., као кључни моменат.



Слика 1.1.1. Имуноинфламаторна каскада сепсе; ТНФ – фактор некрозе тумора, ИЛ – интерлеукин, АПЦ – активирани протеин Ц [модификовано и прилагођено према LaRosa SP. (17)]

Како је сада термин дисфункција органа већ укључен у дефиницију сепсе, тиме је термин тешка сепса који је раније дефинисао ово стање постао сувишан. У последњој дефиницији сепсе наглашено је да дисфункција органа може постојати и пре настанка инфекције, као и да непрепозната инфекција може бити узрок новонастале дисфункције органа (18). Термин септички шок је задржан у употреби, представља перзистентну хипотензију код које је, упркос адекватној надокнади циркулаторног волумена, потребна примена вазоактивних лекова како би се средњи артеријски притисак одржавао $> 65 \text{ mmHg}$; други битан дијагностички критеријум је повећање вредности серумских лактата на $> 2 \text{ mmol/l}$. Септички шок представља стање циркулаторног, метаболичког и целуларног поремећаја узрокованог сепсом у коме се морталитет значајно повећава (18). Дефинисан је и нови алат за брзу оријентацију и рано препознавање сепсе. Означен је као “брзи” qСОФА (*quick* СОФА). Састоји се само од три критеријума који се анализирају: измена стања свести, респираторна фреквенца $>$ од 22 удаха/минути, систолни притисак $< 100 \text{ mmHg}$. Ако су испуњена два од поменута три критеријума постоји велика вероватноћа да почиње дисфункција органа, па пацијент треба да буде под сталним надзором.

Да је сепса, компликована септичким шоком и праћена мултиплом органском дисфункцијом, водећи узрок леталног исхода у ЈИМ са морталитетом који прелази 50% одавно је познато. Најновија анализа глобалне, регионалне и националне инциденце и морталитета од сепсе наглашава да је то веома велики проблем јавног здравља. У 2017. години забележено је 49 милиона случајева сепсе као и 11 милиона смртних случајева повезаних са сепсом, што представља 20% од свих смртних исхода широм света (19). Дакле, на глобалном нивоу, сваког минута 20 пацијената умре од сепсе (20).

1.2. ИМУНОПАТОГЕНЕЗА СЕПСЕ

Сепса је тешка компликација бактеријских, гљивичних или вирусних инфекција; дефинише се као дисфункција органа која угрожава живот а проузрокована је нерегулисаним одговором организма на инфекцију. Сепса је врло хетероген синдром, у оквиру ког патоген у организму домаћина активира имунски одговор. Тада настаје имунска дисонанца јер се, у почетку протективни, имуноинфламаторни одговор не враћа у стање хомеостазе; његова патолошка прогресија кулминира истовременом ексцесивном инфламацијом и имunosупресијом (21, 22).

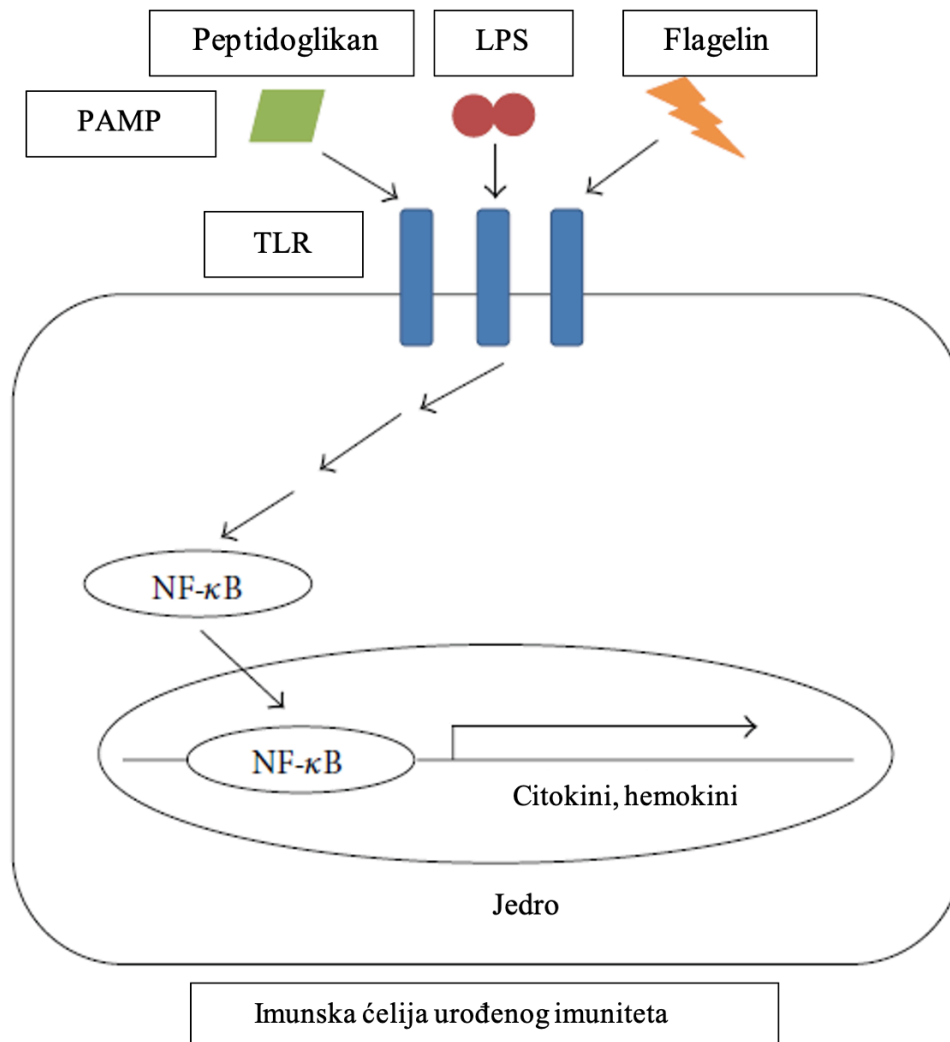
Имунски одговор се састоји од урођене имуности, која представља рани неспецифични одговор или прву линију одбране; и стечене имуности означене као патоген-специфични имунски одговор или касни имунски одговор.

Имунски систем чини комплексна мрежа међусобно повезаних ћелија, рецептора, створених ензима и протеина као и структурних баријера са елементима хемијске одбране (на пример епителна баријера са антимикуробним протеинима). Одбрамбена улога имунског система се огледа кроз обављање неколико важних, међусобно повезаних задатака. То су: осматрање и надзор над сигнаlima опасности као и благовремено препознавање страних структура; регаовање ефекторних ћелија на препознате сигнале опасности, регулација хомеостазе и стварање имунске меморије. Иако функционално различити, и урођени и стечени имунски одговор имају синергистично деловање са циљем одбране организма (23). Урођена имуност има способност да, за разлику од стечене имуности, одмах одговори на присуство патогена па има веома значајну улогу у иницијацији сепсе. Задатак урођене имуности је осматрање и препознавање патогена али и разликовање патогена од сопствених ћелија. Урођени имунски систем чине ћелије мијелоидне лозе. Активирана прва линија одбране, у виду урођене имуности, резултира фагоцитозом патогена од стране гранулоцита, моноцита/макрофага и дендритичних ћелија али и активирањем система комплемента. Систем комплемента је задужен за непосредни урођени имунски одговор (настаје у прва четири сата), када се инфекција препознаје путем преформираних неспецифичних и широко специфичних ефектора. Рани индуковани урођени имунски одговор (након прва четири сата) је примарно целуларни, ослања се на рецепторе за препознавање молекулских шаблона (*pattern recognition receptors - PRRs*). Ћелије урођеног имунског одговора имају способност да антиген обраде и да га потом презентују, па означавају се као антиген- презентујуће ћелије (*antigen-presenting cells - APC*). У овом смислу, нарочито су активне дендритичне ћелије; након обраде и презентовања антигена представљају везу урођеног са стеченим имунским одговором. Стечени имунски систем је састављен од два главна типа ћелија: Т и Б лимфоцита. Оба типа ћелија имају способност експресије специфичних рецептора за детекцију антигена. Рецептори експримирани на површини Б лимфоцита се означавају као Б ћелијски рецептори (*BCRs – B cell receptors*), док су на површини Т лимфоцита експримирани Т-ћелијски рецептори (*TCRs - T cell receptors*).

Без обзира на порекло стимулуса (инфективни или не-инфективни) инфламаторни одговор домаћина је сличан. Први корак у имунопатогенези сепсе је препознавање патогена који врше инвазију нормално стерилног ткива. Рецептори за препознавање молекулских шаблона

микроорганизма (*PRRs*) се доминантно налазе на површини ћелија урођене имуности као што су макрофаги, епителне, ендотелне и друге ћелије. Компоненте или делови микроорганизама које препознају ПРР рецептори означени су као молекулски шаблони патогена (*Pathogen-associated molecular pattern - PAMP*). Различити молекули микроорганизама могу да буду препознати: липополисахарид, пептидогликан, флагелин или РНК. Рецептори на површинама ћелија урођене имуности не препознају само егзогене молекулске шаблоне већ и молекуле ослобођене из оштећеног ткива који предствљају аларм за имунски одбрамбени систем. Ти молекулски шаблони оштећеног ткива (*damage-associated molecular pattern - DAMP*) означавају се и као алармини. Алармини могу да буду специфични протеини који се синтетишу када су ћелије изложене повишеној температури (*heat shock proteins - HSPs*), *S100* протеини, катхелицидини, урична киселина, фибриноген, слободна ћелијска и митохондријална ДНК, хистони и протеин високе мобилности (*high mobility group box- HMGB-1*) (24). Ткиво може бити оштећено на различите начине, доминантно инфекцијом или траумом или њиховим удруженим дејством. До сада је описано пет класа ПРР који се налазе и на површини ћелије и интрацелуларно: (1) *Toll-like receptors (TLRs)*, (2) *nucleotide oligomerization domain - like receptors (NODs или NLRs)*, (3) *retinoic acid-inducible gene (RIG -1) like receptors*, (4) *C-type lectin receptors* и (5) *absence-in-melanoma 2 (AIM-2)-like receptors* (25).

Почетна карика имуноинфламаторне каскаде у имунопатогенези сепсе је везивање микроорганизама за површинске (мембранске) ТЛР на имунокомпетентним ћелијама (26). Ти рецептори су хомолози протеина *Toll* винске мушице (*Drosophila melanogaster*). Лиганди за ТЛР-2 рецепторе су антигени ћелијског зида Грам-позитивних бактерија (пептидогликани, липотеихоична киселина) док је кључни лиганд за ТЛР-4 рецепторе липополисахарид (ЛПС) тј. ендотоксин Грам-негативних бактерија. Активирање ових рецептора иницира интрацелуларну имуноинфламаторну каскаду која резултује ослобађањем медијатора инфламације. Интрацелуларни механизми за трансдукцију ПРР сигнала су комплексни и, између осталог, обухватају фамилију индуцибилних транскрипционих фактора познатих као нуклеусни фактор *κB* (*Nuclear factor - [NF]-κB*). НФ-κБ регулише експресију читавог низа гена укључених у различите имуноинфламаторне одговоре на инсулт (27). Након сопствене активације, НФ-κБ иницира транскрипцију различитих гена у једру имунокомпетентних ћелија и тако повећава синтезу и ослобађање инфламаторних цитокина, хемокина и адхезионих молекула; поред тога регулише ћелијску пролиферацију, апоптозу, морфогенезу и диференцијацију. На слици 1. приказана је активација ТЛР у сепси.



Слика 1.2.1. Активација ТЛР у сепси [модификовано и прилагођено према Schulte et al. (28)]

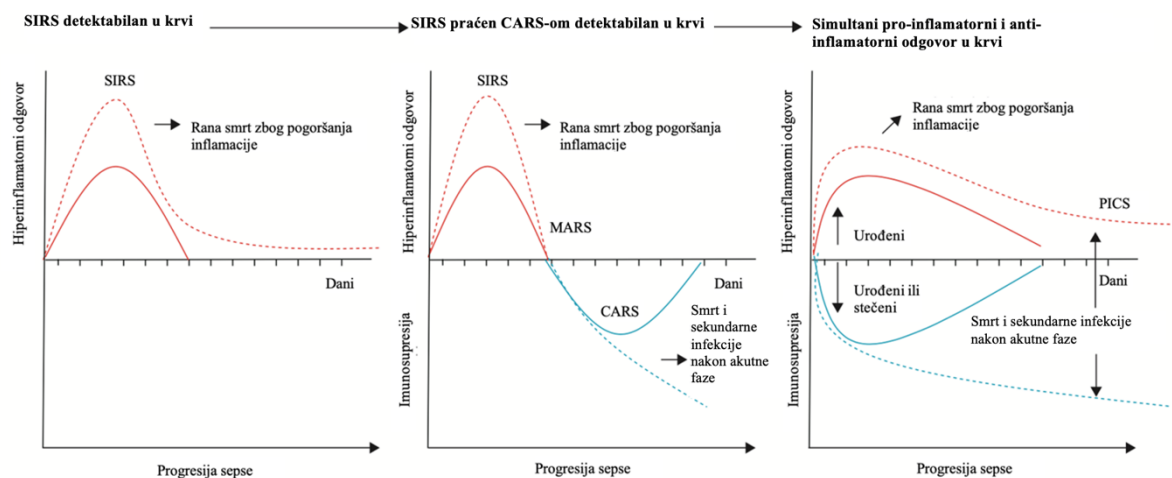
Резидентни макрофаги и полиморфонуклеарне ћелије присутне на месту продора инфективног патогена су одговорни за иницирање примарног одговора домаћина и то фагоцитозом и следственим активирањем и регрутовањем полиморфонуклеарних гранулоцита и моноцита. Ова активација примарних ћелија урођене имуности има за исход ослобађање цитокина и других медијатора инфламације већ претходно описаним механизмом. Цитокини су потентни нискомолекуларни протеини које продукују различите имунокомпетентне ћелије и главни су позитивни и негативни регулатори имуноинфламаторног одговора; кључни су за дужину његовог трајања и амплитуду (21). Такође, цитокини су плеиотропни медијатори инфламације, што значи да имају капацитет да активирају различите типове ћелија и да индукују

различите одговоре. Биоактивности разлитичих цитокина се значајно преклапају. Зависно од њихове активности *in vivo*, у односу на време и локацију, цитокини су подељени у три класе. Проинфламаторни цитокини су означени као Tх1 (*T helper 1*) цитокини и у овој класи су, између осталих, фактор некрозе тумора алфа (*tumor necrosis factor [TNF]-alfa*), интерлеукини (ИЛ)-1, ИЛ-8, ИЛ-12 и ХМГБ1. Насупрот њима налазе се анти-инфламаторни цитокини означени као Tх2 и у овој класи су, на пример, ИЛ-4, ИЛ-10 и антагониста рецептора за ИЛ-1 – ИЛ-1ра, док неки интерлеукини имају изражену и про- и анти-инфламаторну активност, пример је ИЛ-6, у зависности од локалног миљеа у нидусу инфекције. У трећој класи су цитокини, означени као Tх17, који се разликују од обе претходне групе. Цитокини свој ефекат остварују везивањем за рецепторе на циљним ћелијама. Својим везивањем покрећу сигналну каскаду која резултира индукцијом или инхибицијом цитокинима регулисане активности циљних имунокомпетентних ћелија, што доводи до модулације ћелијске имунске активности (29).

Дакле, један од кључних догађаја у бактеријској сепси је активација имунских ћелија, или целом бактеријом или њеним продуктима, што доводи до локалне и системске инфламације. Имунокомпетентне ћелије могу бити активирани живим или мртвим бактеријама (убијеним деловањем комплемента, дефенсина, антимикробних пептида или антибиотика). Инфламаторни одговор није униформан: његове карактеристике се разликују како између различитих органа, тако и између органа и периферне крви. Ова компартментализација имунског одговора је значајан концепт, са проминентном разликом између крвног компартмента и ткивног компартмента. Анти-инфламаторни медијатори имају тенденцију доминације у циркулацији, са циљем избегавања иницијације нових инфламаторних фокуса. Али, њихово присуство у ткивима није увек довољно да би се избалансирао потенцијално опасан проинфламаторни одговор у различитим ткивним компартментима. У сепси постоји конкомитантно детектабилно присуство и про-инфламаторних и анти-инфламаторних медијатора. Значи, активирани имунски одговор може бити хиперинфламаторан, означава се и као проинфламаторна цитокинска олуја, и може довести до мултипле органске дисфункције и смрти. Упоредо са њим развија се и анти-инфламаторни одговор који може довести до имунске парализе (30).

Овако настали инфламаторни одговор има за циљ елиминацију патогена и заустављање инфекције. Медијатори инфламације контролишу миграцију имунокомпетентних ћелија ка извору инфекције, чиме доприносе локализацији инфекције и спречавању њеног системског ширења. Али, присуство цитокина у циркулацији може, такође, деактивирати миграцију леукоцита унутар ткива; то се дешава због локалних градијената хемокина.

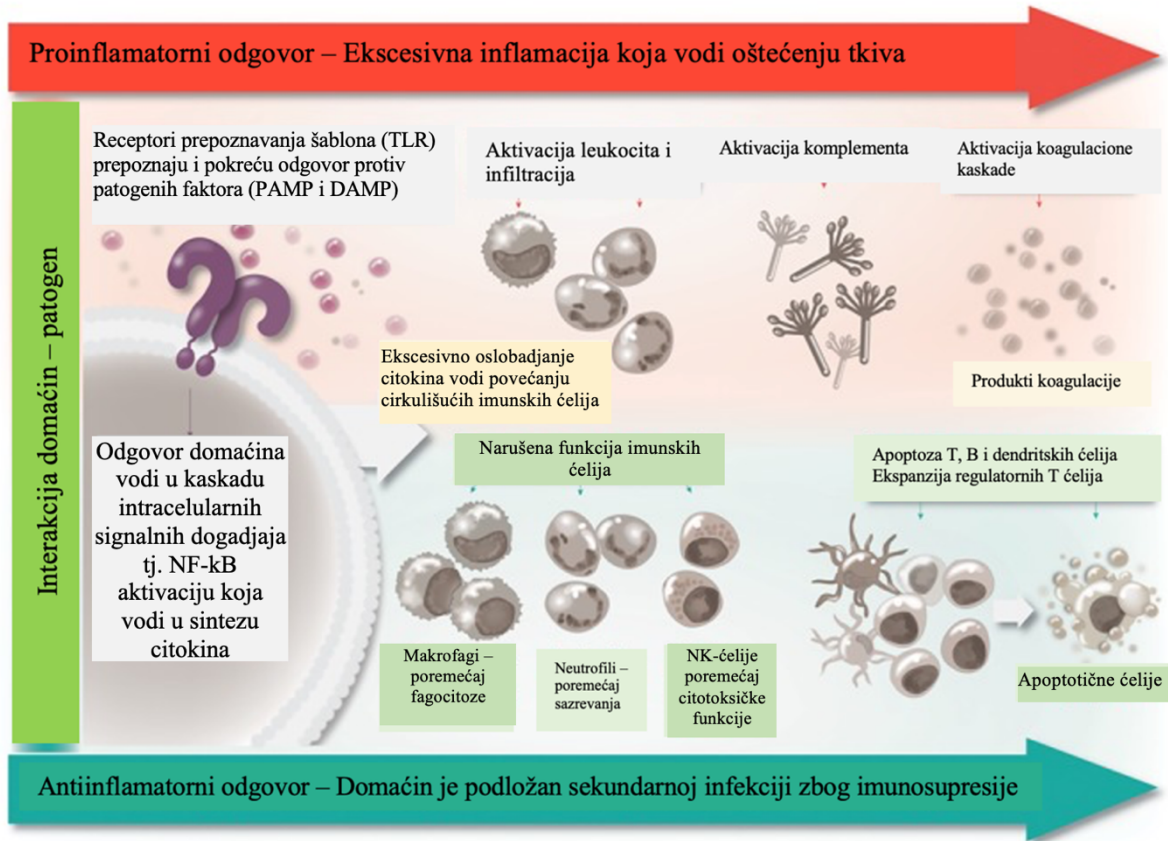
Временски след и динамика имунских промена у сепси је предмет константног проучавања. Некада се сматрало да је иницијална хиперинфламаторна фаза сепсе праћена синдромом компензаторног анти-инфламаторног одговора (КАРС). Данас се зна да су СИРС и КАРС конкомитантни процеси па се, током прогресије сепсе, у плазми пацијената најчешће детектује мешовити хиперинфламаторни и имunosупресивни миље који, последично, модулира циркулишуће леукоците на различите начине (31). Разумевање орган-специфичног имунског одговора у сепси би помогло евентуалној локалној контроли инфективног фокуса, јер уколико то није могуће наставља се прогресија сепсе и може доћи до синдрома перзистентне инфламације, имunosупресије и катаболизма – ПИКС-а (*persistent inflammation, immunosuppression and catabolism syndrome – PICS*) Могућ је и синдром мешовитог антагонистичког одговора (МАРС). Еволуција модела проинфламаторних и анти-инфламаторних одговора у сепси приказана је на слици 1.2.2.



Слика 1.2.2. Еволуција модела проинфламаторних и анти-инфламаторних одговора у сепси [модификовано и прилагођено према Rubio et al. (31)]

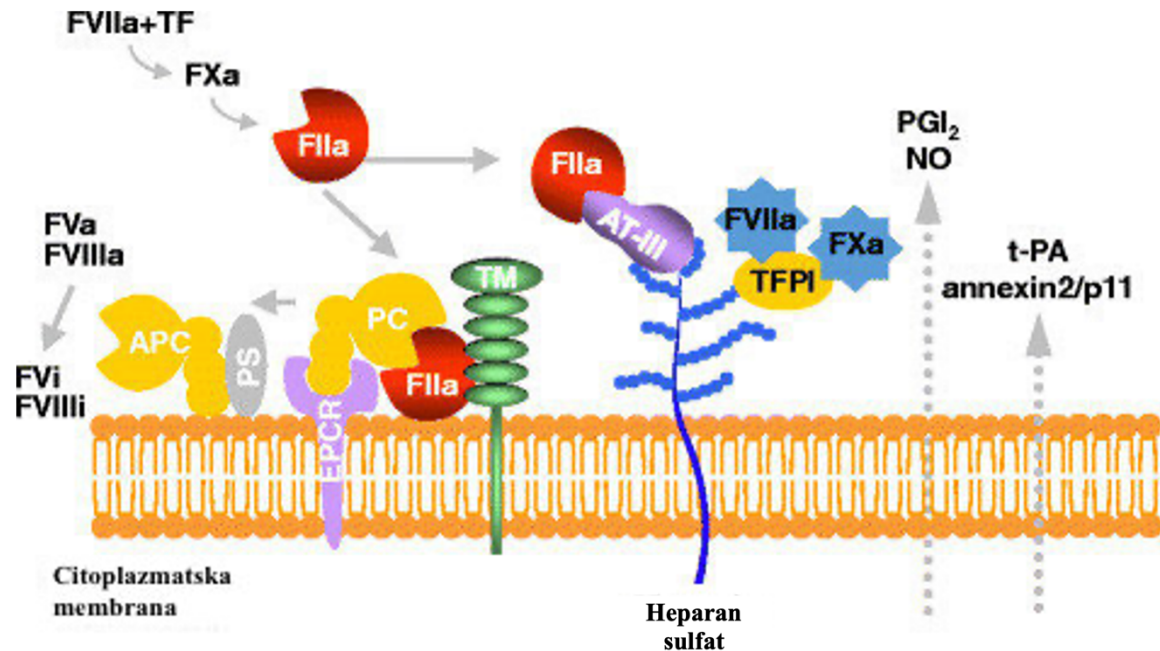
Дакле, централна улога имунског система у сепси је чињеница, оно о чему су сазнања скоро рудиментарна је како сепса утиче на имунитет и обрнуто.

Комплексна интеракција између организма домаћина и патогена обухвата, поред имунског одговора, и активацију комплемента и коагулационе каскаде (32). Имуноинфламаторна реакција организма домаћина на ПАМП и ДАМП, као мач са две оштрице, приказана је на слици 1.2.3.



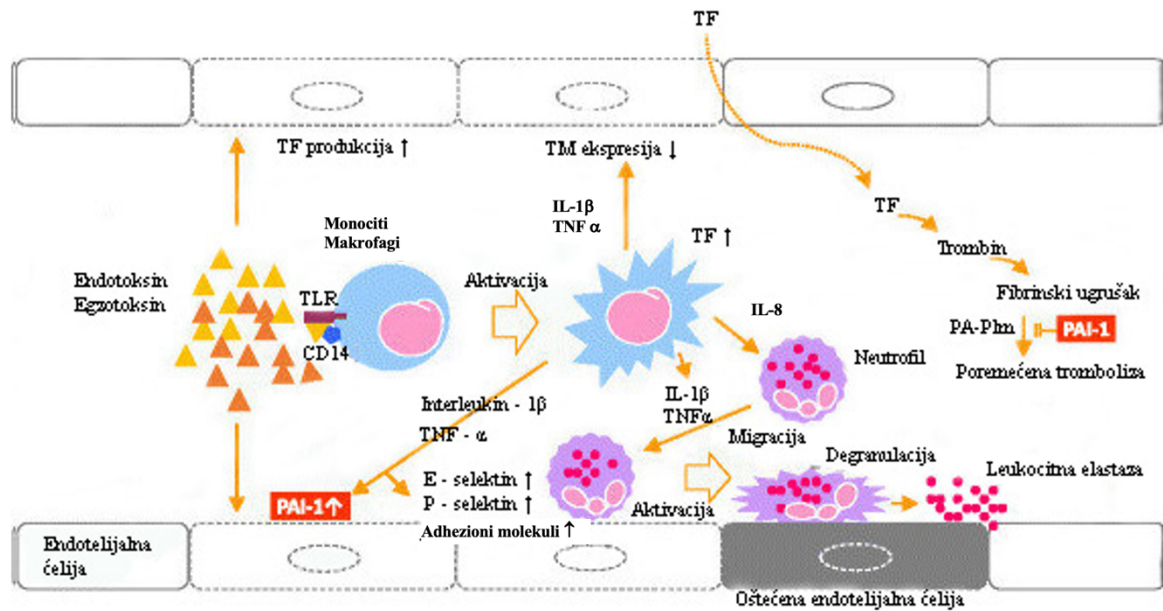
Слика 1.2.3. Интеракција домаћин – патоген [модификовано и прилагођено према Nedeва et al. (32)]

За очување хомеостазе неопходан је интактан и функционалан васкуларни ендотел који, генерално гледано, има антикоагулантна својства. Неки од елемената коагулационе каскаде учествују у нормалном функционисању ендотела (активирани фактор VII – *FVIIa*; инактивирани фактор V – *FVi*; ткивни фактор – *TF*; антитромбин-III – *AT-III*; инхибитор сигналног пута ткивног фактора (tissue factor pathway inhibitor) – *TFPI*; протеин Ц – *PC*; активирани протеин Ц – *APC*; протеин С – *PS*; тромбомодулин – *TM*; ендотелни протеин Ц рецептор – *EPCR*; азот-оксид – *NO*; простагландин И2 – *PGI2*; ткивни активатор плазминогена – *t-PA*). Шематски је физиолошка функција ендотела приказана на слици 1.2.4.



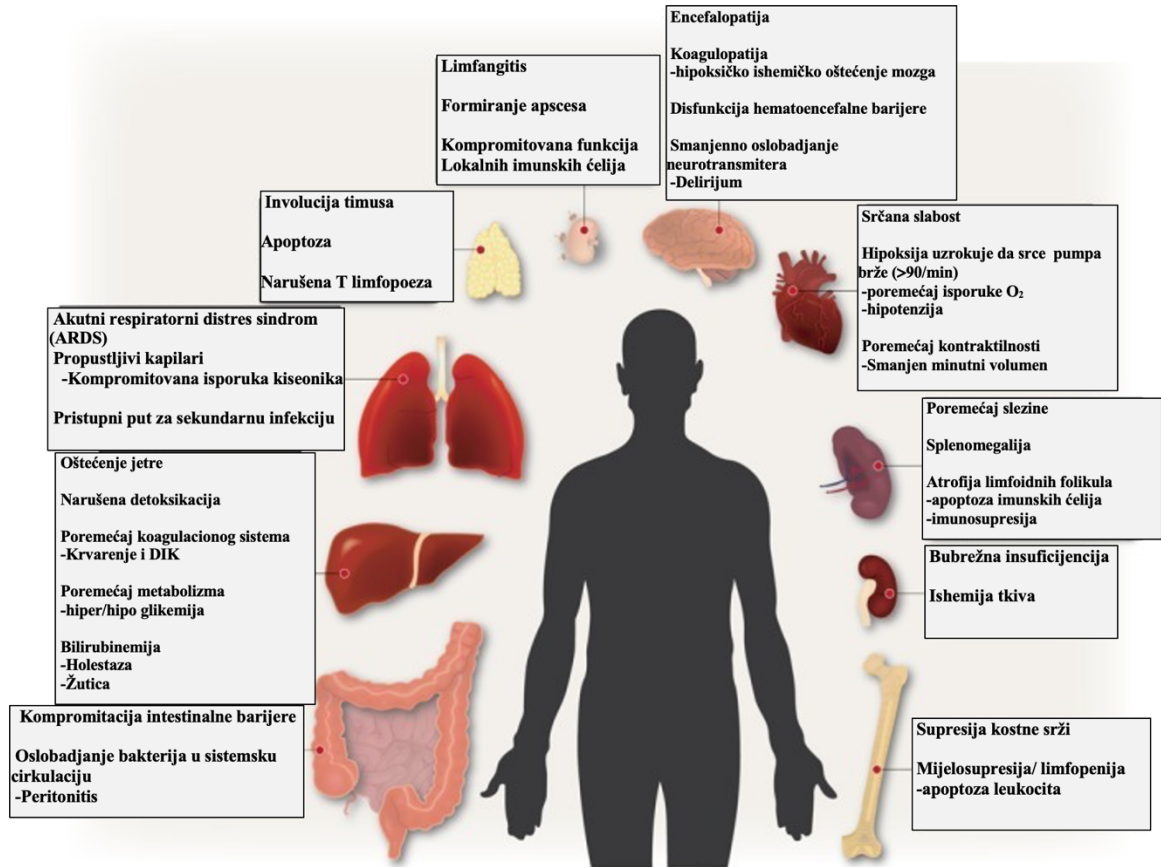
Слика 1.2.4. Физиолошке функције ендотела [модификовано и прилагођено према Madoiwa S. (33)]

Услед имунске дисонанце, путем нерегулисаног ослобађања цитокина, долази до ендотелне дисфункције. Ендотелна дисфункција се карактерише вазодилатацијом и повећаном пермеабилношћу ендотела. Развија се интензивно „цурење“ кроз ендотел, што за последицу има хипотензију, хемоконцентрацију, екстравазацију макромолекула и интерстицијални едем. Дисфункционалан ендотел дозвољава и патогенима и њиховим продуктима даљу инвазију ткива домаћина, што може резултирати синдромом мултипле органске дисфункције (33). Нарушавање механизма коагулације узроковано имуноинфламаторним одговором у сепси, води као дисеминованој интраваскуларној коагулацији (ДИК) која са својим ефектима значајно погоршава клиничко стање болесника са сепсом. Процес, поред наведених елемената коагулационе каскаде, обухвата и систем активатори плазминогена – плазмин (*plasminogen activators-plasmin system*) - *PA-Plm* и инхибитор 1 активатора плазминогена (*plasminogen activator inhibitor-1*) - *PAI-1*. Шематски је дисфункција ендотела у сепси приказана на слици 1.2.5.



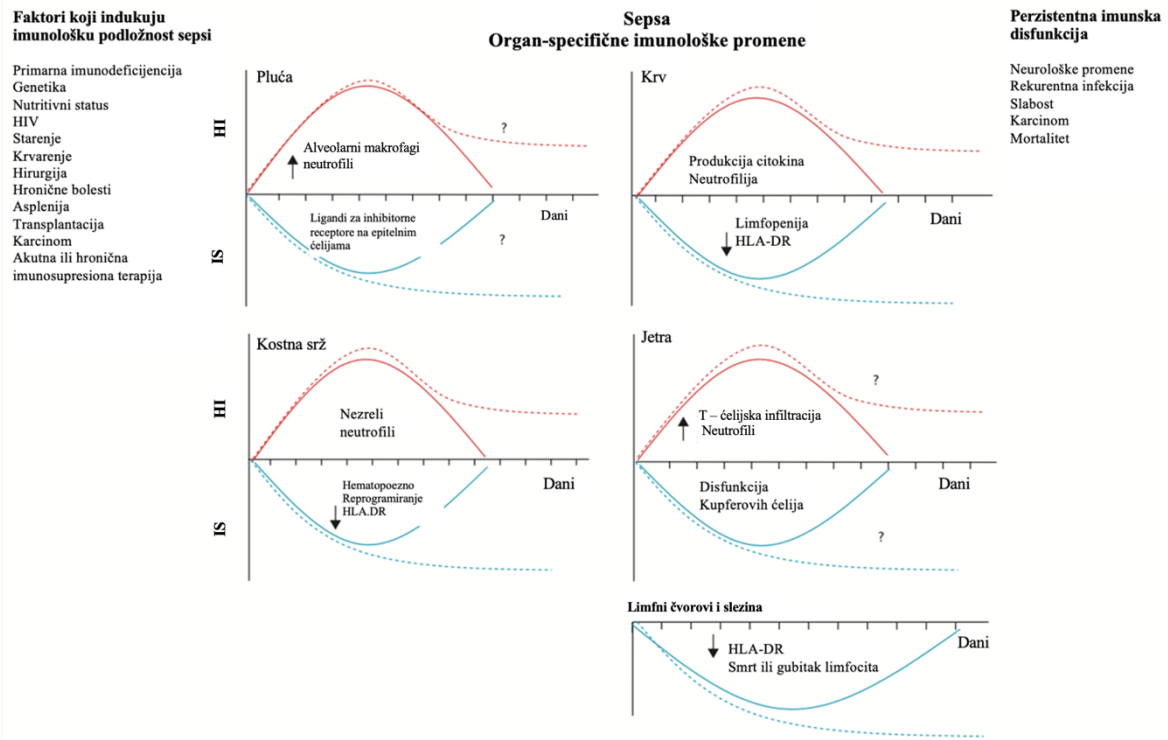
Слика 1.2.5. Ендотелна дисфункција у сепси [модификовано и прилагођено према Madoiwa S. (33)]

Имајући у виду да је имунски одговор у сепси веома компартментализован, поред временског следа (темпорални моменат), најновија истраживања су се фокусирала на орган-специфични имунски одговор (спацијални моменат). Колико је сепса комплексна и хетерогена у различитим органима, са поремећеном коагулацијом, имуносупресијом и инфламацијом, приказано је на слици 1.2.6.



Слика 1.2.6. Синдром мултипле органске дисфункције у сепси [модификовано и прилагођено према Nedeva et al. (32)]

Најновији концептуални оквир имунопатологије сепсе предложила је Европска група за имунологију сепсе (ЕГИС) 2019-те године. Нагласак се ставља на важност фактора који ремете имунски одговор и на орган-специфичне имунске компоненте. ЕГИС-ов концептуални оквир имунопатологије сепсе приказан је на слици 1.2.7.



Слика 1.2.7. ЕГИС-ов концептуални оквир имунопатологије сепсе (црвене линије представљају хиперинфламаторну прогресију, плаве линије представљају имunosупресивну прогресију; пуне линије представљају повратак прогресије болести у имунску хомеостазу, испрекидане линије представљају патолошку имунску дисфункцију) [модификовано и прилагођено према Rubio et al. (31)].

1.3. ПАРАМЕТРИ ИНФЛАМАТОРНОГ ОДГОВОРА КАО БИОМАРКЕРИ

Биомаркери се могу дефинисати као карактеристике које се могу објективно мерити и евалуирати као индикатори нормалних биолошких процеса, патогенетских процеса или фармаколошких одговора на терапијске интервенције. Биомаркери се могу користити у дијагностичке сврхе, за утврђивање тежине болести, као индикатор прогнозе и за предикцију и мониторинг клиничког одговора на терапијску интервенцију (34). У клиничкој пракси, биомаркери би могли имати улогу у тријажи и скринингу пацијената према факторима ризика и прогнози; то би помогло да се ресурси интензивне медицине адекватно усмере на највулнерабилнију популацију пацијената. До сада је истраживано преко 175 потенцијалних биомаркера сепсе. Њихова употребљивост, појединачно или у комбинацији, мора бити детаљно испитана у клиничким истраживањима пре евентуалне примене у клиничкој пракси. Идеално, биомаркер би требао да буде валидиран у проспективним, рандомизованим истраживањима на

довољном броју пацијената и да обезбеди додатну информацију, у односу на друге, рутински доступне; да не буде скуп и да информација буде брзо доступна. Често се перформансе биомаркера изражавају као сензитивност (стопа стварно позитивних ако је болест присутна) и специфичност (стопа стварно негативних ако је болест одсутна).

Пацијенти са ризиком од развоја сепсе и септичког шока морају се рано идентификовати. Раним откривањем и рано започетим терапијским интервенцијама могао би се спречити развој органске дисфункције и побољшати исход лечења (35). Биомаркери сепсе се могу користити као дијагностички алати, за одређивање тежине болести или као предиктори морталитета. Такође, важан задатак биомаркери сепсе имају у праћењу клиничког одговора на предузете терапијске мере. Тиме је значај биомаркера сепсе још већи и постоје бројна истраживања која прате и испитују биомаркере али и откривају нове. И поред великог броја откривених биомаркера који се могу пратити на мање или више једноставан начин, у неким случајевима и уз саму постељу пацијента (*POCT - point of care testing*), ни један од њих се не може означити као најпоузданији биомаркер сепсе. Неопходна су даља истраживања и анализирања кроз бројне студије како би се искристалисали биомаркери са највећим степеном сензитивности и специфичности.

1.3.1. ПРЕСЕПСИН

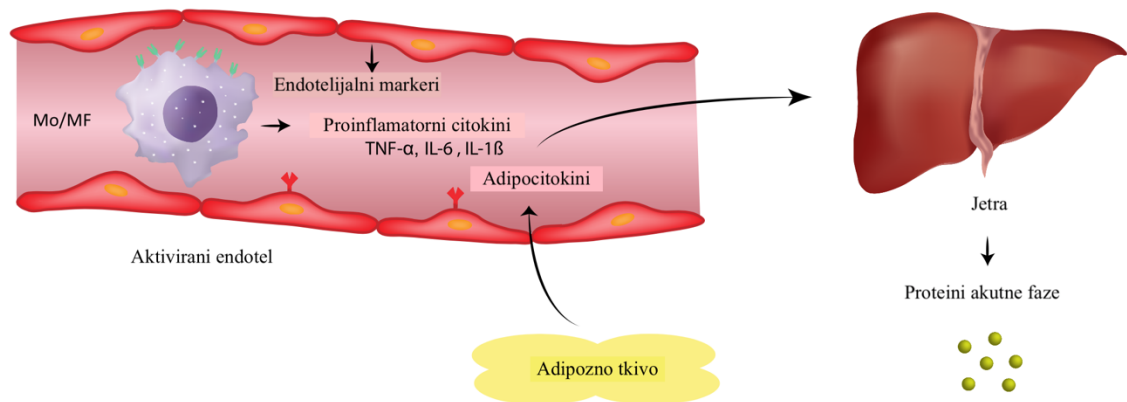
Пресепсин је солубилна форма гликопротеина, означеног као кластер диференцијације (*Cluster of Differentiation CD14*) ЦД14. Експримира се на површини мембрана имунских ћелија током одговора на инвазију инфективног агенса. Најзначајнија експресија ЦД14 је на макрофагима и моноцитима (35). Његов задатак је да служи као рецептор за липополисахарид (ЛПС, ендотоксин) патогена и протеине који везују ЛПС (*LPS-binding proteins - LPBs*), учествује у активацији ТЛР-4 у одговору на стимулацију ЛПС-ом; тако се иницира ослобађање ТНФ- α и имуноинфламаторна сигнална каскада. Након активирања имунског одговора, Н-терминални завршетак овог гликопротеина се цепа и, у форми солубилних подтипова ЦД14, се ослобађа у циркулацију. Један солубилни подтип ЦД14 величине 13 килоDalтона (*kDa*) се означава као пресепсин и може се мерити у плазми применом аутоматизованих тестова хемолуминисценције на уређајима ПАТФАСТ® (*PATHFAST*®) за мање од 20 минута. Код здраве популације ниво солубилног ЦД14 у плазми је веома низак. Сматра се да је његова физиолошка улога везана за фагоцитозу и лизозомално разлагање микроорганизама. У одговору на бактеријску инфекцију ниво пресепсина значајно расте (36).

1.3.2. ПРОКАЛЦИТОНИН

Прокалцитонин (ПЦТ) је прохормон (пептидни прекурсор) калцитонина који примарно производе Ц ћелије паратиреоидне жлезде; у физиолошким условима укључен је у одржавање хомеостазе калцијума и ретко је детектабилан у крви. Тај пептид се састоји од 116 аминокиселина са молекулском тежином од 13 килоDalтона. Могу га ослобађати и паренхимне ћелије, укључујући ћелије јетре, бубрега, адипоците и мишићне ћелије у одговору на бактеријске токсине. Сматра се да синтезу прокалцитонина индукује директно ендотоксин Грам-негативних бактерија, а индиректно проинфламаторни цитокини као што су TNF- α и ИЛ-6. То доводи до повећања серумских нивоа прокалцитонина (и до 5000 пута) унутар 2 до 4 сата; насупротив томе, сматра се да је код вирусних инфекција производња прокалцитонина смањена. Прокалцитонин се сматра „хормокином“, према концепту који се односи на хормоне који се понашају као цитокини у инфламацији и инфекцији (37). У плазми је прокалцитонин стабилан, не долази до деградације у активни хормон калцитонин. Биолошки полу-живот му износи 22 до 26 сати; рани пораст током инфекције и кратак полу-живот би овом биомаркеру обезбедио предност у односу на Ц-реактивни протеин и друге реактанте акутне фазе.

1.3.3. Ц-РЕАКТИВНИ ПРОТЕИН

Ануларни, пентамерни Ц-реактивни протеин (ЦРП) припада реактантима акутне фазе. Нивои у плазми тих протеина акутне фазе (*Acute Phase proteins – APPs*) мењају се у одговору на инфекцију, инфламацију или оштећење ткива. ЦРП је добио такав назив јер је први пут идентификован као субстанца у серуму пацијената са акутном инфламацијом, која је ступала у реакцију са капсуларним полисахаридом (*C-polysaccharide*) пнеумокока. Члан је мале породице пентраксина. Мономер се састоји од 224 аминокиселине, са молекулском масом од око 25 килоDalтона. У серуму, ЦРП има дискоидну, стабилну пентамерну структуру; везује се за фосфохолин који је експримиран на површини мртвих ћелија и неких бактерија. То активира систем комплемента и фагоцитну функцију макрофага. Синтеза протеина акутне фазе детерминисана је проинфламаторним цитокинима, нарочито интерлеукином (ИЛ) – 6, и одвија се углавном у хепатоцитима. Ц-реактивни протеин је традиционални биомаркер инфламације. Ослобађање протеина акутне фазе индуковано дејством проинфламаторних медијатора на хепатоците приказано је на слици 1.3.3.1.



Слика 1.3.3.1. Синтеза и ослобађање протеина акутне фазе из хепатоцита под дејством проинфламаторних медијатора [модификовано и прилагођено према Grondman et al. (38)]

Код здравих, вредности Ц-реактивног протеина су ниже од 10 мг/Л, и након стимулације могу се повећати 1000 пута унутар 24 до 48 сати. Значајно повећање концентрације ЦРП-а јавља се у инфекцији, али такође и код инфламаторних (неинфективних) болести као што су карциноми, кардиоваскуларна и реуматолошка обољења (38).

1.3.4. СРЕДЊИ ВОЛУМЕН ТРОМБОЦИТА (Mean Platelet Volume - MPV) И ОДНОС МПВ СА БРОЈЕМ ТРОМБОЦИТА – МПВ/ТР

Средњи волумен тромбоцита - МПВ (Mean Platelet Volume - MPV) представља меру просечне величине тромбоцита у крви пацијената и део је лабораторијске анализе комплетне крвне слике аутоматским анализатором или методом електричне импеданце или оптичке флуоресценције. Може постојати инверзна, нелинеарна корелација између броја тромбоцита и њихове величине мерене преко МПВ (39). На вредности овог тромбоцитног параметра утиче функција костне сржи и деструкција тромбоцита. Нормални распон вредности је од 7.2 до 11.8 фемтолитара (фЛ). Вредност МПВ рефлектује реактивност тромбоцита. Код повећаних вредности МПВ, тромбоцити су активнији и већи, постају протромботични, па долази до адхезије и агрегације тромбоцита. Неки аутори сматрају се да су веће вредности МПВ последица компензаторне продукције у костној сржи након стресом индуковане деструкције тромбоцита, као на пример у сепси (40). Око тога да ли се у сепси овај тромбоцитни индекс повећава или смањује, као и око његове вредности као предиктора исхода још увек нема сагласности, и то је

предмет даљег истраживања. Такође се, као биомаркер, код критично оболелих са сепсом испитује однос МПВ и броја тромбоцита – МПВ/Тр.

1.3.5. МЕЋУСОБНИ ОДНОСИ НЕУТРОФИЛА, МОНОЦИТА, ТРОМБОЦИТА И ЛИМФОЦИТА КОД КРИТИЧНО ОБОЛЕЛИ СА СЕПСОМ

У третману критично оболелих са сепсом од пресудног је значаја брзо постављање сумње на постојање сепсе, али и откривање пацијената који су под повећаним ризиком од смртог исхода. Поред читавог спектра биомаркера, у последњих неколико година порасло је интересовање за испитивање међусобног односа броја имунских ћелија: неутрофила, моноцита и тромбоцита према лимфоцитима. Односи неутрофили/лимфоцити – НЛ, моноцити/лимфоцити – МЛ и тромбоцити/лимфоцити – ТЛ уз МПВ/Тр су истраживани у смислу повезаности са основним обољењем које је довело до секундарне сепсе код критично оболелих, са бактеријским проузроковачем у хемокултури, као и са исходом (75).

1.4. ЛАКТАТИ КОД КРИТИЧНО ОБОЛЕЛИХ СА СЕПСОМ

Соли млечне киселине - лактати су важан извор енергије. Доприносе ацидитету конверзијом у млечну киселину. Апроксимативно 1500 ммол/Л лактата дневно резултат је анаеробне гликолизе у нормалним условима. Метаболизам лактата се у највећој мери одвија преко јетре (60%) и бубрега (30%). Артеријска концентрација лактата зависи од баланса између стварања и потрошње. У физиолошким условима, лактати се производе у цитоплазми ћелија мишића (25%), коже (25%), мозга (20%), црева (10%) и еритроцита, који су лишени митохондрија, (20%). Када производња пирувата премаши њихово искоришћавање (утилизацију) у митохондријама, пирувати се конвертују у лактате. Пошто су пирувати производ гликолизе, свако повећање брзине гликолизе, без обзира на порекло, може последично повећати ниво лактата. Створени лактати могу се трансформисати у оксалоацетат или аланин преко метаболичког пута пирувата; или их могу директно искористити перипортни хепатоцити (60%) за производњу гликогена и глукозе (неогликогенеза и неоглукогенеза; Коријев циклус). Бубрези такође учествују у метаболизму лактата (30%); кортекс метаболише лактате процесом неоглукогенезе а медула их производи. Гранична вредност за реналну екскрецију лактата урином је 5-6 ммол/Л, што значи да се у физиолошким условима то не догађа. Дакле, лактатемија

рефлектује баланс између продукције и потрошње лактата. Последишно, ако се неким етиолошким механизмом повећа концентрација лактата, то се може манифестовати или хиперлактатемијом (ако се метаболизам смањи) или нормолактатемијом. Разумевање овог концепта је кључно да би се избегло „лечење“ нумеричке вредности лактата. Некада се сматрало да хиперлактатемија обавезно прати исхемију и/или хипоперфузију ткива. Данас се зна да ово није тачно, наведена стања могу, али и не морају бити праћена хиперлактатемијом. По дефиницији, хипоксија блокира оксидативну фосфорилацију у митохондријама и тако инхибира синтезу аденозин-трифосфата (АТФ). Ово стање доводи до акумулације пирувата који се конвертује у лактате, дакле анаеробни енергетски метаболизам карактерише се хиперлактатемијом повезаном са повећаним односом лактат/пируват, повећаним коришћењем глукозе и ниском производњом енергије. Постоје стања у којима је хиперлактатемија преобладајуће резултат хипоперфузије ткива. Та хипоксичка хиперлактатемија се јавља у стањима шока са ниским минутним волуменом срца као што су кардиогени или хеморагички шок. Проблем хиперлактатемије у сепси је много комплекснији. Постоје неке ситуације када се у сепси јавља хиперлактатемија повезана са хипоксијом: први пример је септички шок праћен кардициркулаторним колапсом резистентним на терапију катехоламинима, а други је рани моменат у развоју сепсе, када је хиперлактатемија још увек повезана са знацима слабе испоруке кисеоника. У сепси је хиперлактатемија преобладајуће одраз метаболичке адаптације а не хипоксије. Постоји много доказа за то (41). Када би хиперлактатемија у сепси заиста била индукована ткивном хипоксијом, онда би се, код тих пацијената, повишени лактати кориговали са повећањем транспорта кисеоника што се не догађа. Такође, код пацијената у септичком шоку постоји повећан парцијални притисак кисеоника у ткивима (на пример мишићима) за разлику од кардиогеног шока. Нивои АТФ-а су, у мишићном ткиву пацијената са сепсом, нормални а не снижени као што би били да је хипоксија кључни фактор. Ензим пируват-дехидрогеназа (ПДХ) конвертује пируват у ацетил-коензим А у респираторном ланцу митохондрија. Када је блокирана ПДХ, пируват се акумулира и конвертује у лактат, дакле та хиперлактатемија је метаболичка и нема везе са хипоксијом. Доказ за то је примена дихлороацетата, активатора ПДХ, која код пацијената са сепсом доводи до значајног смањења нивоа лактата у крви. Инфламаторно стање у сепси индукује повећање стварања пирувата убрзаном аеробном гликолизмом; до ње долази када стопа метаболизма угљених хидрата премашује оксидативни капацитет митохондрија. Пируват се производи повећаним инфлуksom глукозе, али и путем катаболизма мишићних протеина, када се ослобађају аминокиселине које се трансформишу у пируват а последишно и у лактат. У сепси,

инфламација и ендогени/егзогени катехоламини индукују убрзану аеробну гликолизу и дисфункцију ПДХ. Мишићно ткиво чини око 40% укупне масе ћелија тела. Мишићни лактати, створени под дејством адреналина и ослобођени у циркулацију, долазе до јетре која их користи за производњу глукозе путем неогликогенезе у већ описаном Коријевом циклусу. Ако постоји перзистентна хиперлактатемија код хемодинамски стабилног пацијента у сепси, без потребе за катехоламинском потпором, онда је она резултат смањеног клиренса лактата а не његове повећане продукције. Катаболизам протеина, веома присутан код критично оболелих са сепсом, генерише ослобађање аминокиселина, које се преко пирувата конвертују у лактате; дакле то је још један разлог за хиперлактатемију. Без обзира на механизам продукције, перзистентна хиперлактатемија је важан прогностички биомаркер у обољењима различите етиологије (политраума, септички, хеморагички или кардиогени шок); може бити резултат непрестане хиперпродукције или смањеног клиренса, нарочито код дисфункције јетре. Превазиђени концепт лактата само као распадних продуката метаболизма - „лоши лактати“, еволуирао је до концепта адаптивног одговора у стању шока, када лактати могу бити извор енергије - „добри лактати“ а не маркер ткивне хипоксије.

Теорија „лактатног шатла“ (*lactate shuttle*) сугерише да аеробна продукција лактата представља важан механизам помоћу којег различита ткива деле заједнички извор за неогликогенезу. Концепт „лактатног шатла“ обједињује различите улоге лактата у испоруци оксидативних и глуконеогенетских субстрата као и у ћелијској сигналној каскади (42). Хиперлактатемија, у овом контексту, може бити адаптивни, протективни механизам у стањима шока тиме што фаворизује оксидацију лактата пре него глукозе у ткивима где је кисеоник доступан. Тако се глукоза чува за ткива где је садржај кисоника низак.

Нова истраживања показују да екстрацелуларни лактати испољавају важан регулаторни ефекат на читав низ имунских ћелија; њихово метаболичко репрограмирање може допринети развоју имунске дисфункције током сепсе (43). Пре више од пола века доктор Ото Варбург (*Otto Warburg*) уочио је да различите ћелије карцинома метаболишу глукозу директно у лактате упркос присуству велике количине кисеоника. То, што је било познато као Варбургов ефекат, данас се назива аеробна гликолиза. Метаболичка аеробна гликолиза је неопходна за активацију имунских ћелија. За адекватан имунски одговор потребна је брза производња енергије, а путем аеробне гликолизе се одмах обезбеђује есенцијалан АТП, који представља енергетску монету ћелије. Повезаност метаболизма и имунског одговора види се и по томе што нова истраживања показују да метаболички ензими и њихови продукти могу стимулирати ослобађање алармина из ћелија.

Прелазак на аеробну гликолизу игра важну улогу у инфламаторном одговору урођеног имунског система. На пример, када се липополисахарид Грам-негативних бактерија веже за ТЛР-4 на макрофагима, то доводи до метаболичке транзиције од оксидативне фосфорилације ка аеробној гликолизи и резултира проинфламаторним фенотипом. Такође, инхибиција гликолизе *in vitro* доводи до репрограмирања ћелија урођеног имунског одговора ка анти-инфламаторном стању, што показује колико је важан метаболизам за ћелијски фенотип. Код критично оболелих обично долази до метаболичког шифта од митохондријалне оксидативне фосфорилације ка аеробној гликолизи. Ова транзиција удружена је са повећаном продукцијом лактата, мултиплом органском дисфункцијом и лошим исходом болести. Утилизација аеробног гликолитичког метаболизма, од стране активираних имунских ћелија, може допринети повећању продукције лактата. Током критичне болести, аеробна гликолиза постоји у нехипоксичним ћелијама. Повећање продукције лактата може такође бити индикатор метаболичког шифта ка инфламаторној гликолизи. Најновија истраживања фокусирају се на могуће имуномодулаторне ефекте лактата на ћелије урођеног имунског одговора, примарно на макрофаге. Ове ћелије имају кључну антиген-презентујућу улогу; поред тога макрофаги учествују у контроли Б и Т лимфоцита у стеченом имунском одговору. У сепси, дисфункционалан урођени имунитет не само што ограничава одговор на примарну инфекцију, него и оштећује важне баријере које би требало да буду препрека развоју секундарних нозокомијалних инфекција. Једна од најизраженијих карактеристика протраховане сепсе је неадекватан развој имунске толеранције на патогене. Истраживања ефеката лактата на функцију и диференцијацију макрофага показала су да, у касној фази сепсе, те ћелије имају доминантно имуносупресивни М2 фенотип што може бити кључно у имунопатогенези сепсе. Лактати могу бити примарни медијатори индукције М2 инхибиторне поларизације макрофага, на дозно-завистан начин, путем метаболичког репрограмирања. Утврђено је, такође, да лактати смањују секрецију ТНФ- α од стране моноцита механизмом редукције активности NF- κ B и одлагања ЛПС-ом индуковане трансдукције сигнала. За разлику од наведеног, продукција анти-инфламаторних цитокина, као што је ИЛ-10, није поремећена.

Перзистентна хипелактатемија је нарочито комплексна за тумачење. Постоје најмање четири различита патогенетска механизма која до ње могу довести: анаеробна гликолиза у хипоперфундованим ткивима, нарочито када постоји тешка микроциркулаторна дисфункција; адренергичка индукција аеробне гликолизе у стањима стреса; поремећен клиренс лактата путем јетре; и дисфункција митохондрија која доводи до ограничавања метаболизма пирувата, његове акумулације и конверзије у лактате под дејством ензима лактат-дехидрогеназе – ЛДХ (44).

1.5. АКТИВАЦИОНИ СТАТУС НЕУТРОФИЛА У ЦЕЛУЛАРНОМ ИМУНОИНФЛАМАТОРНОМ ОДГОВОРУ КОД КРИТИЧНО ОБОЛЕЛИХ СА СЕПСОМ

Целуларни одговор организма на инвазију патогена настаје активацијом бројних ћелија. На првом месту доминантно се активирају неутрофили и моноцити. Ове ћелије су уједно и кључне ћелије урођене имуности. У поређењу са стеченим имунским одговором, којем је потребно време да се развије и зависи од претходне интеракције са специфичним микроорганизмом, способност неутрофила да убијају микроорганизме је тренутна, неспецифична и не зависи од претходне изложености микроорганизму (45). Дакле, ове ћелије делују као прва линија одбране од инфекције и, примарно, као ефекторске ћелије урођене имуности. Неутрофили су полиморфонуклеарни (ПМН) леукоцити. Ове терминално диферентоване ћелије се стварају у костној сржи, где се и акумулирају за ослобађање у циркулацију. Током матурације, неутрофили развијају неколико интрацелуларних компартмента (секреторних гранула и везикула) у којима су депоновани протеини кључни за антимикуробну и инфламаторну функцију ћелије. Оспособљени су за елиминацију бактерија захваљујући фагоцитози, дегранулацији, депонованој великој количини протеолитичких ензима али и способности да брзо продукују слободне кисеоничке радикале (*reactive oxygen species - ROS*), хемокине и цитокине чиме се регрутују друге имунске ћелије и појачавају имунски одговор организма. Неутрофили врше деградацију фагоцитозом интернализованих патогена помоћу протеолитичких ензима и слободних кисеоничких радикала. Процес развоја неутрофила у костној сржи траје 14 дана у физиолошким околностима. Након сазревања, привремено се задржавају у костној сржи у депоима. По ослобађању у крвоток, неутрофили у крвној струји бораве 12-14 часова, најдуже 1 дан у транзиту од циркулаторног пула (аксијални проток) ка маргиналном пулу (контакт са зидом крвног суда); дакле имају кратак животни век и не показују пролиферативна својства. Када се нађу у циркулацији, неутрофили почињу да траже знаке инфекције и инфламације, који доводе до серије догађаја који кулминирају трансмиграцијом неутрофила кроз зид крвног суда у ткиво до места инвазије микроба (46). Поред интрафагозомалног убијања микроорганизма, активирани неутрофили у екстрацелуларни простор ослобађају екстрацелуларне мреже као замке (*Neutrophil Extracellular Traps - NETs*) састављене од хроматина, хистона и бројних грануларних протеина. Овај процес се назива НЕТоза, настаје у одговору на различите стимулусе, тиме се појачава антимикуробна активност

неутрофила (47). Уколико се не појави бактеријски патоген кога треба уклонити, неутрофили се усмеравају ка ретикулоендотелним органима каква је јетра или се враћају у костну срж. У овим органима они подлежу програмираној ћелијској смрти (спонтана апоптоза). У периферној крви се налази 4 -10000/ μL зрелих неутрофила, што чини и до 70 % укупног броја циркулишућих леукоцита у крви човека. Одржавање физиолошки нормалног броја неутрофила у циркулацији је омогућено процесом спонтане (конститутивне) апоптозе старих неутрофила. Старење неутрофила индукује карактеристичне морфолошке промене: смањење ћелије, кондензација нуклеуса, вакуолизација цитоплазме, фрагментација ДНК и деполаризација митохондрија. Такође, смањена је функционална способност апоптотичних неутрофила, укључујући поремећену хемотаксу, фагоцитозу, респираторни прасак и дегранулацију. Митохондрије су централна компонента интринзичког пута апоптозе. Међутим, митохондрије неутрофила су донекле енигма. На пример, хемотакса неутрофила троши велике количине енергије везане у АТП; та енергија се скоро искључиво генерише гликолизом, оксидативне фосфорилације скоро да и нема у неутрофилима (45). Апоптоза неутрофила игра кључну улогу у резолуцији акутне инфламације.

Инфламаторни сигнали пролонгирају животни век неутрофила за неколико дана, током тог временског интервала неутрофили учествују у имунском одговору. Интересантно је да стимулуси, који су потентни индуктори апоптозе код других типова ћелија, могу имати супротне ефекте на неутрофиле. На пример, излагање неутрофила кортикостероидима, хипоксији, дејству ТНФ- α , повећаним интрацелуларним нивоима калцијума и АТП-а пре ће инхибирати апоптозу ових ћелија. Генерално гледано, велика већина инфламаторних медијатора, као што су бактеријски ендотоксин и липотеихоична киселина, ће одложити спонтану апоптозу неутрофила. Дакле, када је присутна инфекција, или се развија сепса, апоптоза неутрофила је одложена и њихова продукција је стимулисана, може настати неутрофилија са доминацијом младих, незрелих форми неутрофила. Број неутрофила у периферној крви је ушао у критеријуме за дијагнозу сепсе; потребан повећан или смањен број неутрофила у периферној крви са преминацијом незрелих форми (више од 10%). Међутим, и у тим условима неутрофили ће умрети путем апоптозе или, по неким ауторима, и процесом НЕТ-озе (46); тако доприносе стварању гнојних колекција у инфицираном ткиву. Након смрти неутрофила, иницира се други процес којим макрофаги уклањају мртве, апоптотичне неутрофиле. Када треба очистити ткиво од истрошених неутрофила који у себи садрже убијене микробе, покреће се механизам фагоцитозом индуковане смрти ћелије (*phagocytosis-induced cell death – PICD*). Као и код

спонтане апоптозе неутрофила, правовремено уклањање неутрофила, након што су обавили фагоцитозу патогена, би спречило ексцесивно оштећење ткива домаћина цитотоксичним микробицидним компонентама које би настале некротичном лизом полиморфонуклеара.

Неутрофили имају кључну улогу у одбрани од бактеријских инфекција, што се најбоље види код неутропеније (на пример после хемотерапије), када је повећана осетљивост на бактеријске и гљивичне инфекције које се могу развити у сепсу. У великом ризику од развоја инфекције и сепсе су и пацијенти код којих постоји дефицит адхезије неутрофила чиме је заустављена неутрофилна миграција кроз ендотел крвних судова.

Међутим, ексцесивна активација неутрофила може довести до оштећења ткива које ове ћелије инфилтрују јер се ослобађају литички фактори или проинфламаторни цитокини. Системска инфламација доводи до секвестрације неутрофила у микроваскулатуру када они могу оклудирати лумен капилара и изазвати исхемију ткива. Узорци ткива обдукованих пацијената, који су преминули од сепсе са мултиплом дисфункцијом органа, показали су распон локализације неутрофила, од секвестрације и агрегације у реналним крвним судовима до веома изражене инфилтрације ткива плућа. Код акутног респираторног дистрес синдрома (АРДС-а), који се често јавља у сепси, тежина оштећења плућа корелира са интензитетом неутрофилне инфилтрације ткива и високим концентрацијама у бронхоалвеоларном лавату протеолитичких ензима пореклом из неутрофила. Велика акумулација неутрофила, као инсулт у дисфункционалном органу, је окидач за широко распрострањену регрутацију и секвестрацију неутрофила у другим органима који такође губе функцију и тада се развија синдром мултипле органске дисфункције – МОДС (48). Међутим, неутрофилима посредовано оштећење плућа јавља се и код пацијената са неутропенијом; то показује да дисфункција органа може бити иницирана од стране само неколико неутрофила секвестрираних у микроваскулатуру. На анималним моделима се показало да се незрели неутрофили највише акумулирају у плућној микроваскулатури; ту се активирају и индукују значајно оштећење ткива путем ослобађања дефенсина, који су протеолитички ензими. Упркос томе што се број неутрофила изван нормалног распона користи за дијагнозу системске инфламације, треба имати у виду да неутрофили нису функционално хомогени и да различите субпопулације имају различите фенотипске и секреторне профиле који доприносе развоју сепсе. Азот оксид (NO) је један од кључних медијатора активности неутрофила (49).

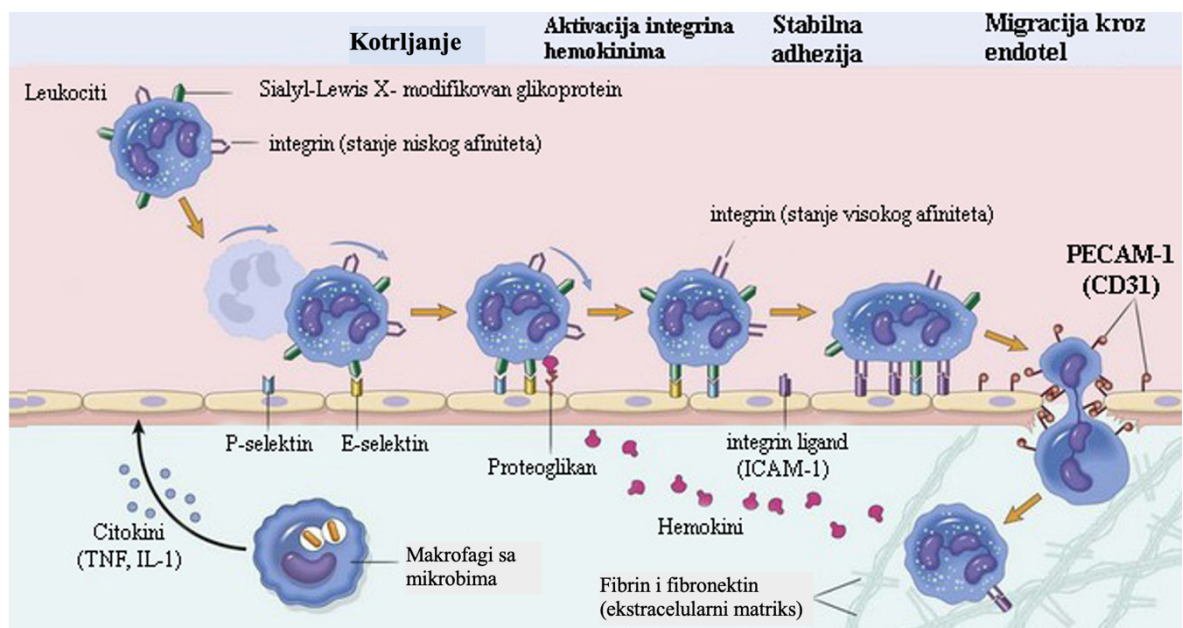
Поред своје фагоцитне активности, неутрофили на својој површини презентују бројне рецепторе за ПАМП-ове и ДАМП-ове. Активацијом рецептора на површини неутрофила активира се сигнални процес који резултује продукцијом инфламаторних медијатора (50). За

ослобађање неутрофила из костне сржи од пресудне важности су два цитокина. То су фактор стимулације колонија гранулоцита (*granulocyte-colony stimulating factor - G-CSF*) и фактор стимулације колонија гранулоцита и макрофага (*granulocyte-macrophage colony stimulating factor - GM-CSF*). Ова два фактора стимулишу брзо ослобађање неутрофила из костне сржи у крвоток. Подстичу сазревање, активацију и продужавају животни век неутрофила. У акутној инфекцији, концентрација фактора стимулације колонија се вишеструко увећава; код здравих су скоро недетектабилни. Елиминација бактерија је зависна од регрутације и акумулације неутрофила на месту инфекције. Да би стигли до места инфекције привучени стимулусом, неутрофили прво морају да савладају зид крвног суда. Адхеренција неутрофила за зид крвног суда је непоходна да би дошло до њихове екстравазације у ткива. Две фамилије адхезионих молекула, селектини и интегрини, омогућавају везивање неутрофила за површину ендотела. Селектини, лектински гликопротеини типа Ц, поспешују иницијално котрљање неутрофила по површини ендотела под дејством силе крвне струје. На површини неутрофила постоје две подфамилије интегрини ($\beta 1$ и $\beta 2$); то су хетеродимери са α и β ланцима. Улога интегрини је да омогуће чврсту адхезију неутрофила на површину ендотела насупрот крвној струји (51).

На површини неутрофила, Л-селектин (*CD62L*) се повезује са специфичним олигосахаридним мотивима гликопротеина са површине ендотела, док са површине ендотела Е-селектин (*CD62E*) и П-селектин (*CD62P*) на сличан начин препознају олигосахариде са површине неутрофила. Транзиторно котрљање помаже неутрофилима да остваре контакт са факторима инфламације, као што су ИЛ-8 и фактор активације тромбоцита (*platelet-activating factor - PAF*), који су експримирани на површини ендотела. Та интеракција стимулише неутрофиле да брзо повећају експресију $\beta 2$ интегрини (*CD11a* и *CD11b*) као и њихов афинитет за ендотелни лиганд, интерцелуларни адхезиони молекул 1 (*intercellular adhesion molecule 1 - ICAM-1; CD54*). Ендотелна експресија овог лиганда се појачава под дејством ТНФ- α , ИЛ-1, ЛПС-а ослобођених са места бактеријске инфекције. На неутрофилима пацијената са сепсом може постојати абнормална дистрибуција и Л-селектини и ЦД11б. Смањена експресија Л-селектини може бити резултат аутопротеолизе индуковане циркулишућим инфламаторним стимулусима или транзиторним контактом са зидом крвног суда (52). $\beta 1$ интегрини углавном су повезани са лимфоцитима и моноцитима, али један члан ове подфамилије, ВЛА-4 (*very late antigen - VLA-4; CD49d*) је идентификован на око 30% неутрофила пацијената са сепсом (53). Лиганди за $\beta 1$ интегрини су адхезиони молекули васкуларних ћелија ендотела (на пример *vascular cell adhesion*

molecule – 1 - VCAM-1; CD106), чија је експресија на ендотелу индукована проинфламаторним цитокинима као што су ТНФ- α и ИЛ-1.

Дакле, кораци који су укључени у миграцију неутрофила преко васкуларног зида обухватају: котрљање, активацију, стабилну адхезију и миграцију преко ендотелног слоја и васкуларног зида. Процес котрљања успорава кретање неутрофила у крвном суду и доводи их ближе површини васкуларних ендотелних ћелија. То активира и неутрофиле и ендотелне ћелије; мења се конформација интегрина и повећава експресија адхезионих молекула. Везивање $\beta 2$ интегрина експримираних на неутрофилима за *ICAM-1*, који се налази на површини ендотелних ћелија, доводи до стабилне адхеренце неутрофила за површину ендотела. Када се неутрофили једном вежу за васкуларни ендотел, долази до њихове адхеренце за друге адхезионе молекуле, као што је на пример *platelet-endothelial cell adhesion (PECAM-1)*, који се налазе на спојницама ендотелних ћелија; затим следи трансмиграција кроз спојнице у периваскуларно ткиво. У периваскуларном ткиву, неутрофили експримирају $\beta 1$ интегрине преко којих се врши адхеренца за протеине екстрацелуларног матрикса, као што су ламинин, фибронектин, витронектин и колаген. Медијатори целог процеса су већ наведени хемокини (*CXCL8; IL-8*), компоненте комплемента, вазоактивни амини, цитокини и медијатори пореклом са ћелијских мембрана, као што су фактор активације тромбоцита (*PAF*) и леукотријени. На слици 1.5.1. приказана је адхезиона каскада неутрофила.



Слика 1.5.1. Адхезиона каскада леукоцита [модификовано и прилагођено према Kumar et al. (54)]

Главна функција неутрофила је фагоцитоза и уништавање патогена. Како би се процес фагоцитозе одвијао успешно, неопходно је да се на месту продора инфективног агенса појаве неутрофили. За процес миграције неутрофила ка инфективном агенсу одговорна је хемотакса. Под хемотаксом (*chemotaxis*) се подразумева склоност ћелија да мигрирају у смеру градијената хемотактичних стимулуса. Ту способност да региструју хемотактичке градијенте неутрофили стичу током сазревања у костној сржи. Хемотаксна способност неутрофила је и уједно функција која је најосетљивија на поремећаје: код читавог низа стања (сепса, опекотине) постоји повећана склоност ка инфекцијама ако је хемотакса неутрофила дисфункционална (55). Медијатори инфламације, ослобођени активацијом неутрофила, амплификују инфламаторни процес и стимулишу миграцију неутрофила у ка месту инфекције. Медијатори задужени за активацију и привлачење нових ћелија ка месту инфекције означавају се као хемокини (56). Припадају групи малих цитокина. Неутрофили на својој површини експримирају рецепторе *CXCR1* и *CXCR2* у одговору на *CXC* хемокине (49, 56). Неутрофили, привучени хемокинима са места инфекције, мигрирају из подручја ниске концентрације хемотактичког фактора (зид крвног суда) ка подручју његове високе концентрације (место инфекције или инфламације). Међу факторима хемотаксе, који привлаче неутрофиле, издвајају се Ц5а компонента комплемента, леукотриен Б₄, фактор активације тромбоцита, бактеријски пептид формил-метионил-леуцил-фенилаланин (*formyl-methionyl-leucyl-phenylalanine – fMLP*) и ИЛ-8. Ти хемоатрактанти затим постају потентни активатори неутрофила. Интерлеукин-8 везује се за рецепторе високог афинитета *CXCR1* и *CXCR2*. *CXCR2* је, такође, рецептор и за друге хемокине. Неутрофили пацијената са сепсом могу имати смањену експресију *CXCR2* али не и *CXCR1*, па њихова реактивност на ИЛ-8 може бити очувана. Из системске циркулације неутрофили улазе у ткива преко посткапиларних венула, за разлику од плућне циркулације у којој се тај процес дешава у капиларима. Већ је наведено да код пацијената са АРДС-ом постоји велика миграција неутрофила. Лумен плућних капилара је толико мали да је продужено време проласка неутрофила кроз њих као и време контакта са зидом тих крвних судова. То спречава котрљање по ендотелу плућних капилара, па секвестрација неутрофила у плућима много више зависи од интегрина него од селектина; то је у складу истраживањима која су показала да неутрофили пацијената са сепсом имају ниску експресију Л-селектина а повећану експресију интегрина ВЛА-4 и ЦД11б (52). У сепси често доминира неутрофилија. Ипак, ови неутрофили могу бити нарушене функционалности испољене у виду смањене хемотактичне активности, ослабљеног

бактерицидног деловања и са израженом продукцијом анти-инфламаторних медијатора, нарочито ИЛ-10 (28). Бројна истраживања фокусирана на сепсу су показала да и недовољан број неутрофила као и неефикасна миграција ка месту инфекције доводе до слабе и неадекватне контроле инфекције локално. Тада инфекција напредује и шири се системском циркулацијом, што је праћено повећаваним морталитетом (28, 49). Бројни су механизми који доводе до инсуфицијентне неутрофилне миграције. Један од механизма је интернализација *CXCR2* рецептора на површини неутрофила (57). Неутрофили са интернализованим *CXCR2* рецепторима су изоловани из циркулишуће крви експерименталних животиња али и пацијената оболелих од сепсе. Док у процесу миграције неутрофила интернализација *CXCR2* рецептора инхибира њихову миграцију, са друге стране рецептори типа *CCR2* су медијатори миграције неутрофила у виталне органе (57). Интеракција неутрофила и ендотела игра важну улогу у дисфункцији органа пацијената са сепсом; уочена је да може постојати функционална дихотомија неутрофила у погледу реактивности на бактеријску инфекцију. У инфицираном плућном ткиву присутна је интензивна инфилтрација неутрофилима, док је у осталим ткивима могуће да екстравазацију неутрофила омета њихово ексцесивно везивање за ендотел и редукована хемотактичка активност. Повећана адхеренца неутрофила, уз нисходну регулацију хемотактичких рецептора, може довести до микроваскуларних оклузија са последичном хипоперфузијом и хипоксијом ткива. Секреција цитокина од стране неутрофила на зидовима крвног суда може променити нетромбогена својства ендотелних ћелија у прокоагулантно стање са иницијацијом дисеминоване интраваскуларне коагулације (ДИК). Током овог процеса такође се индукује синтеза азот-оксида како у ендотелним и у васкуларним глатким мишићним ћелијама тако и у самим неутрофилима. Азот-оксид је један од главних индуктора хипотензије у септичком шоку као и ензимске инхибиције митохондрија. Регрутацију неутрофила ка месту инфекције током сепсе појачавају, између осталих, ИЛ-17 и ИЛ-33.

Неутрофили се могу налазити у три функционална стања: стање мировања када нису стимулирани; стање у коме су дошли у додир са инфламаторним агонистима или микробним продуктима који снижавају праговни стимулус потребан за активацију неутрофила (*primed neutrophils, priming*) и стање активације када спроводе неку од својих многобројних функција. Транзиција неутрофила од стања мировања у циркулацији до стања активације на месту инфекције дешава се под дејством различитих инфламаторних стимулуса. Код пацијената са сепсом, неутрофили у циркулацији су већ у стању сниженог прага стимулације (*primed neutrophils, priming*), што се може презентовати повећањем оксидативне активности и експресије

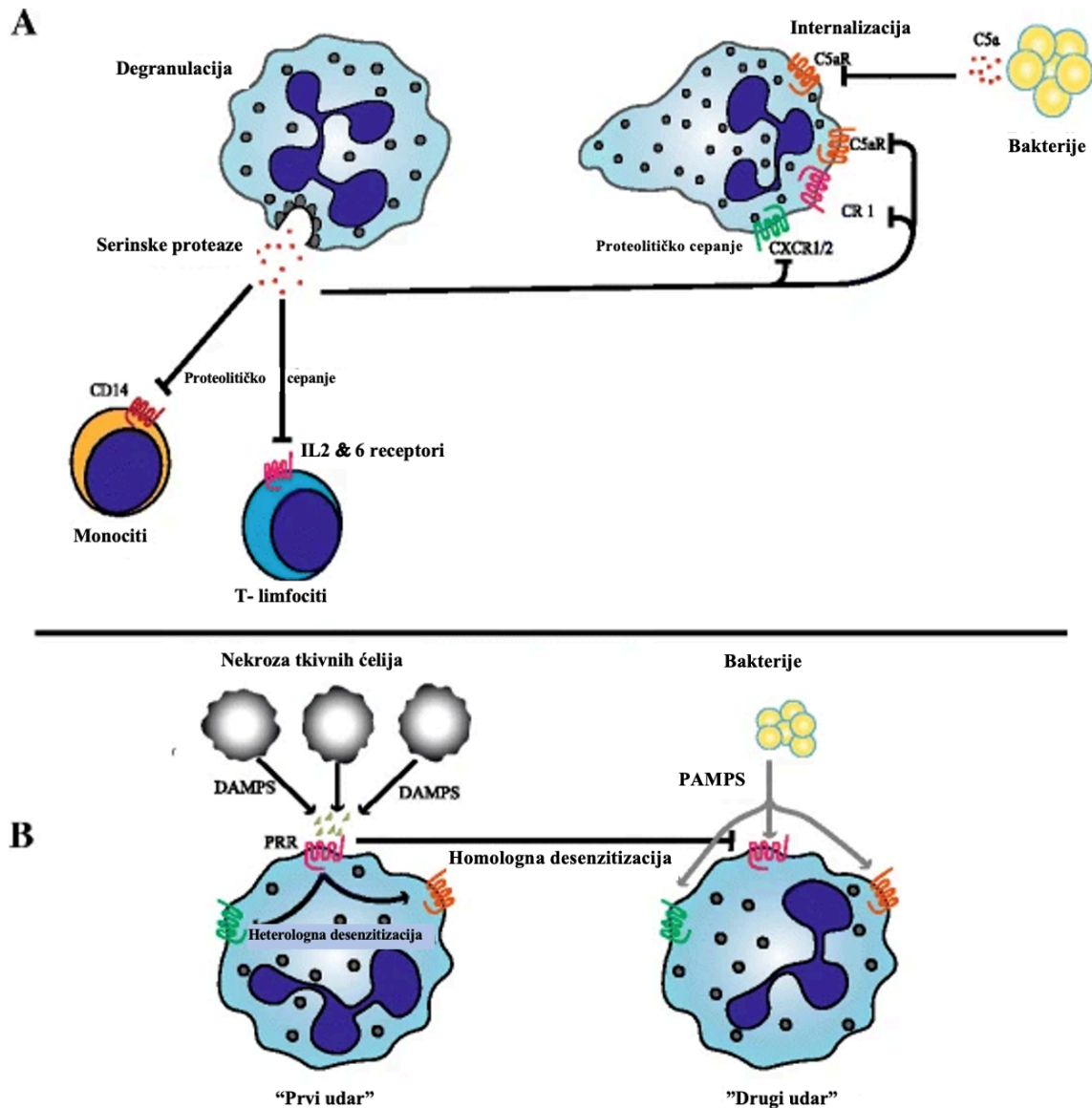
интрацелуларног транскрипционог фактора НФ-κБ (*NF-κB*). Када неутрофили нађу и препознају патогене, може доћи до фагоцитозе и последичног убијања бактерија у фаголизозому. Неутрофили поседују два одвојена анти-микробна механизма који делују симултано; један зависи од кисеоника а други не. Они могу да се функционално смеђују током инфламације у зависности од тренутног флуksа кисеоника; динамичке промене перфузије и оксигенације су честе у процесу инфламације (58). Што се тиче интрацелуларног убијања, једно истраживање је показало да се неутрофили пацијената који су умрли од сепсе карактеришу значајно повећаном продукцијом слободних кисеоничких радикала у поређењу са неутрофилима преживелих (59). Адекватно функционисање интрацелуларних гранула је кључно за антимикуробну активност неутрофила. Међутим, неконтролисана активација тих ћелија у инфламацији може довести до колатералног оштећења ткива путем ексцесивне екстрацелуларне дегранулације и ослобађања неутрофилних протеаза. Веће оштећење ткива ће довести до повећаног инфлуksа и активације неутрофила, што онда води у зачарани круг ткивне деструкције.

Као допуну конвенционалном интрацелуларном убијању и деградацији бактерија, неутрофили у свом антимикуробном арсеналу имају и неутрофилне екстрацелуларне мреже које су замка за бактерије (*neutrophil extracellular trap – NET*). НЕТ се састоји од фибрила формираних активном експулзијом ДНК, хроматина и грануларних протеина из неутрофила. Те мреже се формирају у одговору на низ проинфламаторних стимулуса као што су ИЛ-8, ТНФ-α и ендотоксин. Сматрало се да током формирања неутрофилних екстрацелуларних мрежа сами неутрофили умиру, па се ова форма ћелијске смрти назива НЕТоза. Међутим, интравитална микроскопија показала вијабилне неутрофиле након формирања НЕТ, који су постали ануклеарни али способни за фагоцитозу и формирање зрелих фагозома. Ови подаци су указали на то да НЕТоза не резултира увек умирањем ћелије (60). Главна функција НЕТ-а би била превенција дисеминације бактерија, али ексцесивно формирање неутрофилних екстрацелуларних мрежа може бити цитотоксично што се показало након сепсе, трауме и исхемијско-реперфузионог оштећења. Истраживања су показала да активирани ендотелне ћелије могу индукувати формирање НЕТ-а *in vitro*; у моделу ендотоксинског шока НЕТ адхерира на ендотелне васкуларне ћелије и активира их (61). Такође, интеракција између неутрофила и активираних тромбоцита у сепси индукује стварање НЕТ-а што доприноси оштећењу ендотела и органа.

Дисфункција неутрофила током акутне инфламације може бити проузрокована аберантном контролом сопственог антимикуробног арсенала као што је: аутокрини и паракрино

цепање есенцијалних површинских рецептора; нисходна регулација површинских рецептора и сигналних путева у нерешеној инфламацији или током другог микробног инсульта након иницијално стерилне инфламације (интерференца ПАМП и ДАМП); и ослобађање популације неутрофила са смањеним микробицидним својствима. Такође, неутрофили у току инфламаторног процеса могу деловати на друге имунске ћелије и допринети имунској парализи стеченог имунског система (55). Нисходна регулација рецептора на неутрофилима, моноцитима и лимфоцитима током инфламације може бити резултат цепања путем серинске протеазе ослобођене дегранулацијом неутрофила. Смањена експресија ових рецептора оштећује ефекторну функцију неутрофила. То значи да протеазе не ихибирају само функцију неутрофила, него и моноцита у микросредини. Неутрофилна еластаза цепа ЦД14, рецептор који је неопходан за препознавање ендотоксина од стране ТЛР-4 тако да рецептор на моноцитима и лиганд имају везу високог афинитета. То оштећује функцију моноцита (62). Када ПАМП и ДАМП користе сличне рецепторе на неутрофилима (из групе *pattern recognition receptors - PRRs*), ова биолошка мимикрија ствара проблем имунском систему пошто повреда ткива (ДАМП) доводи до нисходне регулације многих рецептора путем хетерологне и хомологне десензитизације. То чини неутрофиле неспособним да адекватно одговоре на следећи микробни инсулт (ПАМП) (63).

На слици 1.5.2. приказана је нисходна регулација имунских рецептора под дејством серинске протеазе ослобођене дегранулацијом неутрофила (панел А) као и биолошка мимикрија између ДАМП-ова и ПАМП-ова (панел Б).



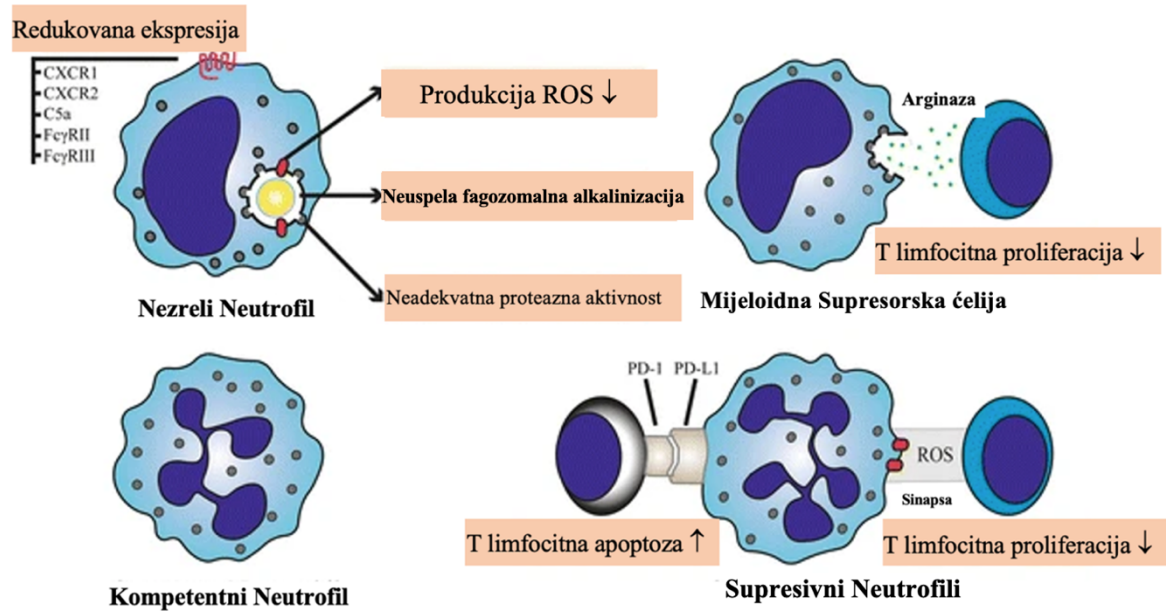
Слика 1.5.2. Нисходна регулација имунских рецептора серинском протеазом из дегранулисаних неутрофила (А) и десензитизација путем рецептора за препознавање молекулских шаблона – *PRR* (Б) [модификовано и прилагођено према Lelifeld et al. (55)]

Периферни неутрофили у циркулацији састоје се од хетерогених сетова са различитим статусом активације и функције. У тешкој инфламацији може доћи до ослобађања некомпетентних неутрофила у циркулацију. Велики број незрелих ћелија се појављује у циркулацији, па се чак и неутрофилни прогенитори могу идентификовати. Као резултат, перзистентна тешка инфламација може довести до „исцрпљивања костне сржи“ од неутрофила, што компромитује урођени имунски одговор. Присуство незрелих неутрофила у циркулацији

може бити или компензаторни одговор инициран деплецијом зрелих неутрофила у костној сржи или инфламаторна реакција на бактеријски стимулус. Истраживања су показала да, код пацијената са сепсом, незрели неутрофили имају смањен фагоцитни капацитет, као и да је редукована фагоцитоза са повећањем броја циркулишућих неутрофилних прогенитора повезана са смртним исходом (64).

Неутрофили, поред директне антимикуробне функције, учествују у модулацији стеченог имунског одговора у тешког инфламацији. У тој ситуацији, неутрофили производе хемокине и секретују грануларни садржај; тиме могу привући Т-ћелије и модулирати њихову функцију и директно и индиректно. Поред тога, постоји још један механизам имуномодулације када макрофаги фагоцитују апоптотичне неутрофиле. Након тога долази до шифта имунског одговора макрофага ка анти-инфламаторном цитокинском профилу. Супресију стечене имуности односно Т-ћелија могу, поред неутрофила, индуковати и супресорске ћелије мијелоидног порекла (*myeloid-derived suppressor cells – MDSCs*). То је хетерогена група незрелих моноклеара и неутрофила (65-67) веома значајна за имунски одговор код критично оболелих са сепсом. Смањена антимикуробна функционална способност неутрофила и њихова улога у супресији стечене имуности је веома битна за разумевање имунске парализе која је повезана са смртним исходом код критично оболелих након трауме, након хируршких интервенција и/или са сепсом. Сва ова стања карактеришу се тешком инфламацијом у којој се имунски одговор састоји и од проинфламаторне и од анти-инфламаторне компоненте. Проинфламаторна компонента доприноси мултиплој органској дисфункцији док имунска парализа чини пацијенте подложним инфекцијама. Инфективне компликације се код тих болесника јављају упркос неутрофилији. Неутрофили у сепси имају парадоксалне улоге: и протективну и деструктивну (49).

Дакле, током тешке инфламације, у циркулацији се налазе најмање четири типа неутрофила: незрели, компетентни, супресивни неутрофили и супресорске ћелије мијелоидног порекла, што је приказано на слици 1.5.3.



Слика 1.5.3. Типови циркулишућих неутрофила у тешкој инфламацији [модификовано и прилагођено према Leliefeld et al. (55)]

Механизам којим супресорске ћелије мијелоидног порекла могу супримирати Т лимфоците, поред осталих, обухвата и експресију и секрецију аргиназе-1 која доводи до деплеције аргинина из микросредине. Деплеција Л-аргинина, који је есенцијална аминокиселина, резултује прекидом ћелијског циклуса Т лимфоцита у G0-G1 фази. Други, веома занимљив механизам којим неутрофили могу инхибирати одговор Т-ћелија је путем лиганда за протеин програмиране смрти ћелије ПД-Л1 (*programmed death-ligand 1 [PD-L1]*). Неутрофили изоловани од пацијената са сепсом на својој површини експримирају протеин ПД-Л1; то је потентан индуктор апоптозе Т-ћелија. Протеин програмиране смрти ћелије 1 односно ПД-1 (*programmed cell death protein 1 [PD-1]*) и ПД-Л1 чине осовину која је важан механизам имунске супресије код пацијената са сепсом, и то тако што индукује апоптозу лимфоцита и дисфункцију моноцита. На анималном моделу се показало да блокирање ове осовине, након индукције сепсе, побољшава преживљавање. Тај супресивни механизам може бити протективан за ткива у тешкој инфламацији. Са друге стране, тај процес је нежељен када неутрофили мигрирају у лимфне чворове јер тада могу инхибирати хуморалне имунске одговоре путем интеракције са Т и Б лимфоцитима.

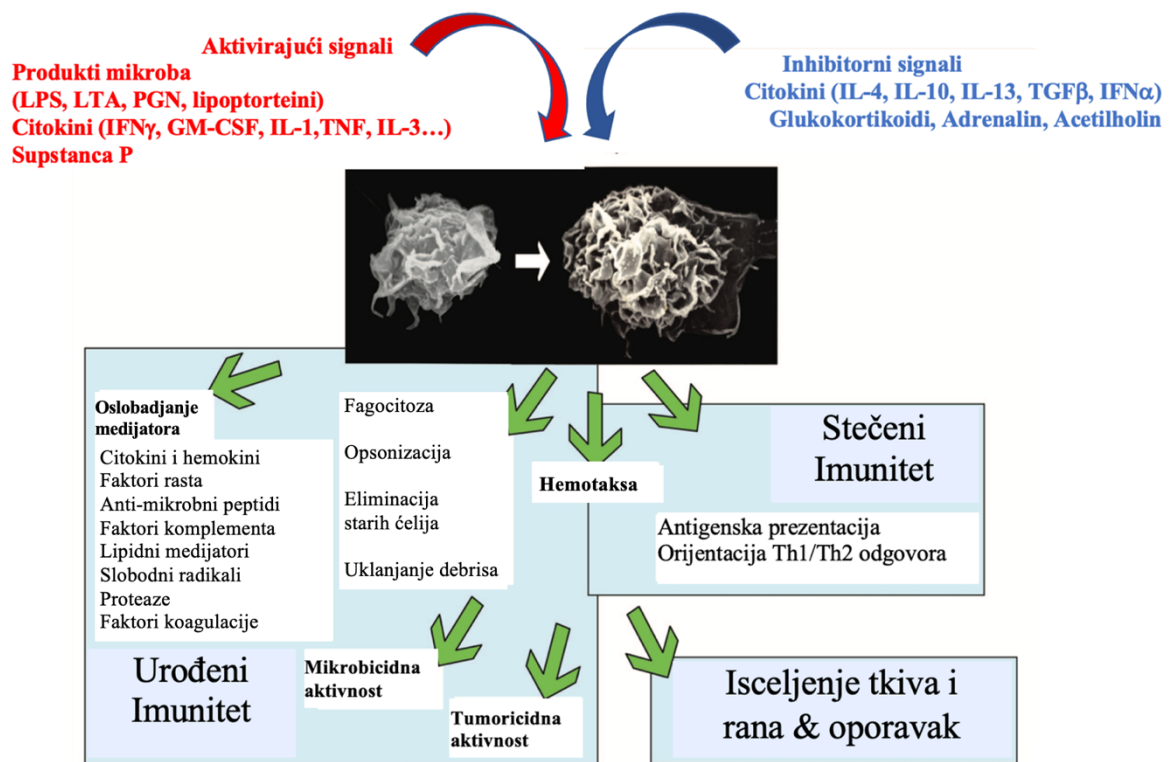
1.6. АКТИВАЦИОНИ СТАТУС МОНОЦИТА У ЦЕЛУЛАРНОМ ИМУНОИНФЛАМАТОРНОМ ОДГОВОРУ КОД КРИТИЧНООБОЛЕЛИХ СА СЕПСОМ

Моноцити су моноклеарни фагоцити у крвотоку. Када те ћелије адхерирају за ендотел крвног суда и мигрирају у ткива диферентују се у макрофаге, дендритичне ћелије или остеокласте. Моноцити представљају главне ефекторне ћелије урођеног имунског одговора због способности ингестије микроба и антимикробне активности, због тога што су главни извор инфламаторних медијатора и што, као антиген-презентујуће ћелије – АПЋ, доприносе стеченом имунском одговору (68). Воде порекло од мијелоидних прекурсора костне сржи где се диферентују из исте мијелоидне лозе као и гранулоцити. У костној сржи подлежу процесу диференцијације и сазревања преко промоноцита у зреле моноците, а под контролом хематопоетских фактора као што су фактор матичних ћелија, ИЛ-3 и фактор стимулације гранулоцитно-макрофагних колонија, након чега прелазе у периферну циркулацију где остају од једног до три дана. Морфолошки, моноцити су велике ћелије, дијаметра 10 - 18 микрона, изувијаног једра, са азурофилним гранулама у цитоплазми. Након адхеренције за ендотел крвног суда, првог до трећег дана живота у периферној циркулацији, моноцити мигрирају ка ткиву и тако се диферентују у макрофаге и дендритичне ћелије. Могу се пронаћи у свим телесним шупљинама и ткивима где имају задатак да уклањају апоптотичне ћелије органа.

Номенклатура моноклеарних фагоцита према експресији рецептора на површини ћелије је комплексна. По једној функционалној подели, прва субпопулација моноцита мигрира у инфламирања ткива. Друга субпопулација колонизује ткива у физиолошким условима и ствара резервоар резидентних макрофага који могу преживети месецима или годинама и стећи особине специфичне за ткиво у којем се налазе. Пример за то су Купферове ћелије у јетри, макрофаги у слезини, перитонеални макрофаги, алвеоларни макрофаги, у мозгу ћелије микроглије и перцити. За обе субпопулације моноцита, први корак у процесу миграције је специфична адхезија за луминалну ендотелну површину крвног суда путем адхезионих молекула. У условима хомеостазе та адхезија је контролисана $\beta 2$ интегрином, док је у инфламацији тај процес контролисан интерцелуларним адхезионим молекулима (*ICAM 1* и *2*), васкуларним ћелијским адхезионим молекулом 1 (*VCAM 1*), Л-селектином, веома касним антигеном 4 (*VLA4*) уз $\beta 2$ интегрин. Када се нађу у ткивном паренхиму, резидентни макрофаги испољавају различите шаблоне површинских маркера, као и различите функције; то је последица специфичне

микросредине и уклапа се у концепт хетерогености макрофага. У зависности од утицаја цитокина, макрофаги могу припадати подгрупи са класичном активацијом, означеној као М1, која је под утицајем интерферона- $(IFN)-\gamma$. Друга подгрупа макрофага, са алтернативном активацијом, означава се као М2 и њу регулишу ИЛ-4 ИЛ-13 или ИЛ-10. Сматра се да је ИФН- γ активатор макрофага, док су ИЛ-4, ИЛ-13 и ИЛ-10 деактиватори.

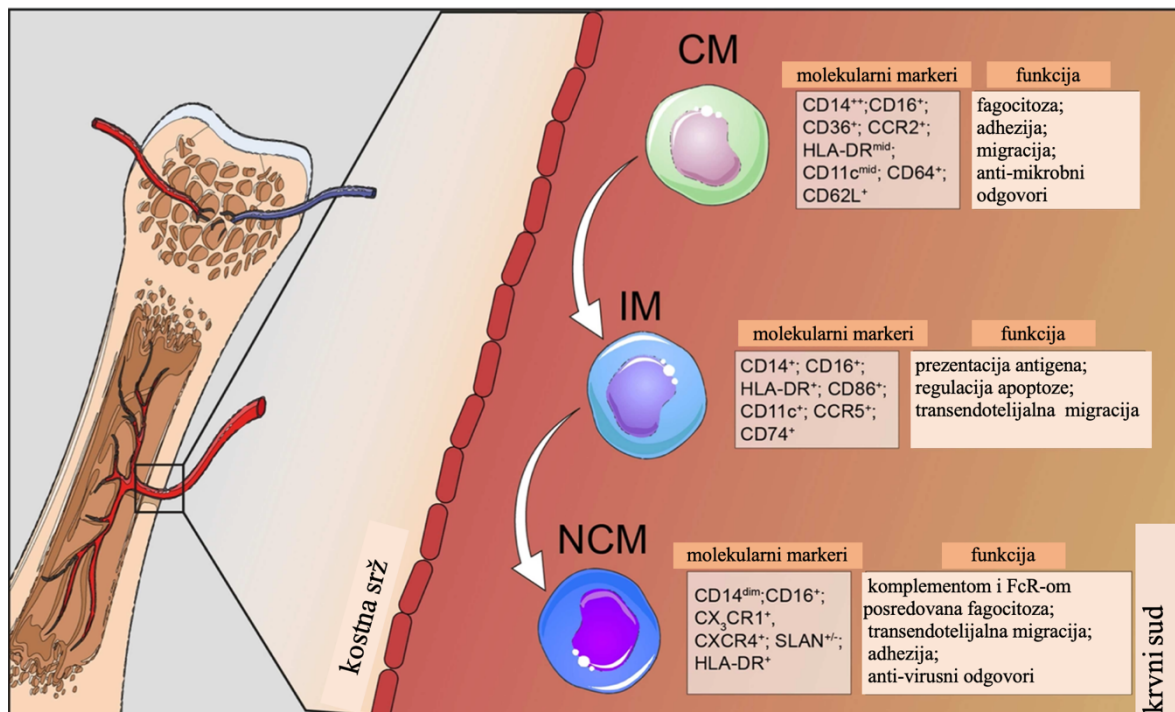
У физиолошким условима моноцити својом фагоцитном активношћу доприносе одржавању хомеостазе. Еритроцити имају животни век од 120 дана, након тога уклањају их резидентни макрофаги. Током инфекције, макрофаги могу прогутати микроорганизме у вакуоле које се називају фагозоми, а након ингестије патогена фузионишу се са већ формираним вакуолама које се називају лизозом. Инвадирајући патоген у фаголизозомима је изложен деструкцији различитим ензимским процесима. У сепси су продукти микроба потентни модулатори функције макрофага. Липополисахарид регулише неке гене у хуманим моноцитима, око 25% тих транскрипција кореспондира са продукцијом цитокина и хемокина. Модулација функције моноцита и макрофага различитим сигнаlima приказана је на слици 1.6.1.



Слика 1.6.1. Активирајући и инхибиторни сигнали модулирају функције моноцита и макрофага [модификовано и прилагођено према Cavaillon et al. (68)]

Постоје три субпопулације моноцита према експресији рецептора на површини ћелије. Најбројнији су класични моноцити (*classical monocytes - CM*) којих има 80%-90% у периферној крви. За њих је карактеристичан висок ниво експресије ЦД14 и одсуство ЦД16 (ЦД14⁺⁺ЦД16⁻). Другу субпопулацију чине „интермедијерни“ прелазни моноцити (*intermediate monocytes – IM*) код којих постоји висок ниво експресије ЦД14 уз експресију ЦД16 (ЦД14⁺⁺ЦД16⁺). Нормално их у циркулацији има мало али им се број значајно повећава са цитокинском стимулацијом и инфламацијом. Трећу субпопулацију неklasичних моноцита (*non-classical monocytes- NCM*) чине ћелије код којих на површини постоји смањена експресија ЦД14 а повећана експресија ЦД16 (ЦД14⁺ЦД16⁺⁺) и има их од 5%-10% од свих моноцита (69). Бројне су имунске улоге моноцита и макрофага. Обављају успешну фагоцитозу али и презентацију антигена на својој површини. Прогресивно, класични моноцити доводе до раста неklasичних моноцита преко интермедијерних моноцита. Субпопулација неklasичних моноцита се драстично повећава у тешкој сепси (70).

На слици 1.6.2. приказане су субпопулације моноцита са различитим молекуларним маркерима и функцијама.



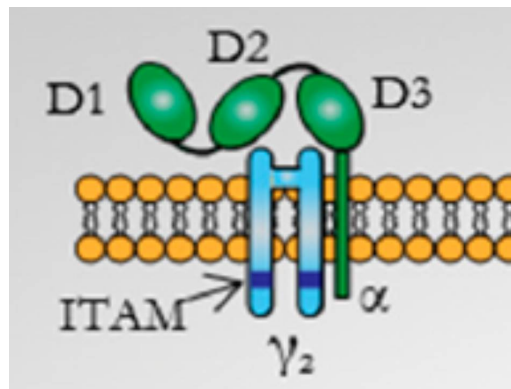
Слика 1.6.2. Субпопулације моноцита [модификовано и прилагођено према Capellos et al. (70)]

Истраживања су показала да класични моноцити имају изражену фагоцитну активност без инфламаторних својстава, док не класични моноцити испољавају, након цитокинске стимулације, инфламаторне карактеристике и антиген презентујућу активност; субпопулација прелазних (интермедијерних) моноцита има и фагоцитну и инфламаторну активност (71). Секвенцирањем РНК недавно је откривено да постоји још више подтипова моноцита, тачније 6 субпопулација дендритичних ћелија и 4 субпопулације моноцита (72). Јасно је да морфолошки сличне ћелије, које називамо моноцити, имају веома различите функције у имунском одговору. Истраживање динамике присуства субпопулација моноцита у периферној крви, у моменту настанка инфекције, показало је смањење броја периферних моноцита током ране фазе липополисахаридом индуковане акутне инфламације код људи (73). Овај губитак може настати због миграције моноцита из крви у ткива, где се диференцирају у макрофаге и дендритичне ћелије, или може бити резултат повећане маргинализације моноцита, који су уз зид крвног суда или се котрљају по његовој луминалној површини. Код све три субпопулације моноцита дошло је до смањења броја ћелија сат до два сата након инјекције липополисахарида и то за >95%. Ово смањење било је праћено повратком на почетне вредности, али са различитим временским оквиром за три субпопулације. Класични моноцити су се први опоравили (за 3 до 6 сати), праћени интермедијерним моноцитима (за 6 до 8 сати) и не класичним моноцитима (за 8 до 24 сата). У складу са тим, повећан број ћелија прво је регистрован у субпопулацији класичних моноцита (за 8 сати) а касније и у остале две субпопулације (за 24 сата). Детаљна анализа генске експресије у моноцитима пацијената током сепсе и након опоравка показала је пластицитет моноцита током ове болести (74). Функционално репрограмирање моноцита испољило се значајном усходном регулацијом проинфламаторних цитокина (ИЛ-1бета, ИЛ-6) и хемокина (*CCL3* и *CCL5*) током сепсе за разлику од периода након опоравка. Током сепсе НФ-кБ, као централни транскрипциони регулатор инфламаторног одговора, је био активан. У исто време, у моноцитима пацијената са сепсом дошло је до усходне регулације анти-инфламаторног цитокина ИЛ-10. Ови резултати стављају акценат на диверзитет функције моноцита током сепсе, на њихову кључну улогу у прогресији болести, са могућом поларизацијом од проинфламаторног у имуносупресивно стање.

Један од механизма имуносупресије у сепси је и поремећај функције моноцита, посебно макрофага. Ентитет познат као ендотоксинска толеранција настаје када је супримирана продукција проинфламаторних цитокина као што су ТНФ-алфа, ИЛ-1бета и ИЛ-6 од стране моноцита. Мерењем ендотоксином индуковане моноцитне активности утврђено је да је смањено стварање цитокина у моноцитима присутно у пацијената са постоперативном сепсом (29).

1.7. ЕКСПРЕСИЈА ЦД64 (*Cluster of Differentiation 64*) НА МОНОЦИТИМА И НЕУТРОФИЛИМА

ЦД64 (*Cluster of Differentiation - CD64*) је тип интегралног мембранског гликопротеина од 72 килоDalтона познатог као *Fc* рецептор који, са великим афинитетом, везује мономерна антитела ИгГ типа; припада великој имуноглобулинској суперфамилији. У широкој употреби је и термин *Fc- γ receptor 1 (Fc γ RI)*. Након везивања ИгГ антитела, ЦД64 ступа у интеракцију са помоћним ланцем, познатим као заједнички γ ланац, који поседује ИТАМ мотив (*immunoreceptor tyrosine-based activation motif - ИТАМ*), секвенцу од 4 аминокиселине, што је неопходно за започињање целуларне активације (76). Структурно, ЦД64 се састоји од сигналног пептида који омогућава његов транспорт до површине ћелије, три екстрацелуларна имуноглобулинска домена типа Ц2 који служе за везивање антитела, хидрофобни трансмембрански домен и кратки цитоплазматски реп што је приказано на слици 1.7.1.



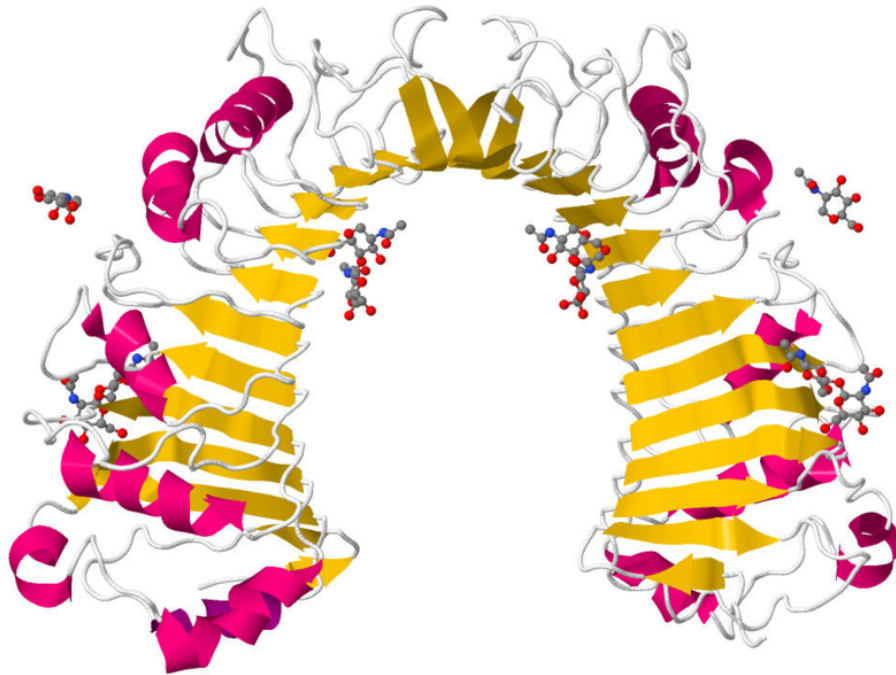
Слика 1.7.1. Структура ЦД64 [модификовано и прилагођено према Akinrinmade et al. (76)]

ЦД64 се конститутивно налази само на моноцитима и макрофагама. Његова конститутивна експресија на неутрофилима у стању мировања је занемарљива (1000 од 2000 по ћелији), па може послужити као дијагностички маркер инфекције када су неутрофили активирани јер се број онда може повећати и 10 пута у року од 4 до 6 сати. Интензитет експресије ЦД64 показује степен активације неутрофила и може корелирати са тежином и исходом код критично оболелих са секундарном сепсом (77 – 79). Неутрофилни ЦД64 индекс је тако дијагнозиран да је вредност < 1 код инактивисаних неутрофила, а > 1.5 код инфекције и сепсе. Потентни индуктори експресије ЦД64 на неутрофилима су цитокони, као на пример ИФН- γ , а тај ефекат може изазвати и фактор стимулације гранулоцитних колонија; једна од улога овог маркера је да посредује у

фагоцитози бактерија. Везивање неутрофила за бактерије је значајно амплификовано када су патогени обложени ИгГ антителима, та антитела су лиганди за ЦД64. У узорцима крви са антикоагулансом, експресија ЦД64 је стабилна на собној температури 36 сати, за разлику од лабилне експресије ЦД11б и других неутрофилних антигена.

1.8. ЕКСПРЕСИЈА ЦД14 (*Cluster of Differentiation 14*) НА МОНОЦИТИМА И НЕУТРОФИЛИМА

ЦД14 (*Cluster of Differentiation CD14*), гликопротеин од 55 килоDalтона, са мултиплим секвенцама богатим леуцином, је први пут идентификован на површини моноцита и макрофага 1982. године (80). ЦД14 је део рецепторског комплекса за препознавање шаблона (*PRR*) за различите лиганде, у распону од апоптотичних ћелија и гљивица до бактеријских продуката, делова зида микроба и чак и целих бактерија; пошто има улогу у детекцији ПАМП-ова, део је урођеног имунског одговора. ЦД14 постоји у две форме; једна је везана за ћелијску мембрану гликозил-фосфатидил-инозитолним репом (*glycosylphosphatidylinositol - GPI*), па се означава као мЦД14. Друга форма је солубилана, сЦД14, која настаје на најмање три начина: заобилажењем ГПИ додатка; цепањем ГПИ сидра фосфолипазом Д; или директним протеолитичким цепањем са површине ћелије. Кристална структура хуманог солубилног ЦД14 открива савијени соленоид са хидрофобним аминок-терминалним џепом (81). Структура ЦД14 приказана је на слици 1.8.1.



Слика 1.8.1. Структура ЦД14 [модификовано и прилагођено према Kim ЈI et al. (82)]

ЦД14, као што се види, има потковичасту структуру, са Н-терминалним хидрофобним цепом који обезбеђује место везивања амфипатског молекула ЛПС-а.

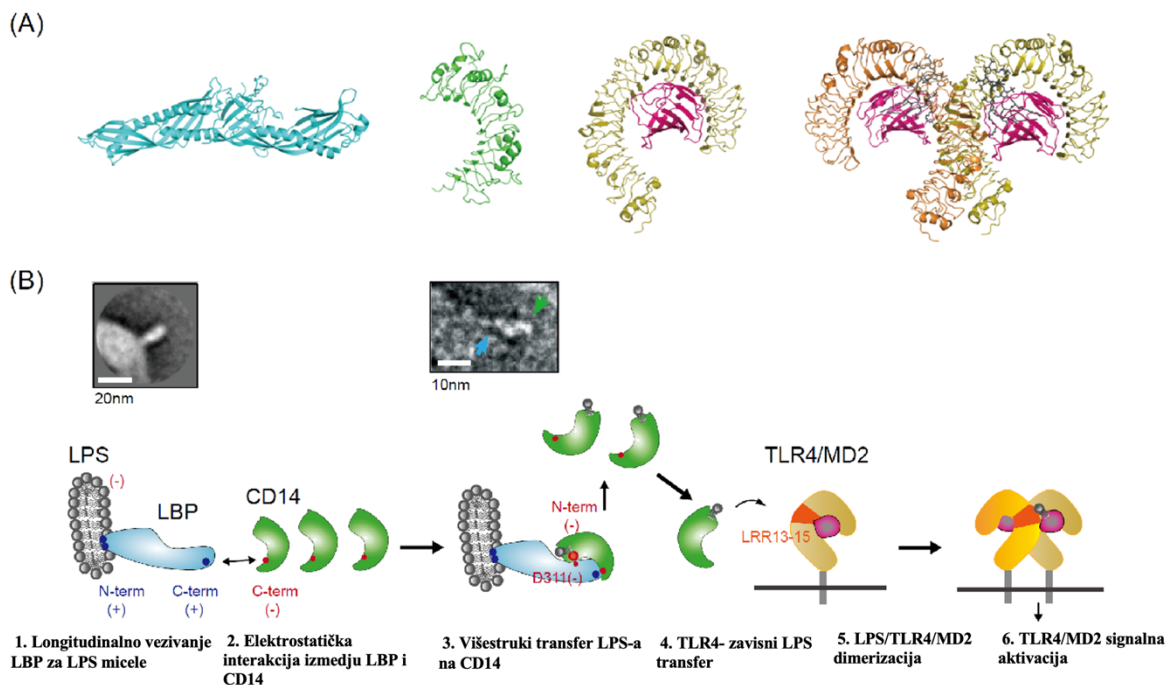
Овај маркер је експримиран на читавом низу ћелија, примарно на моноцитима, макрофагима и, у мањој мери, на неутрофилима. Солубилна форма се налази у различитим телесним течностима (серум, цереброспинална течност); довољне су ниске концентрације да обезбеде активирање ћелија које немају ендогени ЦД14 на својој површини; тако већина епителних и ендотелних ћелија може одговорити на липополисахарид Грам-негативних бактерија.

Међу 13 чланова ТЛР фамилије рецептора (*Toll-like receptors – TLR*), ТЛР-4 у комплексу са мијелоидним диференцијационим фактором 2 - МД2 (*Toll-like receptor (TLR)4–myeloid differentiation factor (MD) 2*) је главни сензор за детекцију липополисахарида – ЛПС-а, главне компоненте спољашње мембране Грам-негативних бактерија. ЛПС је велики, гликокоњуговани, амфипатски молекул, што значи да има и поларне и не-поларне делове: липид А је хидрофобни домен (ендотоксин, главни фактор вируленције); О-антиген је хидрофилна дистална олигосахридна секвенца која се понавља; језгро овог молекула чине хидрофилни полисахариди. Пошто ЛПС формира агрегате или мицеле у воденим растворима због својих хидрофобних

мулти-ацилних ланаца, трансфер једног молекула ЛПС-а до комплекса ТЛР4/МД2 чини једну од кључних карика у препознавању ПАМП-ова Грам-негативних бактерија. Помоћни протеини, медијатори сензитивног препознавања ЛПС-а, су: липополисахарид - везујући протеин (*lipopolysaccharide-binding protein - LBP*) и ЦД14. Помоћу ЛБП-а и ЦД14 могућ је ефикасан трансфер ЛПС-а до комплекса ТЛР4/МД2. Везивање ЛПС-а за комплекс ТЛР4/МД2 индукује димеризацију овог комплекса; то приближава цитосолне домене ТЛР4 па ова конформациона промена активира адапторне молекуле интрацелуларне сигналне каскаде.

ЛБП је солубилни протеин акутне фазе класе I, има елонгирану структуру са великим афинитетом за ЛПС. То је хумани серумски гликопротеин од 60 килоДалтона, производе га хепатоцити. Главна улога му је да катализује везивање ЛПС-а и ЦД14, ова реакција би без њега била веома спора. ЛБП презентује ЛПС молекулу ЦД14 тако што се веже за ЛПС; за узврат, ЦД14 или испоручује ЛПС површинском комплексу ТЛР4/МД2 или је медијатор ЛПС-ом индуковане ендцитозе ТЛР4 (83). Након везивања ЛПС-а, формира се димер комплекса ТЛР4/МД2/ЛПС у облику слова М.

Каскада трансфера ЛПС-а до комплекса ТЛР4/МД2 путем ЛБП-а и ЦД14 приказана је на слици 1.8.2.



Слика 1.8.2. Каскада трансфера ЛПС-а до комплекса ТЛР4/МД2 путем ЛБП-а и ЦД14

[модификовано и прилагођено према Kim SJ et al. (83)]

На слици 1.8.2. панел А приказује кристалне структуре ЛБП-а, ЦД14, комплекса ТЛР4/МД2 и комплекса ТЛР4/МД2/ЛПС. На панелу Б, горња лева слика приказује ЛБП везан за мицеле ЛПС-а; горња десна слика приказује комплекс ЛПС мицеле/ЛБП/ЦД14 (плава стрелица - ЛПС мицелама везан ЛБП, зелена стрелица – ЦД14). У доњем делу панела Б, шематски и секвенцијално је приказан транспорт ЛПС-а до комплекса ТЛР4/МД2.

Н-терминал ЛБП-а се везује за мицеле ЛПС-а; конкавна површина Ц-терминалног домена ЦД14 ступа у реакцију са Ц-терминалним врхом ЛБП-а да би ЦД14 добио један ЛПС молекул. ЦД14 везан за ЛПС брзо дисоцира од ЛБП-а процесом електростатичког одбијања (репулзије), то омогућава да се други молекули ЦД14 вежу за ЛБП. Интеракција између ЛБП и ЦД14 је пролазна, траје само неколико стотина милисекунди, и посредована је електростатичком интеракцијом између базног дела Ц-терминалног домена ЛБП-а и киселог дела конкавне површине Ц-терминалних домена ЦД14. Ова пролазна интеракција ће се десити само у присуству ЛПС-а и есенцијална је за његов трансфер. ЦД14 брзо дисоцира од ЛБП/ЛПС комплекса, након примања једног ЛПС молекула. Након брзе дисоцијације ЦД14/ЛПС, која је посредована електростатичком репулзијом између ЛБП и ЦД14, ЛБП се везује за ЛПС мицеле и регрутује други молекули ЦД14. У међувремену, ЦД14 испоручује један ЛПС молекул ко-рецептору МД2 на ТЛР4-завистан начин. Главни акцептор ЛПС-а је ко-рецептор МД2 од 25 килоDalтона, који је физички повезан са ТЛР4. Везивање ЛПС-а за ТЛР4/МД2 комплекс олакшава димеризацију, што за резултат има формирање хомодимерног рецепторског сигналног комплекса који се састоји од два мономера ТЛР4, два МД2 протеина и два молекула ЛПС-а. Целуларна сигнална каскада олакшана је интрацелуларним сигналним доменима ТЛР4 који, након димеризације, стварају платформу за интрацелуларне сигналне адапторе.

Пролазна природа интеракције између, ТЛР4/МД2, ЛБП-а, ЦД14 и ЛПС-а је предност у развијању брзог имунског одговора (83). Такође, ЦД14 и ЛБП могу радити заједно на опсонизацији целе бактерије и апоптотичне ћелије, чиме се разрешава инфекција и смањује инфламација. Осим тога, ЦД14 појачава целуларне инфламаторне одговоре на читав низ ацилираних бактеријских агониста за ТЛР2, као што су липотеихоична киселина, пептидогликан, атипичне форме ЛПС-а и липопротеини (81). Као и код других компоненти имунског система, на функцију ЦД14 утичу и генски полиморфизми, одговорни за интер- и интраиндивидуалне разлике (84).

1.9. ЕКСПРЕСИЈА ПД-Л1 (*Programmed cell death-ligand 1-PD-L1; Cluster of Differentiation 274*) НА МОНОЦИТИМА И НЕУТРОФИЛИМА

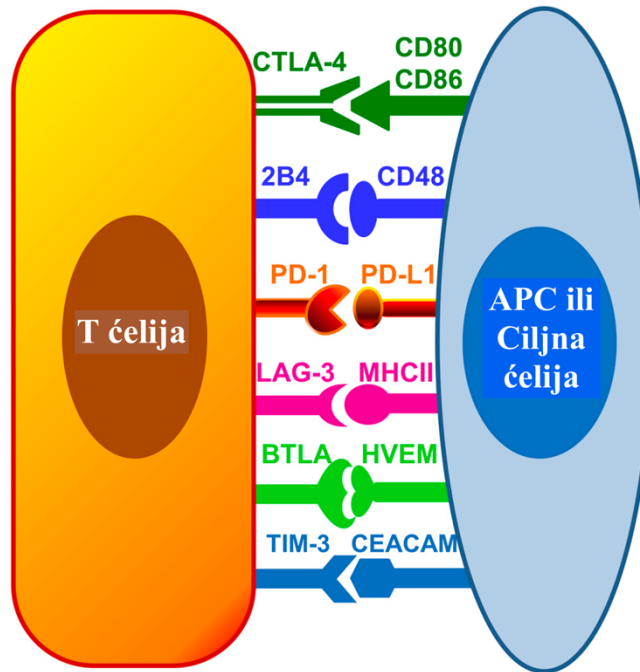
ПД-Л1 је сада познат као део програмиране смрти ћелија (*Programmed cell Death-1 [PD-1]/Programmed cell death-ligand 1 [PD-L1]*); то је лиганд 1 за рецептор програмиране смрти ћелије ПД-1.

ПД-1 (ЦД279) први је описао Ишида (*Ishida*) са сарадницима 1992. године. То је мембрански протеин типа I, који се састоји од 268 аминокиселина. Овај рецептор на површини ћелије је члан проширене ЦД28 фамилије, са експресијом на различитим имунокомпетентним ћелијама. Структурно, састоји се од екстрацелуларног домена који припада суперфамилији имуноглобулина ИгВ (*IgV – Variable – V type*); трансмембранског дела и интрацелуларног репа. Активирани ПД-1 рецептор генерише снажан анти-инфламаторни сигнал, што је откривено 1999. године (85).

ПД-Л1, такође познат и као ЦД274 или Б7 хомолог 1 (*B7 homolog 1 – B7-H1*), је трансмембрански протеин типа I, од 40 килоDalтона са снажним имуносупресивним својствима. ПД-1/ПД-Л1 формира ко-инхибиторни систем и сматра се имунским контролним (*checkpoint*) молекулом. Идентификовао га је Донг (*Dong*) са сарадницима 1999. године. Овај сигнални пут је веома значајан у имуносупресији код пацијената са сепсом; представља један од кључних негативних регулатора имунског одговора. Инхибиторна имунска контролна интеракција често доводи до феномена познатог као исцрпљивање Т-ћелија.

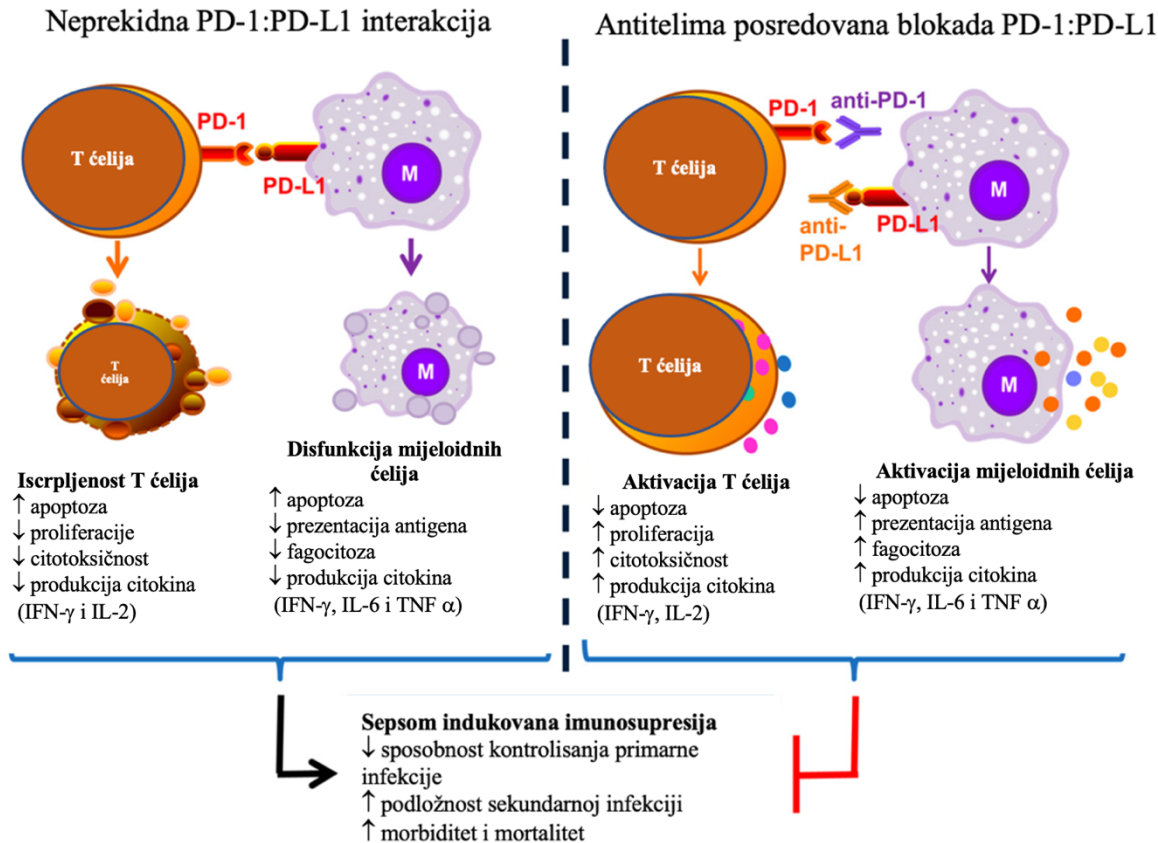
Експресија ПД-Л1 постоји на бројним хематопетским и нехематопетским ћелијама. Такође се може наћи и на паренхималним ћелијама различитих органа, као што су срце, плућа, јетра, панкреас, бубрег и плацента. ПД-Л1 игра главну улогу у сигналном путу ПД-1/ПД-Л1, због испољавања снажних инхибиторних ефеката, док се ПД-1 сматра помоћним делом овог процеса (86).

На слици 1.9.1. приказане су интеракције међу познатим инхибиторним контролним молекулима на Т-ћелијама и антиген-презентујућим ћелијама односно циљним ћелијама као што су, на пример, епителне ћелије ткива. Та интеракција инхибира функцију леукоцита и може довести до имунске дисфункције.



Слика 1.9.1. Инхибиторни имунски контролни молекули на имунским ћелијама (*PD-1 = Programmed death-1; PD-L1 = Programmed death ligand-1; CTLA-4 = Cytotoxic T lymphocyte antigen-4; BTLA = B and T lymphocyte attenuator; HVEM = Herpes virus entry mediator; TIM-3 = T cell membrane protein-3; LAG-3 = Lymphocyte activation-gene-3; CEACAM = carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule; MHC II = Major histocompatibility complex II*) [модификовано и прилагођено према Patil et al. (86)]

Непрекидна интеракција ПД-1/ПД-Л1 током сепсе доводи до имунске дисфункције, док инхибиција те интеракције доводи до реверзије имуносупресије у сепси и побољшава резистенцу организма на инфекцију што је приказано на слици 1.9.2.



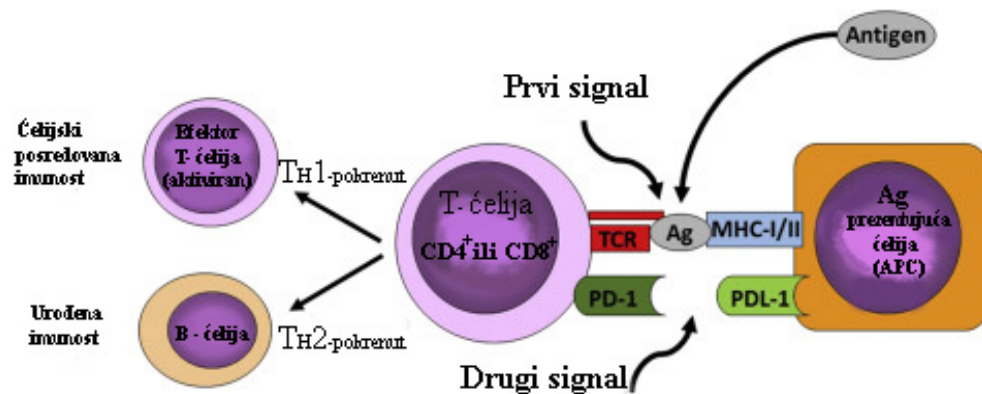
Слика 1.9.2. Последице непрекидне ПД-1/ПД-Л1 интеракције и блокаде овог процеса антителима [модификовано и прилагођено према Patil et al. (86)]

ПД-1/ПД-Л1 интеракција доводи до оштећења функције Т-ћелија које испољавају феномен исцрпљивања. Такође, долази и до мијелоидне дисфункције која се односи на антиген-презентујуће ћелије. Када антитела блокирају сваки од тих инхибиторних молекула, може доћи до реверзије сепсом индуковане имunosупресије и до смањења морбидитета и морталитета код критично оболелих са сепсом.

У одговору на септички инсулт, долази до снажне имунске активације јер организам покушава да стави под контролу извор инфекције. Резултат тако екстремне имунске активације је мултифакторијална дисхармонија имунских ћелија. Распад имунске хомеостазе резултира инфлуksom циркулишућих имунских ћелија у дисталне органе, што доводи до синдрома мултипле органске дисфункције.

Неопходан баланс између активације и супресије посредован је имунским контролним регулаторима. Ти регулатори су укључени у имунски дисбаланс у различитим ситуацијама, укључујући и сепсу. Контролни регулатори су мембрански везани протеини који служе као

неопходан други сигнал да усмере имунски одговор ка одређеном антигену (87). Када је присутан антиген, он је везан МХЦ рецепторима класе I или II (*Major Histocompatibility Complex (MHC) Class I and MHC Class II Proteins*) на површини антиген-предентујуће ћелије; ти протеини обезбеђују конформациони пластицитет у презентацији антигена. Презентација антигена помоћу МХЦ протеина је кључна за стечени имунски одговор (88). Тако антиген-предентујућа ћелија презентује антиген Т-ћелијском рецептору (*T-cell Receptor*). Након тога, други сигнал, који шаље контролни регулатор, је неопходан да усмери Т-ћелију како да одговори на презентовани антиген. Један од кључних контролних регулатора је систем ПД-1/ПД-Л1. Стимулаторни сигнали од регулатора могу довести до активације ћелијске и хуморалне имуности; док инхибиторни сигнали могу довести до анергије Т-ћелија, које онда нису способне да одговоре на друге сигнале. На слици 1.9.3. приказан је ПД-1/ПД-Л1 систем контролних регулатора који обезбеђује неопходан други сигнал за имунски одговор.



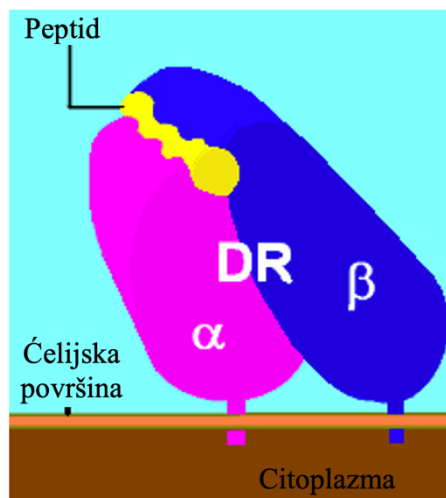
Слика 1.9.3. Контролни регулатори ПД-1/ПД-Л1 обезбеђују неопходни други сигнал за имунске одговоре [модификовано и прилагођено према Wakeley et al. (87)]

1.10. ЕКСПРЕСИЈА ХЛА-ДР (Human Leukocyte Antigen – D Related isotype) НА МОНОЦИТИМА – мХЛА-ДР

Бројне су имунске функције моноцита и макрофага. Поред обављања успешне фагоцитозе, они презентују антигене на својој површини. Активност моноцита је је, између осталог, регулисана експресијом површинских рецептора. Експресија ХЛА-ДР (*Human Leukocyte Antigen – D related isotype*) на моноцитима –мХЛА-ДР је кључна за повезивање урођеног и стеченог

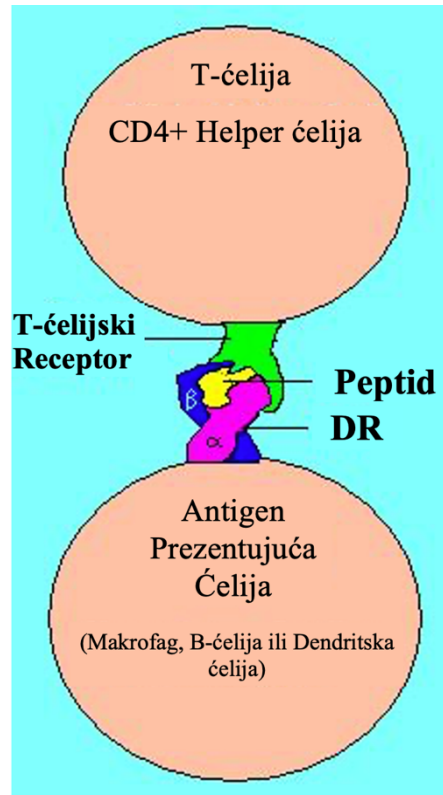
имунског одговора. Моноцити представљају једну од кључних ћелијских линија у сепси. ХЛА-ДР припада класи II

МХЦ (*Major histocompatibility complex – MHC*) ћелијских површинских протеинских рецептора који су кодирани хуманим леукоцитним антигенским комплексом на хромозому 6. Његова експресија присутна је на моноцитима/макрофагима, дендритским ћелијама и Б ћелијама. Алфа и бета ланац ХЛА-ДР, заједно са пептидом, дужине између 9 и 30 аминокиселина, чине лиганд за Т-ћелијски рецептор (*TCR*). На слици 1.10.1. приказан је ХЛА-ДР рецептор.



Слика 1.10.1. Илустрација ХЛА-ДР рецептора (α ланац – љубичасто, β ланац – плаво и везани пептид – жуто; пептид заузима пукотину за везивање) [модификовано и прилагођено према Deitiker P.; јавни домен]

Презентација антигена од стране мХЛА-ДР комплекса Т-ћелијском рецептору приказана је на слици 1.10.2.



Слика 1.10.2. Презентација антигена: интеракција ХЛА-ДР и Т-ћелијског рецптора [модификовано и прилагођено према Deitiker P.; јавни домен]

У стању имуносупресије индуковане сепсом, моноцити пролазе кроз изражене промене фагоцитне активности, цитокинског профила ка Тх2 анти-инфламаторном фенотипу а нарочито је значајно смањење експресије молекула ХЛА-ДР површини моноцита (мХЛА-ДР). Пошто експресија ХЛА-ДР корелира са имунским одговором у смислу активације ћелије и презентације антигена, смањена експресија мХЛА-ДР би могла рефлектовати деактивацију моноцита код критично оболелих са сепсом и бити независно повезана са појавом нозокомијалних инфекција и смртним исходом (89, 90). Овај индикатор функције моноцита и имуносупресије у послење време постао је веома значајан код пацијената са тешком траумом, коју прати пролазна имуносупресија, у циљу детектовања имунског статуса и вероватноће развоја секундарних инфекција (91). Моноцити пацијаната у сепси показују смањену експресију ХЛА-ДР антигена и тиме доприносе повећању инциденце нозокомијалних инфекција. Дакле, смањена експресија ХЛА-ДР антигена на моноцитима корелира са анти-инфламаторним одговором у пацијената са септичким шоком; снижена вредност експресије ХЛА-ДР антигена у директној је вези са повећањем морталитета у ових пацијената (29, 69).

Перзистентност и магнитуда мХЛА-ДР експресије представља глобални маркер имунске функције. Она може бити редукована дејством неких лекова, као што су кортикостероиди и катехоламини. Многи фактори утичу на ту кључну везу између урођеног и стеченог имунитета; интеракција између моноцита и Т-ћелија се често колоквијално назива „имолошка синапса“ (92).

1.11. ИНДЕКС ДИВЕРГЕНЦИЈЕ НЕУТРОФИЛА – ИДН КОД КРИТИЧНО ОБОЛЕЛИХ СА СЕПСОМ

Рана дијагноза, и следствена адекватна примена терапијских и супортивних мера, има кључну улогу у побољшању исхода критично оболелих пацијената са сепсом. Са тим циљем, поред бројних биомаркера, у дијагностичке и прогностичке сврхе истраживали су се и садржај незрелих гранулоцита и делта неутрофилни индекс у периферној крви (93, 94) Ипак, недовољна дијагностичка поузданост, висока цена као и недовољно клиничких информација у вези појединих биомаркера, пре свега везаних за гранулоцитну популацију, отежавају њихову примену у свакодневной клиничкој пракси и отварају питање истраживања нових биомаркера. Различита технолошка побољшања хематолошких анализатора нове генерације омогућавају анализу додатних параметара у оквиру рутинског одређивања комплетне крвне слике, базираних на карактеристикама расипања светлости од стране основних леукоцитних популација – неутрофила, моноцита и лимфоцита. Различите информације добијене на овај начин (величина ћелије, унутрашња комплексност, ширина дистрибуције популације итд.) обухваћене су заједничким називом – подаци о ћелијској популацији (*CPD – Cell Population Data*) и њихов клинички значај у бројним болестима, укључујући и критично оболеле са сепсом, активно се истражује (95).

У нашем истраживању, између осталог фокусирали смо се и на промене у карактеристикама расипања светлости гранулоцитне/неутрофилне популације на предњем и бочном детектору током цитофлуориметријских анализа. Наизменично користимо термине гранулоцити и неутрофили. Унутар популације гранулоцита/неутрофила, детектоване су две субпопулације које су се разликовале према сигналима на предњем и бочном детектору: субпопулација са нижим вредностима на бочном и вишим вредностима на предњем детектору (претпостављено неактивирана субпопулација) и субпопулација са вишим вредностима на бочном и нижим вредностима на предњем детектору (претпостављено активирана

субпопулација). Ове разлике у расипању светлости довеле су до раздвајања и померања дела гранулоцитне/неутрофилне популације на *SS-FS* тачкастом дијаграму (*SS* – *Side Scatter*, бочни детектор, *FS* – *Forward Scatter*, предњи детектор) које смо означили као дивергенција неутрофила. Процентуални удео обе субпопулације унутар гранулоцитне/неутрофилне популације је забележен а њихов међусобни однос представљен је индексом дивергенције неутрофила (ИДН), срачунатим дељењем релативног удела неактивираних субпопулације са релативним уделом активираних субпопулације. Дакле, ИДН је добијен дељењем релативног удела субпопулације са нижим *SS* и вишим *FS* са релативним уделом субпопулације са вишим *SS* и нижим *FS* сигналима.

1.12. ИМУНОПАТОГЕНЕЗА КОВИД-19

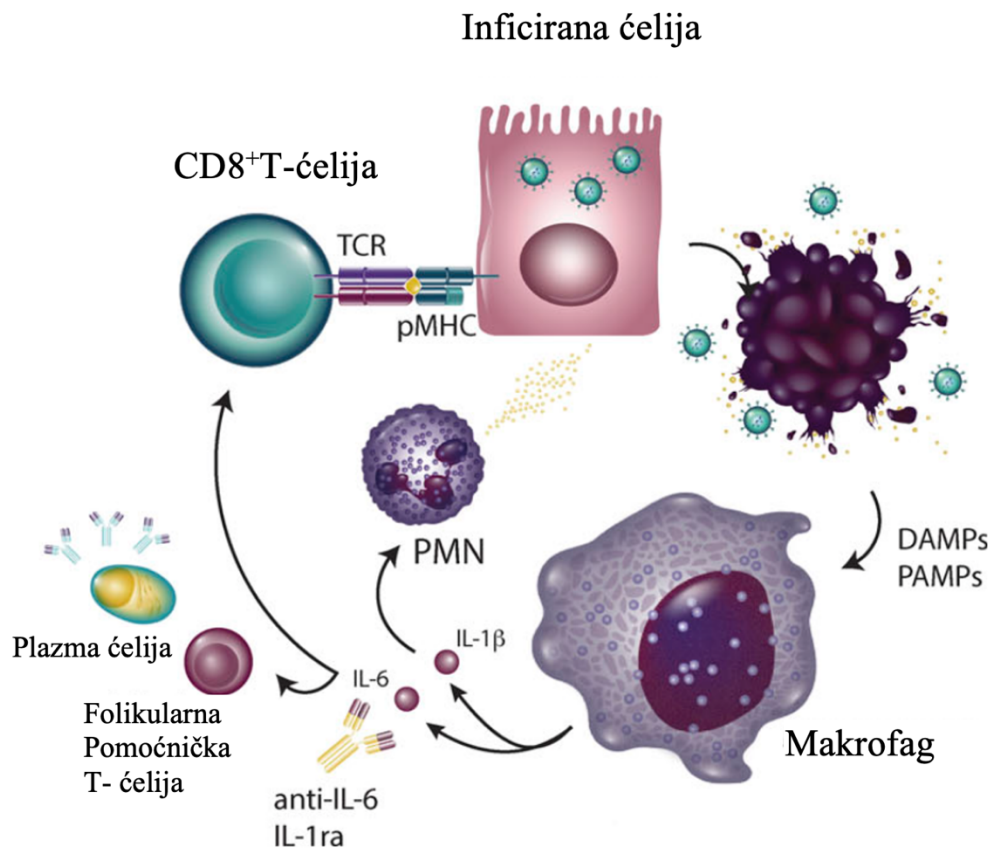
Имунски одговор у сепси се карактерише истовременим експесивним инфламаторним, катаболичким, метаболичким и имуносупресивним одговорима; када се не може поновно успоставити хомеостаза, тада пацијент болује од хроничне критичне болести. Прогресија сепсе може довести до синдрома перзистентне инфламације, имуносупресије и катаболизма – ПИКС-а (*persistent inflammation, immunosuppression and catabolism syndrome – PICS*) (96). Овај синдром се може бити индукован и тешким, не-инфективним инсултом, као што је траума. Сепса је веома хетероген синдром, велики клинички проблем је стратификовати пацијенте у хомогеније подгрупе а у циљу успешније терапије (97); кључно је идентификовати пацијенте који би имали користи од специфичне терапијске интервенције, дакле применити индивидуални приступ у оквиру прихваћених алгоритама.

У децембру 2019. године у Кини, избила је епидемија вируса *SARS-CoV-2* (*Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2*), који је узрочни патоген болести КОВИД-19 (*Coronavirus disease 19 – COVID-19*). Након брзог ширења, Светска здравствена организација је објавила статус пандемије 11.03.2020. То је пета пандемија у 21. веку, а трећа епидемија коронавируса, након *SARS-CoV* из 2002. године и *MERS-CoV* (*Middle East Respiratory Syndrome coronavirus*) из 2012. године.

САРС-КоВ-2 припада фамилији *Coronaviridae* и проузрокује акутну респираторну инфекцију и гастроентеритис. У питању је једноланчани РНК вирус са највећим геномом међу РНК вирусима, дужине 29903 нуклеотида. Површину вируса обавијају протеини налик на круну, чији шиљци индукују имунски одговор. Као и друга два поменути корона вируса, САРС-КоВ-2

користи *ACE2* (*angiotensin-converting enzyme 2*) рецептор да уђе у циљну ћелију. Комплексан имунски одговор код критично оболелих са сепсом доспео је у неочекивани фокус појавом ове девастирајуће пандемије јер се тешке форме КОВИД-19, које угрожавају живот, могу сматрати специфичном вирусном сепсом са МОДС-ом. На почетку пандемије, сматрало се да тешке форме КОВИД-19 изазива системска хиперинфламација односно тзв. „цитокинска олуја“. Хиперцитокинемија се сматрала одговорном за брзо клиничко погоршање и висок ризик од моралитета код тешких форми КОВИД-19 (98). У различитим истраживањима утврђено је да постоје повећани нивои различитих проинфламаторних и анти-инфламаторних цитокина (ТНФ- α , ИЛ-10 и други) у крви пацијената са тежим формама болести, као и да су ти нивои већи ако је пацијентима било потребно лечење у јединицама интензивне медицине (99). Такође се показало да су вредности ИЛ-6 биле веће код умрлих, што би указивало да је морталитет повезан са цитокинском олујом коју је активирао вирус (100). Неки аутори су сматрали да је цитокинска олуја у КОВИД-19 резултат неуспешног уклањања вируса од стране имунског система. Они су предложили две фазе цитокинске олује. Прва фаза би се односила на привремено имунодефицијентно стање; друга фаза на компензаторни хиперактивни имунски одговор због неуспешног уклањања вируса, та фаза би се клинички манифестовала као цитокинска олуја (101, 102). Истраживањем утицаја коронавируса на цитокине на ћелијским културама и анималним моделима, утврђено је да постоји одложена секреција интерферона (ИФН) типа I и III, укључујући ИФН- α и ИФН- β , у раној фази инфекције, док у каснијим фазама постоји ексцесивна секреција проинфламаторних цитокина (ИЛ-6, ИЛ-1 β) од стране моноцита/макрофага (103). Клиничка терпијска блокада ИЛ-6 моноклонским антителима као што су тоцилизумаб или силтуксимаб код пацијената са КОВИД-19 дала је мешовите резултате (104). Неопходно је утврдити најбоље време примене ове терапије код пажљиво одабраних кандидата. Активација макрофага се одвија као примарни одговор на вирусну инфекцију. Слабљење урођеног имунског одговора, у овој ситуацији, ће ублажити колатералну токсичност али може омогућити дисеминацију вируса у одсуству алтернативног извора контроле вируса. Док су многи аспекти урођеног имунског одговора потенцијално активирани (индукција синтезе ТНФ- α , ИЛ-1 β , ИЛ-6) код пацијената са КОВИД-19, већ је наведено да су ИФН одговори типа I и III пригушени (103). То сугерише да би неке аспекте урођеног имунског одговора у овој болести требало пажљиво амплификовати; на пример, инсуфицијентна активација ИФН одговора типа I и III представља кључни елемент неуспешне контроле присуства вируса од стране урођеног имунског система.

Блокада функције макрофага може пореметити и урођену и стечену имунску контролу вируса, што је приказано на слици 1.12.1.



Слика 1.12.1. Блокада функције макрофага може оштетити контролу вируса и урођеним и стеченим имунским одговором [модификовано и прилагођено према Vardhana et al. (104)]

Код пацијената, код којих се респираторна дисфункција развије касније током хоспитализације, негативне последице текуће урођене имунске активације оправдавају примену блокаде ИЛ-6. Међутим, тешка лимфопенија, исцрпљеност Т-ћелија и последична адаптивна имуносупресија су такође присутне код тих пацијената, па им се стање може погоршати ако се примене моноклонска антитела за блокаду елемената урођеног имунског одговора.

Једна имунска анализа показала је да код пацијената са КОВИД-19 постоји значајно оштећен ИНФ одговор типа I, што је обухватало и ниске нивое активности ИФН као и нисходну регулацију гена стимулираних са ИФН, а све то уз хиперинфламаторни одговор цитокина ИЛ-6 и ТНФ- α (105). Типичан налаз код КОВИД-19 пацијената је леукоцитопенија, нарочито лимфопенија, са предпоставком да се Т-ћелије брзо редистрибуирају у секундарне лимфоидне органе, као што су слезина и лимфни чворови, где остају заробљене са смањеним мобилитетом

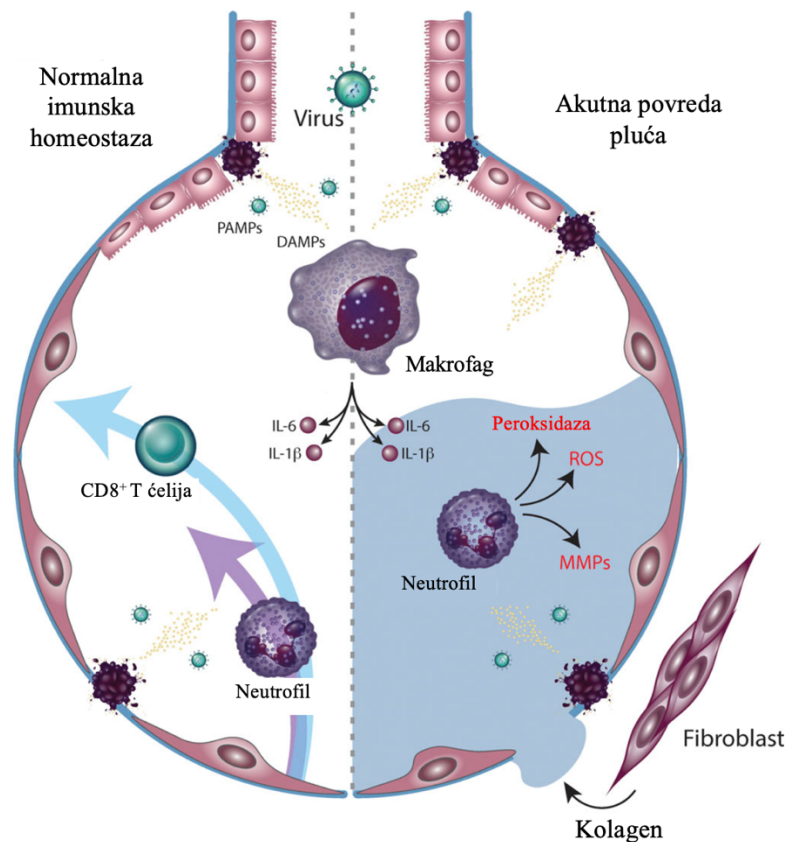
(106). Као рани дијагностички маркер цитокинске олује се издвојила хиперферитинемија, уз чињеницу да се феритин може рутински мерити (98, 107).

Први корак у инфекцији је везивање вируса за ћелију домаћина путем рецептора. Искуства са САРС-КоВ су показала да су циљне ћелије за овај тип вируса примарно епителне ћелије дисајних путева, алвеоларне епителне ћелије, васкуларне ендотелне ћелије као и макрофаги у плућима. Заједничко свим тим ћелијама је експресија *ACE2* рецептора, који користи и САРС-КоВ-2. Када овај вирус инфицира ћелију, његова активна репликација и ослобађање доводи до смрти ћелије путем пироптозе и ослобађања ДАМП-ова; те молекулске шаблоне препознају суседне епителне ћелије, ендотелне ћелије и алвеоларни макрофаги што генерише синтезу проинфламаторних цитокина и хемокина (108). САРС-КоВ инфекција редукује *ACE2* експресију у плућима. Због тога што је губитак плућне *ACE2* функције повезан са акутним оштећењем плућа, вирусом индукована нисходна регулација овог рецептора може бити битна за патогенезу болести. *ACE2* је битан у регулацији ренин-ангиотензин система (РАС). Због тога, вирусна инфекција може да резултира дисфункцијом система ренин-ангиотензин, што утиче на крвни притисак и баланс течности и електролита, а појачава инфламацију и васкуларну пермеабилност у дисајним путевима. Код КОВИД-19 су се показале разлике у стопи морталитета између мушкараца и жена. Једно од објашњења за нижу смртност код жена могла би бити чињеница да је *ACE2* лоциран на X хромозому; можда постоје алели који испољавају резистенцу на КОВИД-19.

Дакле, цитопатски вируси, укључујући и САРС-КоВ-2, индукују смрт инфицираних ћелија и оштећење ткива током циклуса репликације вируса. Вирусна инфекција и репликација у епителним ћелијама дисајних путева доводи до њихове изражене пироптозе, када су захваћене алвеоларне ћелије долази до тешког оштећења плућа. Пироптоза се карактерише формирањем пора на плазма мембрани ћелије, што омогућава патолошки флуks јона који коначно резултира лизом ћелије и ослобађањем инфламаторног интрацелуларног садржаја. Дакле, пироптоза је веома инфламаторна форма програмиране смрти ћелија која се често види код инфекција изазваних цитопатским вирусима; повезана је са оштећењем ендотела и васкуларним цурењем; вероватно је окидач последичног инфламаторног одговора. Повећани циркулаторни нивои лактат-дехидрогеназе су маркер пироптозе. Имушке ћелије се регрутују из крви у плућно ткиво, лимфоцити инфилтрирају дисајне путеве; то би могло објаснити лимфопенију која се детектује код око 80% пацијената са КОВИД-19. САРС-КоВ-2 инфицира и друге циљне ћелије, па је детектован у Т лимфоцитима, макрофагима и дендритичним ћелијама. Директно вирусно убијање лимфоцита може допринети лимфопенији код пацијената. Поред тога, вирусна

инфекција имунских ћелија, као што су моноцити и макрофаги, може резултирати аберантном продукцијом цитокина док ћелије не подлегну пироптози.

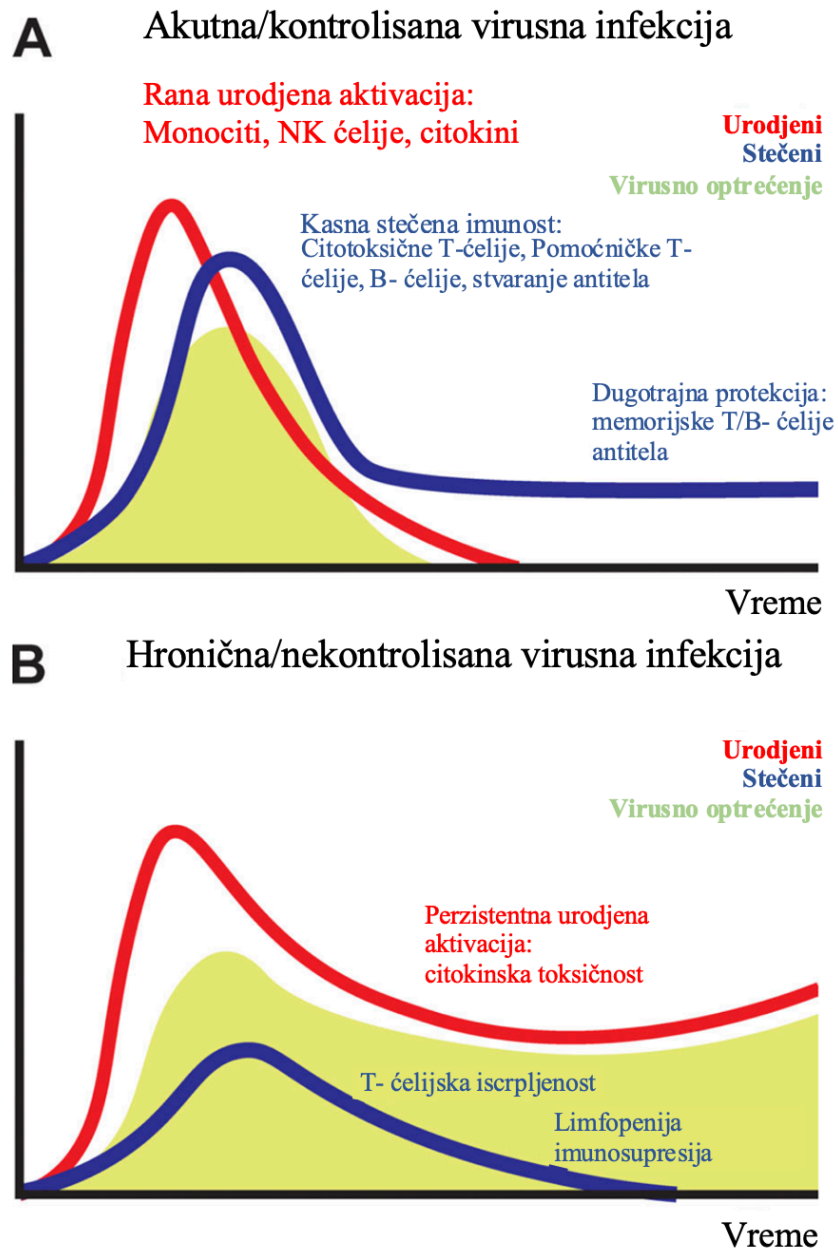
Вирусом индуковани ДАМП-ови и ПАМП-ови активирају ткивне-резидентне макрофаге. Инфламаторна каскада, коју иницирају макрофаги, доприноси и контроли вируса и оштећењу ткива. Продукција интерферона типа I и III поспешује интрацелуларну антивирусну одбрану у суседним епителним ћелијама, што миже лимитирати дисеминацију вируса, док ослобађање ИЛ-6 и ИЛ-1 β поспешује регрутовање неутрофила и цитотоксичних Т-ћелија (104). Тај процес може контролисати умножавање вируса али такође и оштетити ткиво, што је на примеру алвеола приказано на слици 1.12.2. Резултат оштећења алвеола је њихово испуњавање течношћу богатом имунским ћелијама и њиховим продукцијом, што веома ремети размену гасова; након тога наступа фиброза ткива.



Слика 1.12.2. Урођена имунска регулација антивирусне одбране (лево) и оштећење алвеоларног ткива (десно); ММПс – матриксне металопротеиназе [модификовано и прилагођено према Vardhana et al. (104)]

Познато је да су Т-ћелије директно цитотоксичне и ослобађају цитокине, па тако доприносе инфламацији ткива и могу повећати морталитет током тешких вирусних инфекција.

Способност Т-ћелијског одговора да проузрокује оштећење ткива објашњава значај ендогених инхибиторних имунорецептора, односно имунских контролних молекула, у лимитирању тог одговора. Након уклањања вируса, већина вирус-специфичних Т-ћелија подлеже процесу апоптозе; међутим ретенција популације вирус-специфичних меморијских Т-ћелија је неопходна за дугорочни антивирусни имунитет. То се дешава код акутне/контролисане вирусне инфекције, када рани урођени и стечени имунски одговор доводи до супресије вируса што је праћено дугорочним адаптивним имунитетом. То је шематски приказано на панелу А слике 1.12.3. Панел Б приказује хроничну/неконтролисану вирусну инфекцију, која се карактерише перзистентном антигенском активацијом Т-ћелија, што коначно доводи до њиховог исцрпљивања, када Т-ћелије губе реактивност. Ово стање је често праћено лимфопенијом. Истовремено, присуство вируса је окидач за активацију урођеног имунског одговора што резултује инфламацијом.



Слика 1.12.3. Поремећај имунског одговора код неконтролисане вирусне инфекције

[модификовано и прилагођено према Vardhana et al. (104)]

КОВИД-19 инфекција се често манифестује као субакутна, тај шаблон прогресије указује на могућност да имunosупресија, и због деплеције и због исцрпљивања Т-ћелија, доприноси перзистентном вирусном оптерећењу и морталитету. Прогресивна лимфопенија прати погоршање клиничке слике, док до повећања броја лимфоцита може доћи непосредно пре клиничког опоравка. И код резидентних Т-ћелија у плућима и код циркулишућих Т-ћелија у

КОВИД-19 инфекцији, долази до појачане експресије маркера Т-ћелијског исцрпљивања као што је ПД-1. Улога стеченог имунитета у супримирању вирусне дисеминације у КОВИД-19 може објаснити повезаност тежине ове инфекције са старошћу пацијената. Слабљење стеченог имунитета код старијих, познато као имуносенесценца, карактерише се губитком Т-ћелијског клоналног диверзитета, па је код њих значајно чешћа тежа клиничка слика КОВИД-19.

Постоје упадљиве сличности између пацијената са КОВИД-19 и оних са сепсом (109). Сепса је по живот опасна дисфункција органа, која је резултат нерегулисаног одговора домаћина на инфекцију и поремећене имунске хомеостазе; има висок морталитет и може бити проузрокована бактеријама, гљивицама или вирусима, као што је САРС-КоВ-2, проузроковач КОВИД-19 инфекције. И код сепсе и код КОВИД-19, цитокини су кључни за хиперинфламацију. У оба стања инфламација доводи до активације каскаде коагулације, што може довести до активације фибринолитичког система (110). Пацијенти са бактеријском сепсом и пацијенти са КОВИД-19 инфекцијом имају сличан шаблон развоја МОДС-а, могло би се рећи да је тешка форма КОВИД-19, у ствари, сепса проузрокована САРС-КоВ-2.

Иако се механизми оштећења плућа у КОВИД-19 још увек истражују, термин „citoкинска олуја“ је постао синоним за његову патофизиологију, и у научним публикацијама и у широј јавности. Међутим, то би требало узети са великим опрезом, све је више доказа да је термин неадекватан.

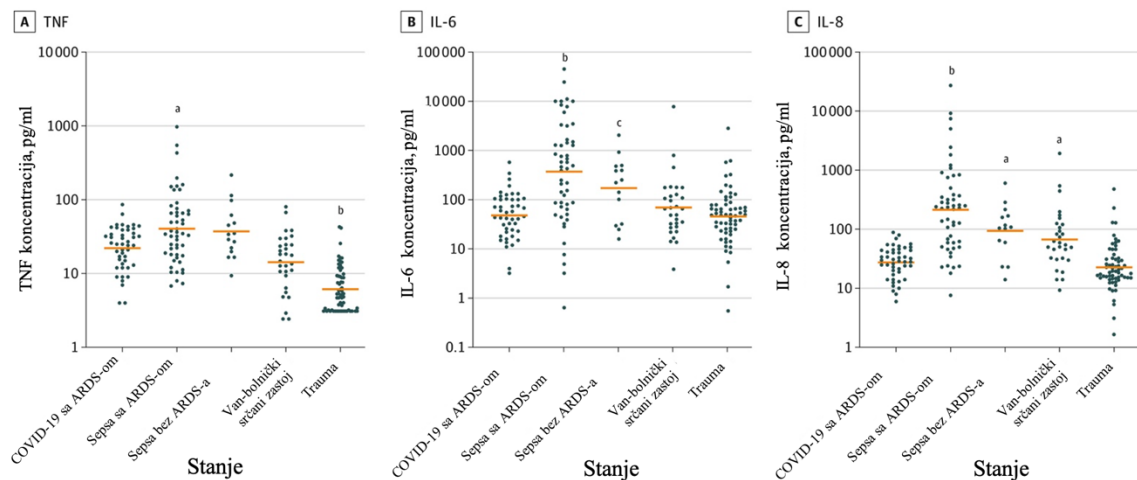
Цитокинска олуја нема дефиницију. Генерално гледано, описује хиперактивни имунски одговор који се карактерише ослобађањем интерферона, интерлеукина, фактора некрозе тумора, хемокина и других медијатора. Ови медијатори су део урођеног имунског одговора неопходног за ефикасно уклањање инфективног агенса. Цитокинска олуја имплицира да су нивои ослобођених цитокина штетни за ћелије домаћина. Разликовање адекватног од нерегулисаног инфламаторног одговора у патофизиологији критичне болести је, међутим, велики изазов (111). Комплексност овог одговора повећава чињеница да већина медијатора из цитокинске олује показује плејотропне ефекте и често су међусобно зависни у остваривању својих биолошких активности. Интеракције ових медијатора, као ни њихови сигнални путеви, нити су линеарне, нити су униформне. Даље, иако квантификовани нивои цитокина могу сугерисати тежину одговора, то се не може поистоветити са патогензом. Медијане нивоа ИЛ-6 код пацијената са хиперинфламаторним фенотипом АРДС-а су 10x до 200x веће од медијана нивоа ИЛ-6 код пацијената са тешком формом КОВИД-19. Поставља се питање зашто су клинички исходи код тешких форми КОВИД-19 лоши упркос релативно ниским нивоима циркулишућег ИЛ-6. По

једној хипотези, тешка вирусна пнеумонија код КОВИД-19 примарно доводи до тешког оштећења плућа, а код већине пацијената са КОВИД-19, без исте магнитуде системског одговора која се испољава код пацијената са хиперинфламаторним фенотипом АРДС-а (112,113). Недавно објављена *postmortem* анализа пацијената са АРДС-ом у склопу КОВИД-19 утврдила је тешко васкуларно оштећење, укључујући и алвеоларне микротромбе. Овај налаз је био 9 пута превалентнији од оног утврђеног *postmortem* анализом пацијената са АРДС-ом у склопу фаталне инфлуенце (114).

Нивои цитокина у плазми не морају репрезентовати степен инфламације плућа. Експерти за АРДС сматрају да би, према доступним подацима, адекватнији закључак био да се, у поређењу са другим узроцима АРДС-а, КОВИД-19 карактерише нижим нивоима цитокина у циркулацији (111). Истичу, такође, да су за дефинитивне закључке доступни подаци још увек недовољни. Многа доступна моноклонска антитела се, као лекови, примарно користе код пацијената са хроничним инфламаторним стањима где оптимална фармакокинетика захтева продужен полу-живот ових блокатора медијатора инфламације. Дуготрајна и недискриминантна супресија инфламације у акутној и субакутној критичној болести може бити опасна због слабог уклањања САРС-КоВ-2 и повећаног ризика од секундарних инфекција. Колико је важно одабрати правог КОВИД-19 пацијента и прави тренутак за примену, на пример тоцилизумаба, показује рандомизована, дупло слепа, плацебом контролисана студија, која је обухватила 243 КОВИД-19 пацијента (115). Код свих је била потврђена САРС-КоВ-2 инфекција, хиперинфламаторно стање као и најмање два од следећа три критеријума: повишена температура ($>38^{\circ}\text{C}$), пулмонални инфилтрата или потреба за додатном кисеоничком потпором да би се одржала сатурација кисеоником већа од 92%. Пацијенти су били рандомизовани, у односу 2:1, у две групе лечене стандардно: прва је добила једну дозу тоцилизумаба а друга плацебо. У овом истраживању тоцилизумаб није био ефикасан ни у превенцији интубације као ни у смањењу mortalитета код умерено тешких до тешких хоспитализованих КОВИД-19 пацијената.

Дакле, пацијенти са КОВИД-19 инфекцијом су хетерогена популација коју много боље описује бура у чаши воде, односно цитокински поветарац, уместо цитокинска олуја (111).

Дефинитивно је имунски одговор и ниво цитокина код пацијената са КОВИД-19 измењен (116). У једном веома интересантном истраживању аутори су поредили нивое цитокина код: критично оболелих КОВИД-19 са АРДС-ом, критично оболелих са сепсом са или без АРДС-а, пацијената након ванболничког срчаног застоја и политрауматизованих (117). Мерили су нивое три проинфламаторна цитокина ТНФ- α и ИЛ-6 и ИЛ-8. Резултати су приказани на слици 1.12.4.



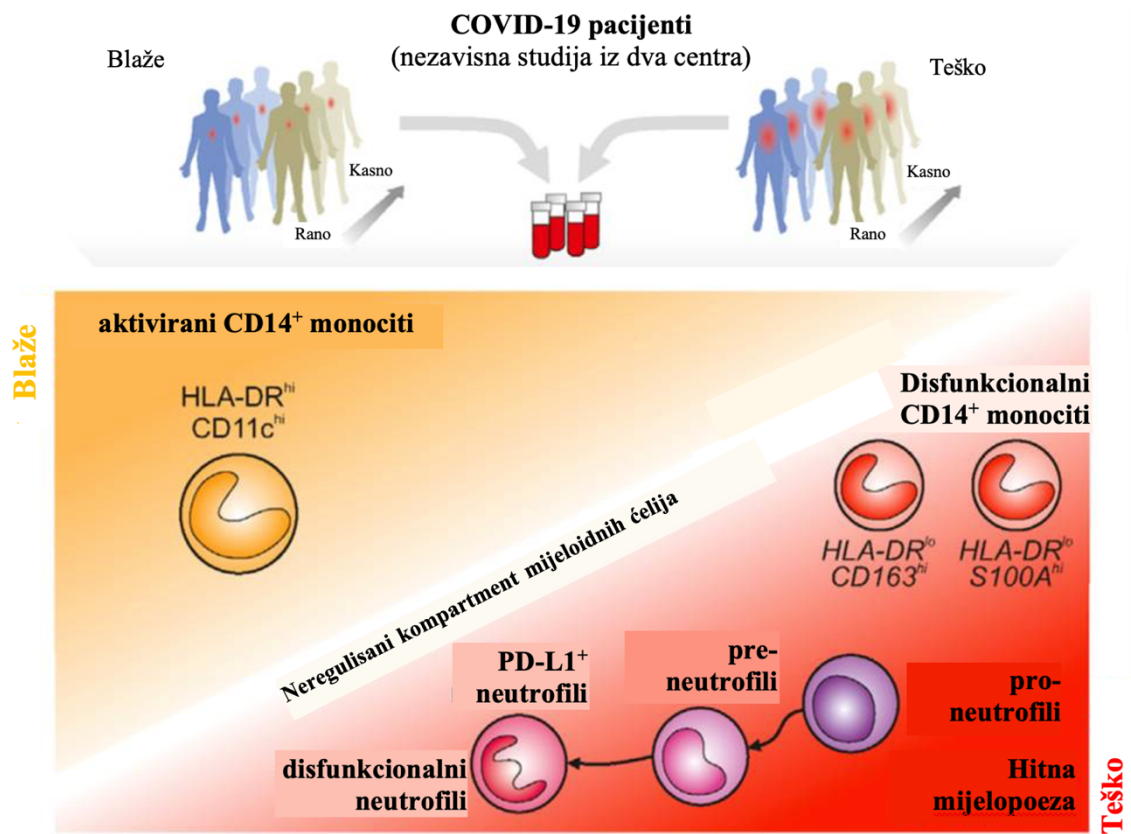
Слика 1.12.4. Концентрације ТНФ- α , ИЛ-6 и ИЛ-8 у плазми неколико субпопулација критично оболелих укључујући и пацијенте са тешком КОВИД-19 инфекцијом и АРДС-ом [модификовано и прилагођено према Koh et al. (117)]

Јасно се види да су нивои сва три цитокина значајно нижи код пацијената са КОВИД-19 у односу на пацијенте са септичким шоком и АРДС-ом, па су средње вредности биле: 22 пг/мЛ према 40 пг/мЛ за ТНФ- α ; 48 пг/мЛ према 376 пг/мЛ за ИЛ-6 и 27 пг/мЛ према 215 пг/мЛ за ИЛ-8; све разлике су статистички високо значајне. Пацијенти са КОВИД-19 су такође имали значајно ниже концентрације ИЛ-6 и ИЛ-8 и од пацијената са септичким шоком без АРДС-а. Аутори су закључили да су пацијенти са КОВИД-19 и АРДС-ом имали значајно ниже вредности тих цитокина у односу на пацијенте са бактеријском сепсом, а сличне вредностима које су имали други критично оболели. Иста група аутора испитивала је ниво имунске супресије код пацијената са КОВИД-19 у односу на пацијенте са бактеријским септичким шоком (118). Ниска мХЛА-ДР експресија је широко коришћен маркер супресије урођеног имунског одговора код критично оболелих. Аутори су у свом ранијем истраживању утврдили да је, код пацијената са бактеријским септичким шоком, ниска мХЛА-ДР експресија превалентна и повезана са развојем секундарних инфекција (119). Иако је ниво мХЛА-ДР експресије био нижи код КОВИД-19 пацијената у односу на здраве добровољце (15000 – 45000 мАб/по ћелији), имуносупресија је била мање изражена код КОВИД-19 пацијената у односу на пацијенте са бактеријским септичким шоком: 11860 према 5211 мАб/по ћелији, што је статистички високо значајна разлика. Кинетика експресије мХЛА-ДР код КОВИД-19 пацијената се није мењала током времена, и током периода праћења од 17 дана након пријема у јединицу интензивне медицине, ни код једног пацијента се није развила

секундарна инфекција. Аутори су закључили да је имунска супресија мање изражена код КОВИД-19 пацијената у односу на пацијенте са бактеријским септичким шоком, као и да је код КОВИД-19 пацијената ниска инциденца секундарних инфекција.

У складу са наведеним су и подаци из најновије литературе који указују на то да САРС-КоВ-2 инфекција доводи до интрапулмоналне имунске активације са имунотромбозом, што обухвата регионалну али не и системску активацију макрофага. Дакле, хипоксемија у КОВИД-19 повезана је са дисрегулацијом имунског одговора и цитокина у плућима, то не мора бити окидач значајног повећања нивоа цитокина или инфламаторних маркера у системској циркулацији. У плућним капиларима и суседној васкулатури веома је изражена имунотромбоза (120). Вероватно је да је због тога ниска инциденца детекције вирусних нуклеинских киселина у крви, тиме би се минимизовала магнитуда системског цитокинског одговора и изражена хиперцитокинемија. Ови аутори сматрају да уместо термина МОДС и СИРС, треба користити термине имунски-посредована дисфункција органа и имунска компартментализација. Дакле, постоји тешка, локализована, орган-специфична инфламација. САРС-КоВ-2 показује тропизам, односно хистолошку селективност, афинитет према алвеолама. Код пацијената са КОВИД-19 пнеумонијом може постојати алвеолитис због локалне активације макрофага и секреције цитокина и са тим повезана имунотромбоза. Уместо системске цитокинске олује пости локална цитокинска поплава у плућима. Због значаја пулмоналне имунотромбозе уведен је термин пулмонална интраваскуларна коагулопатија – ПИК, за разлику од дисеминоване интраваскуларне коагулопатије – ДИК.

Код тешких форми КОВИД-19, изражена је дисфункција и поремећена регулација у компартменту мијелоидних ћелија. Истраживања су показала повећање броја неутрофила и смањење броја не-класичних ($CD14^{lo}CD16^{hi}$) моноцита код тих пацијената. Гранулоцитни компартмент је веома измењен код тешког КОВИД-19, карактерише се појавом неутрофилних прекурсора због хитне мијелопоезе, дисфункционалних неутрофила са експресијом ПД-Л1(121). Резултати истраживања дисфункционалног мијелоидног компартмента код блажих и тежих форми КОВИД-19 приказани су на слици 1.12.5. Блажа форма КОВИД-19 карактерише се инфламаторним $HLA-DR^{hi}CD11c^{hi}CD14^{+}$ моноцитима; тежа форма се карактерише дисфункционалним $HLA-DR^{lo}CD163^{hi}$ и $HLA-DR^{lo}S100A^{hi}CD14^{+}$ моноцитима као и хитном мијелопоезом са незрелим и дисфункционалним неутрофилима. Дакле, насупрот блажој форми, код тешке форме КОВИД-19 моноцити се карактеришу ниском експресијом ХЛА-ДР и анти-инфламаторним маркерима као што је ЦД163.

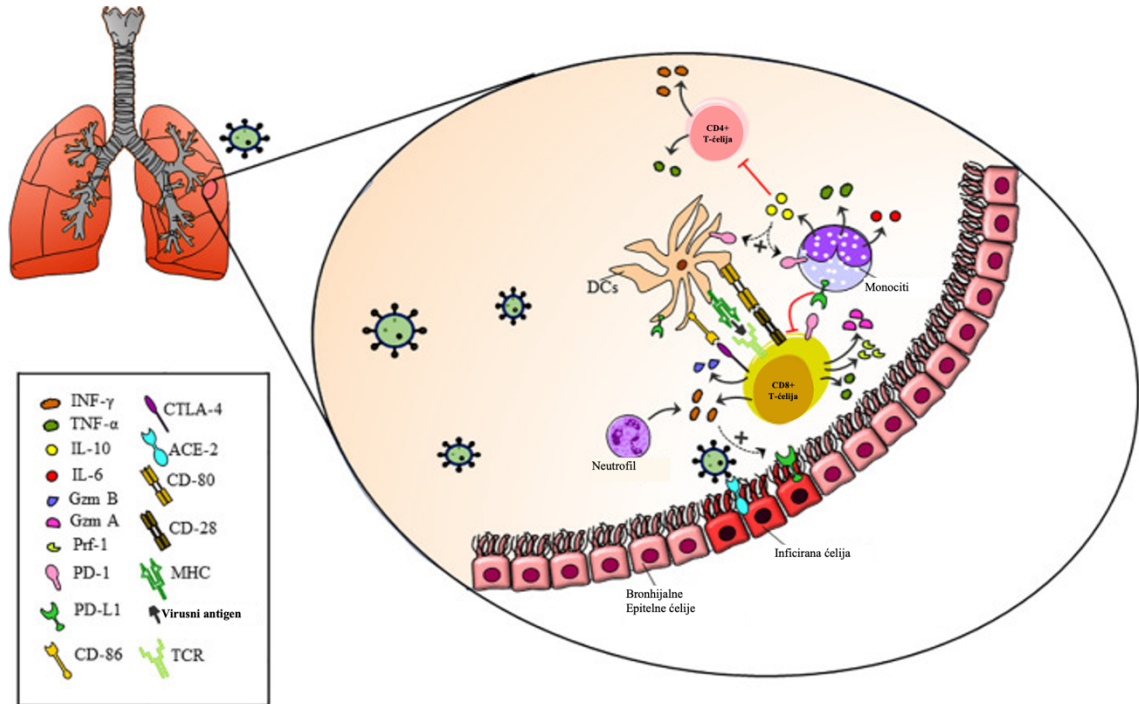


Слика 1.12.5. Нерегулисани компартмент мијелоидних ћелија у блажим и тежим формама КОВИД-19 [модификовано и прилагођено према Schulte-Schrepping et al. (121)]

Истраживања су показала значајну неутрофилију и повећане нивое хемокина повезаних са неутрофилима (*IL-8*, *CXCL2*, или *G-CSF*) (122); фокус је усмерена на учешће неутрофила механизмима НЕТозе и некроптозе (123, 124). Нови подаци из транскриптомске анализе такође сугеришу да моноцити, Т-ћелије, НК-ћелије и дендритичне ћелије вероватно нису најважнији покретачи цитокинима посредоване хиперинфламације (125, 126); због тога се неутрофили постепено профилишу као главни виновници. Неутрофили су, заједно са мононуклеарима, прве ћелије које бивају привучене ка алвеолама инфицираним САРС-КоВ-2, регрутоване су под дејством интерферона, *CCL2*, ИЛ-6, ИЛ-1 β и других цитокина (127). На месту инфекције, те имунске ћелије врше ерадикацију вирусом инфицираних ћелија, ослобађају проинфламаторне медијаторе и секретују различите протеазе (путем НЕТозе или независно од ње). Ако процес измакне контроли и буде неадекватно јак, може доћи до „протеолитичке олује“ што може допринети развоју АРДС-а. Протеолитичка олуја може настати због дисбаланса активатора и

инхибитора каскаде серинске протеазе у неутрофилима. Резултат може бити обимна некроинфламација која доводи до ендотелиопатије, хиперкоагулабилности и формирања дифузних микро и макротромба (128). На супрот ефлуксу и проинфламаторној активацији неутрофила, недавно истраживање је утврдило редукцију циркулишућих моноцита и непостојање усходне регулације њихових проинфламаторних цитокина у КОВИД-19. То је индикатор ограниченог доприноса моноцита хиперцитокинемији код пацијената са КОВИД-19 (129). Веома интересантно истраживање утврдило је различите карактеристике хиперреактивности неутрофила као и „ошамућене“ моноците и дендритске ћелије код пацијената са КОВИД-19. Аутори су демонстрирали измењене карактеристике неутрофила, као што су фенотип, дегранулација, одговори на стимулусе и продукција цитокина код ове инфекције (130). Проинфламаторно окружење поспешује регрутовање незрелих ЦД10 форми неутрофила из костне сржи, нарочито код болесника са тешком клиничком сликом КОВИД-19. Незрели ЦД-10 неутрофили су познати по томе што имају имуностимулаторна својства усмерена на Т-ћелије, као и продужено преживљавање. Аутори наглашавају кључну улогу неутрофила као носилаца хиперинфламације повезане са КОВИД-19, и то шифтом ка незрелим формама, појачаном дегранулацијом и продукцијом цитокина, као и аугментацијом интерферонских одговора. Такође су утврдили оштећену функцију моноцити и дендритичних ћелија: посебно ниску експресију маркера матурације на њима, повећане нивое ПД-Л1 и неспособност усходне регулације фенотипа као одговор на стимулацију. То иде у прилог кључној улози неутрофила, али не и моноцита у имунском дисбалансу у тешкој форми КОВИД-19. На моноцитима је показана нисходна регулација ХЛА-ДР, што би могло бити повезано са смањеном реактивношћу на стимулусе и супресијом ЦД4+ Т-ћелија (131, 132). У серуму пацијената са КОВИД-19 могу постојати повишени нивои мијелопероксидазе и неутрофилне еластазе, вероватно због повећане дегранулације неутрофила у периферној крви. Вероватно је да протеолитичку олују појачава деплеција протеазних инхибитора који се троше током интензивне НЕТозе, као и повећана секреција серинских протеаза (133). Дакле, насупрот моноцитима и дендритским ћелијама, неутрофили пацијената са КОВИД-19 експримирају знатно ниже нивое ПД-Л1, и њихова стимулација вирусном РНК доводи до повећане продукције проинфламаторних цитокина. Упркос томе што су, генерално, мање ефикасни у продукцији цитокина, неутрофили су много више од моноцита или дендритских ћелија заступљени у периферној крви, нарочито код пацијената са тешком формом КОВИД-19. Због тога они могу бити главни носиоци хиперцитокинемије код ових пацијената (130).

Значај ПД-1/ПД-Л1 осовине и цитотоксичког Т лимфоцитног антигена-4 (*Cytotoxic T lymphocyte antigen-4; CTLA-4*) у регулацији имунских ћелија током вирусне респираторне инфекције приказан је на слици 1.12.6.



Слика 1.12.6. Улога ПД-1/ПД-Л1 и ЦТЛА-4 осовине у регулацији имунских ћелија током респираторне вирусне инфекције [модификовано и прилагођено према Aghbash et al. (134)]

Многа истраживања су утврдила поремећен урођени имунски одговор код пацијената са КОВИД-19. Поред неадекватне продукције ИФН- α од стране дендритских ћелија, постоји значајно смањење продукције проинфламаторних цитокина ИЛ-6, ТНФ- α и ИЛ-1 β од стране стимулираних моноцита. То је у складу са смањеном експресијом гена који кодирају ове цитокине. Смањена је и ХЛА-ДР експресија на мијелоидним ћелијама. Вируси су окидач за одговор ИФН типа I, што доводи до транскрипције стотина интерфероном стимулираних гена – ИСГ (*interferon-stimulated genes - ISG*). Продукти тих ИСГ су ефектори који испољавају многа антивирусна својства, могу деловати на било коју карику у ланцу репликације вируса. Неки од најпотентнијих антивирусних ефектора учвршћују овај систем даљом индукцијом ИФН или ИСГ. Други гени олакшавају вирусну репликацију, што сугерише да су неки вируси еволуирали до те мере да користе ИФН ефекторе у своју корист. САРС-КоВ-2 инфекција индукује рану и пролазну продукцију ИФН типа I у плућима, што индукује различите ИСГ у периферној крви; то се

примарно дешава у благим до умереним формама КОВИД-19 (135). У истом истраживању неочекивано се показало да су тешке форме КОВИД-19 повезане са системским ослобађањем бактеријске ДНК и ендотоксина, вероватно плућног порекла; њихове вредности су корелирале са нивоима ИЛ-6 и ТНФ- α у крви што указује да су бактеријски продукти снажни индуктори инфламаторног одговора у тешкој форми КОВИД-19. Аутори су закључили да проинфламаторни цитокини, који се налазе у плазми, потичу примарно од ћелија плућног ткива у односу на ћелије у периферној крви. Дакле, постоји просторна (спацијална) дихотомија урођеног имунског одговора у САРС-КоВ-2 инфекцији; карактерише се супресијом периферне урођене имуности наспрам проинфламаторног одговора у плућима. Такође, постоји и временско (темпорално) померање цитокинског одговора од раног, али пролазног, ИФН типа I ка каснијем проинфламаторном одговору у тежим формама болести.

У прилог проминентне активације неутрофила код пацијената са КОВИД-19 говоре и резултати истраживања експресије ЦД177, специфичног маркера активације неутрофила, у серуму. Вредности протеина ЦД177 су биле статистички високо значајно веће у групи пацијената са КОВИД-19 у односу на здраве добровољце; код пацијената којима је било потребно лечење у ЈИЛ у односу на оне којима није, а вредности овог параметра су корелирале са настанком симптома. Коначно, лонгитудинално мерење ЦД177 је показало да су се повишене вредности овог биомаркера одржавале код пацијената који су умрли; разлика између умрлих и преживелих је била статистички високо значајна, па се ЦД177 показао као поуздан прогностички маркер у погледу исхода КОВИД-19 (136).

Најновија истраживања су показала да инхибитори имунских контролних молекула (*immune-checkpoint inhibitors – ICIs*), примарно антитела која блокирају ПД-1/ПД-Л1, имају могући терапијски потенцијал због тога што пацијенти са тешким и критичним формама КОВИД-19, чак и пре развоја АРДС-а, испољавају лимфоцитопенију и исцрпљивање Т-ћелија, што може довести до вирусне сепсе и повећати морталитет. Инхибитори ПД-1/ПД-Л1 се користе у терапији онколошких пацијената (137). Код КОВИД-19 се може јавити исцрпљивање Т-ћелија са повећаном експресијом ПД-1 и ПД-Л1 (138). Истраживања су показала да у стањима других вирусних инфекција постоји исти тренд. Када су примењена анти-ПД-1 и анти-ПД-Л1 антитела, поновно се успоставила имунокомпетентност Т-ћелија које су тада могле ефикасно да се боре против вирусне инфекције. На основу тих сазнања, у току је пет клиничких истраживања са циљем да се испита ефикасност анти-ПД-1 антитела код пацијената са КОВИД-19, са или без придружене малигне болести (139). Код пацијената са тешким и критичним формама КОВИД-

19, Т-ћелије, из стања екстремне активације у раној фази, прелазе у стање исцрпљености. Због тога на њиховој површи постоји повећана експресија и маркера активације (на пр. ЦД69) и маркера исцрпљивања (на пр. ПД-1).

На основу доступних података пацијената са КОВИД-19, постављена је хипотеза да у случајевима благих форми КОВИД-19 резидентни макрофаги у плућима започињу антивирусни инфламаторни одговор. Потом би макрофаги могли спречити ширење инфекције и бити окидач за урђени и стечени имунски одговор; тада би дошло до уклањања инфекције и опоравка (140). Насупрот томе, у случајевима тешких и/или критичних форми КОВИД-19, због поремећеног имунског одговора долази до тешког оштећења епително-ендотелне баријере у плућима; то омогућава да САРС-КоВ-2 нападне алвеоларне и ендотелне резидентне ћелије плућа, што регрутује додатне имунске ћелије у алвеоле (141). Акумулација имунских ћелија у плућима може довести до егзацербације локалне продукције цитокина и хемокина што резултира неконтролисаним проинфламаторним стањем у којем се плућа додатно оштећују (142). Резидентни макрофаги и дендритичне ћелије у алвеолама такође могу подлећи ивазији САРС-КоВ-2, иако још увек није јасно да ли до тога долази путем примарне вирусне инфекције или путем фагоцитозе епителних и ендотелних већ инфицираних апоптотичних ћелија (143). У току је једна интересантна студија чији је циљ да процени специфичан имунски одговор код врло хетерогене популације пацијената са КОВИД-19 (144). Објављени прелиминарни резултати овог пројекта, назвног *COVID-IP (COVID-immunophenotyping)*, указују на специфичне карактеристике имунског система код пацијената са КОВИД-19: хиперпродукција ИгГ, нерегулисан цитокински одговор, поремећен фенотип моноцита и дендритичних ћелија и селективна цитопенија у одређеним субпопулацијама Т-ћелија. Сви ти параметри су значајно повезани са лошим исходом код оболелих од КОВИД-19. Најновија истраживања пацијената са продуженим КОВИД-19 потврђују инфламаторне промене ПЕТ компјутеризованом томографијом (145).

Због значаја имунопатогенезе КОВИД-19 за могуће терапијске опције, многи аутори се фокусирају на блокирање ПД-1/ПД-Л1 моноклонским антителима као самостални терапијски приступ или у комбинацији са блокадом ИЛ-6 и ИЛ-1 моноклонским антителима. Постоје сугестије да би ранија примена анти-ПД-1 код пацијената са КОВИД-19 могла спречити развој АРДС-а и смањити потребу за лечењем у јединицама интензивне медицине (146).

2. ХИПОТЕЗА И ЦИЉЕВИ ИСТРАЖИВАЊА

2.1. ХИПОТЕЗА

Активациони статус неутрофила (експресија нЦД64, нЦД14, нПД-Л1 и ИДН) и моноцита (експресија ХЛА-ДР, мЦД64, мЦД14, мПД-Л1) као и међусобни односи неутрофила, моноцита, тромбоцита и лимфоцита (МПВ/Тр, НЛ, МЛ, ТЛ) у крви критично оболелих са секундарном сепсом корелирају са врстом бактеријског проузроковача (Грам-позитивне и Грам-негативне бактерије), основним обољењем које је довело до секундарне сепсе (панкреатитис, перитонитис, траума) и исходом (преживео, умро).

2.2. ЦИЉЕВИ ИСТРАЖИВАЊА

1. Испитати фенотипске карактеристике и активациони статус неутрофила и моноцита у крви критично оболелих од секундарне сепсе и здравих контролних добровољаца.
2. Испитати повезаност активационог статуса неутрофила и моноцита у крви критично оболелих од секундарне сепсе са врстом бактеријског проузроковача (Грам-позитивне и Грам-негативне бактерије), основним обољењем које је довело до секундарне сепсе (панкреатитис, перитонитис, траума) и исходом (преживео, умро) првог (дан постављања дијагнозе) и петог дана.
3. Испитати повезаност међусобних односа неутрофила, моноцита, тромбоцита и лимфоцита (МПВ/Тр, НЛ, МЛ, ТЛ) у крви критично оболелих од секундарне сепсе са врстом бактеријског проузроковача (Грам-позитивне и Грам-негативне бактерије), основним обољењем које је довело до секундарне сепсе (панкреатитис, перитонитис, траума), и исходом (преживео, умро) првог дана.
4. Испитати повезаност параметара инфламаторног одговора (пресепсин, прокалцитонин, Ц-реактивни протеин, МПВ) као и вредности лактата са исходом (преживео, умро) критично оболелих од секундарне сепсе првог, трећег и петог дана.

3. ИСПИТАНИЦИ И МЕТОДЕ

3.1. ПАЦИЈЕНТИ И ЗДРАВЕ КОНТРОЛНЕ ОСОБЕ

Овом проспективном, опсервационом студијом, која је спроведена у Војномедицинској академији, обухваћено је 86 пацијената који су примљени на лечење у Јединицу интензивне терапије (ЈИТ) Клинике за анестезиологију и интензивну терапију. Студија је одобрена од Етичког комитета ВМА и спроведена у сагласности са Хелсиншком декларацијом и смерницама Добре Клиничке Праксе у клиничком испитивању. За све пацијенте укључене у ову студију добијена је лична сагласност или сагласност њихових најближих сродника.

У клиничко испитивање укључивани су пацијенти са постављеном дијагнозом сепсе након испуњавања дијагностичких критеријума *SEPSIS* – 3 протокола. Према поменутиим критеријумима постављана је дијагноза сепсе (раније тешке сепсе) и септичког шока (акутна промена у укупном *SOPA* скору ≥ 2 поена, неопходна примена вазопресора за одржавање средњег артеријског притиска ≥ 65 mmHg и ниво лактата у крви > 2 mmol/L упркос адекватној надокнади циркулаторног волумена). Критеријуми за постављање дијагнозе су укључили било коју од варијабли за коју се сматра да је настала као последица инфекције: сепсом индукована хипотензија, ниво лактата већи од 2 mmol/L, диуреза мања од 0,5 mL/kg/h која се одржава дуже од два сата упркос адекватној надокнади циркулаторног волумена, акутно оштећење плућа са односом PaO_2/FiO_2 мањим од 250, креатинин већи од 176 μ mol/L, билирубин већи од 34,2 μ mol/L, број тромбоцита мањи од 100.000/ μ L и коагулопатија (*INR* већи од 1,5).

Пацијенти са тешком траумом, који су у критичном стању примани у ЈИТ, укључивани су у студију након што би испунили критеријуме за секундарну сепсу, односно септички шок. Пацијенти су сврставани у тешку трауму након испуњења критеријума *Injury Severity Score - ISS* > 25 према *Abbreviated Injury Scale (AIS)*.

Критеријуми за искључење обухватили су малигне болести било ког поријекла као и секундарну сепсу која није последица перитонитиса, панкреатитиса или трауме. Овим процесом искључена су 22 пацијента од првобитних 108 који су разматрани за укључење у студију.

Студија је извођена у периоду од новембра 2017. године до јануара 2020. године у укупном трајању од две године и три месеца.

Током периода лечења у ЈИТ, сви пацијенти су третирани према смерницама за лечење сепсе уз примену антибиотске терапије, надокнаде циркулаторног волумена, вазоактивне подршке, респираторне подршке применом разних видова неинвазивне и инвазивне механичке вентилације, контролу извора инфекције као и уз хируршке интервенције уколико се створила потреба за тим видом лечења. За меру исхода лечења користили смо болнички морталитет, а пацијенти укључени у студију праћени су до отпуста из болнице (преживели) или смрти у болници (умрли).

Узорци крви за одређивање биомаркера сакупљани су у три временска интервала, првог дана пријема и/или постављања дијагнозе сепсе и укључивања у студију, а потом трећег и петог дана. Истовремено са узимањем узорака за одређивање биомаркера узимани су узорци за одређивање хемокултура. Током сва три временска интервала када је рађено узорковање праћени су скорови *Sequential Organ Failure Assessment (SOFA)* скор и *Simplified Acute Physiology Score (SAPS) II* скор. *Acute Physiology and Chronic Health Evaluation (APACHE) II* скор одређиван само првог дана узорковања. Скорови *SOFA* и *SAPS II* су одређивани сваког дана током лечења у ЈИТ.

Контролни узорци су добијени од 22 здрава добровољца чији су узорци узети у Институту за трансфузиологију и хемобиологију крви ВМА након што су потписали пристанак.

3.2 УЗОРКОВАЊЕ И АНАЛИЗЕ

Квалификовани медицински техничари су сакупљали узорке венске крви у *BD Vacutainer K₂ EDTA* епрувете за сакупљање узорака. Сви узорци крви су анализирани у временском оквиру од 2 сата након венепункције. Комплетна крвна слика је одређивана на уређају *Siemens Advia 120 hematology system, Siemens Healthineers*, Немачка. Овај уређај одређује крвну слику путем проточне цитометријске методе. Диферентовање белих крвних ћелија је урађено путем пероксидаза и базифилног канала. *Advia 120* анализатор одређивање броја тромбоцита врши путем дводимензионалног ласерско светлосног распршивања одређујући истовремено и број еритроцита. *Mean Platelet Volume-MPV* је параметар који се израчунава из хистиограма волумена тромбоцита. За одређивање вредности Ц-реактивног протеина коришћен је уређај *ADVIA 1800, Siemens Healthineers*, Немачка а за мерење прокалцитонина уређај *CENTAUR Advia XP, Siemens Healthineers*, Немачка. За гасне анализе и одређивање нивоа лактата у артеријској крви користили смо гасни анализатор *GEM3000 Premier, Instrumentation Laboratory Werden Company*, Шпанија;

за одређивање вредности пресепсина *Patfast compact immuno analyzer, Mitsubishi Chemical Europe*, Немачка. Нормалне вредности за ове ћелије и биомаркере су следеће: леукоцити 4 - 11.0 x 10⁹/L; тромбоцити 130.0 – 400.0 x 10⁹/L; Ц-реактивни протеин - 0.00-4.00 mg/L; прокалцитонин < 0.10 ng/mL; пресепсин < 360 pg/mL (подаци из наше лабораторије).

3.3 ИМУНОФЕНОТИПСКА ИСПИТИВАЊА

Ова испитивања спроведена су на Институту за медицинска истраживања Војномедицинске академије у Београду. Бојење леукоцита периферне крви извршено је стандардним методама имунофенотипизације: уклањање еритроцита извршено је процесом лизирања помоћу лизинг пуфера (*EDTA, NH₄Cl, KHCO₃*) у току 15 минута уз континуирано мануелно мешање епрувета; леукоцити су затим испрани два пута у *RPMI 640* медијуму са 5% хуманог серума стандардном методом центрифугације (300 x g током 6 минута на собној температури); након испирања број леукоцита одређен је на крвном бројачу *Beckman Coulter Act diff* а затим су суспензије са 1x10⁶ ћелија у 100μL фосфатног пуфера (*PBS*) расподељене у тест епрувете; моноклонска антитела коњугована одговарајућим флуорохромом додата су у количини по проскрипцији произвођача; након инкубације од 30 минута на +4 °C, ћелије су два пута испране на горе описани начин и фиксирани у фосфатном пуферу са 5% формалдехида. Након бојења, леукоцити периферне крви анализирани су путем проточног цитофлуориметра *Beckman Coulter FC 500*, САД, уз помоћ *CXP* аналитичког софтвера. На овај начин анализирана је експресија нЦД64, нЦД14, нПД-Л1 и ИДН на неутрофилима и експресија ХЛА-ДР, мЦД64, мЦД14, мПД-Л1 на моноцитима. Имунофенотипске анализе рађене су првог и петог дана након укључивања у студију.

3.4. СТАТИСТИЧКА АНАЛИЗА

Статистичка обрада података је рађена уз помоћ статистичког софтвера из пакета *SPSS Statistics 18*. У случају континуираних података, варијабле су приказане као средња вредност ± стандардна девијација, медијана, минималне и максималне вредности. За испитивање нормалности дистрибуције континуираних података коришћен је *Kolmogorov-Smirnov* тест. Статистичка значајност разлике између испитиваних група тестирана је *Mann-Whitney* или *Friedman* тестом. *Spearman* коефицијент корелације ρ коришћен је да би се испитала повезаност између параметара. Да би се утврдила сензитивност и специфичност варијабли као предиктора леталног исхода, анализирани су *ROC* криве и површине испод њих (*AUC*) уз коришћење *Youden*

индекса због објективности. Израчунати су односи шанси (*OR*) и кореспондирајући 95% интервали поверења да би се утврдила статистичка јачина повезаности између варијабли и исхода. Независне варијабле, које су највише обећавале као појединачни или комбиновани фактори ризика, подвргнуте су бинарној логистичкој регресионој анализи.

Разлике су сматране статистички значајним ако је $p < 0.05$.

4. РЕЗУЛТАТИ

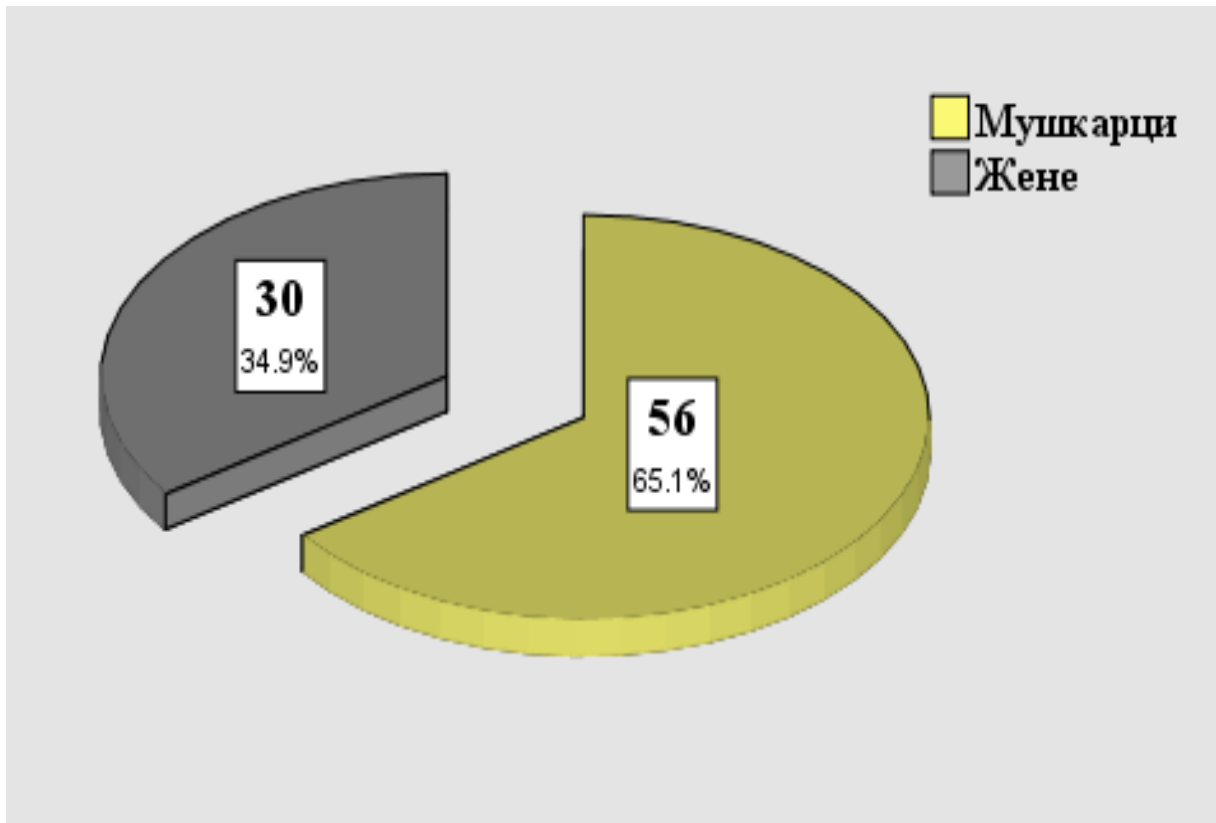
4.1. ДЕМОГРАФСКЕ КАРАКТЕРИСТИКЕ ПАЦИЈЕНАТА

Током трогодишњег периода, истраживањем је обухваћено 86 одраслих критично оболелих хирушких пацијената са секундарном сепсом. Њихове демографске карактеристике и основни клинички подаци приказани су на табели 4.1.1. и графиконима 4.1.1. до 4.1.4.

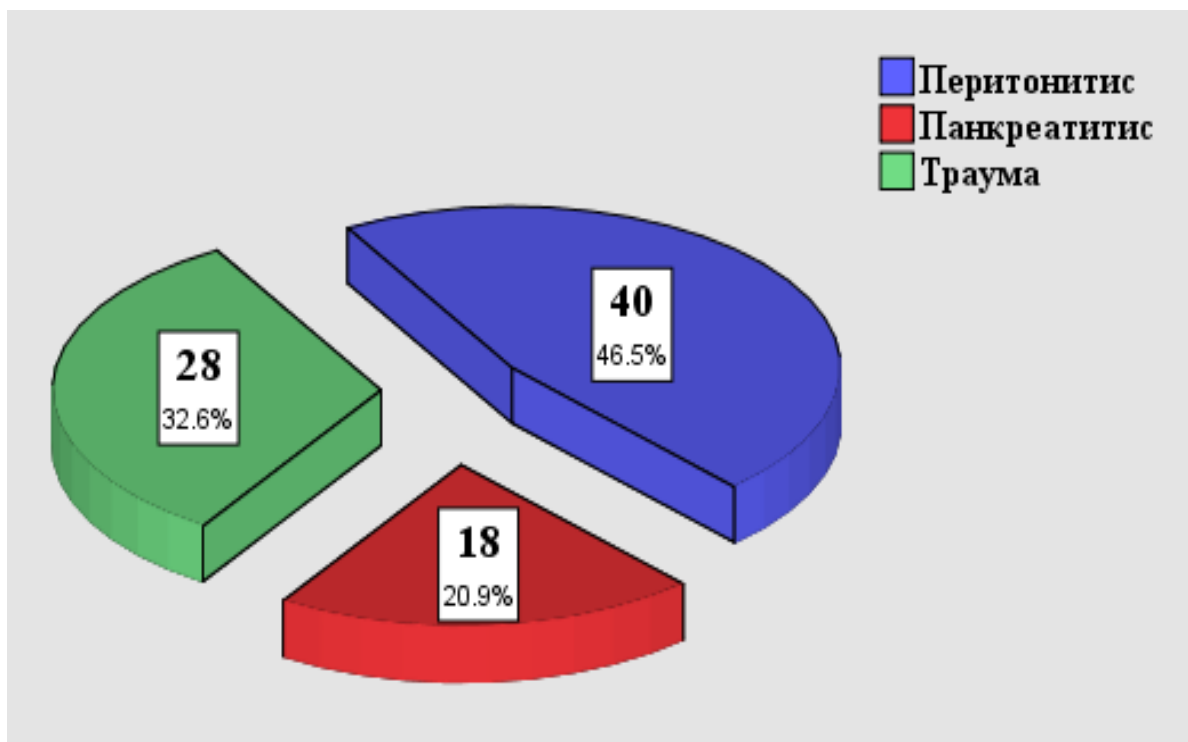
Табела 4.1.1. Демографске карактеристике пацијената и основни клинички подаци

Параметар	Вредност
Укупан број пацијената	86
Старост (средња вредност, распон), године	59 (18 – 89)
Пол, број (%)	
мушки	56 (65.1)
женски	30 (34.9)
<i>Simplified Acute Physiology Score II (SAPS II)</i> скор средња вредност \pm СД првог дана	37.28 \pm 14.56
<i>Acute Physiology and Chronic Health Evaluation II (APACHE II)</i> скор средња вредност \pm СД првог дана	13.15 \pm 5.96
<i>Sequential (Sepsis) Organ Failure Assessment (SOFA)</i> скор средња вредност \pm СД првог дана	5.81 \pm 3.80
<i>Injury Severity Score – ISS</i> (утврђен коришћењем <i>Abbreviated Injury Scale - AIS</i>) за пацијенте са траумом првог дана	> 25 бодова
Основно обољење које је довело до секундарне сепсе, број (%)	
перитонитис	40 (46.5)
панкреатитис	18 (20.9)
траума	28 (32.6)
Бактеријски проузроковач у хемокултури, број (%)	
Грам-позитивна хемокултура	8 (9.3)
Грам-негативна хемокултура	19 (22.1)
Полимикробна хемокултура	14 (16.3)
Негативна хемокултура	45 (52.3)
Болнички морталитет, број (%)	32 (37.2)

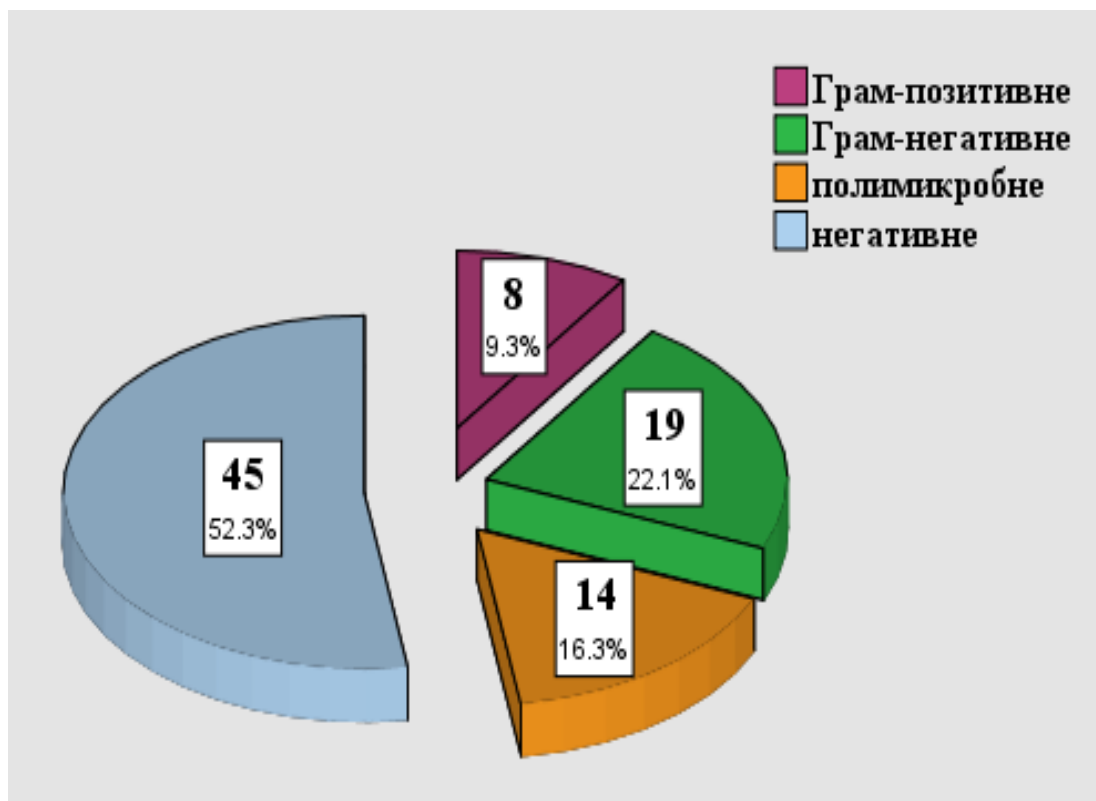
Графикон 4.1.1. Дистрибуција пацијената по полу



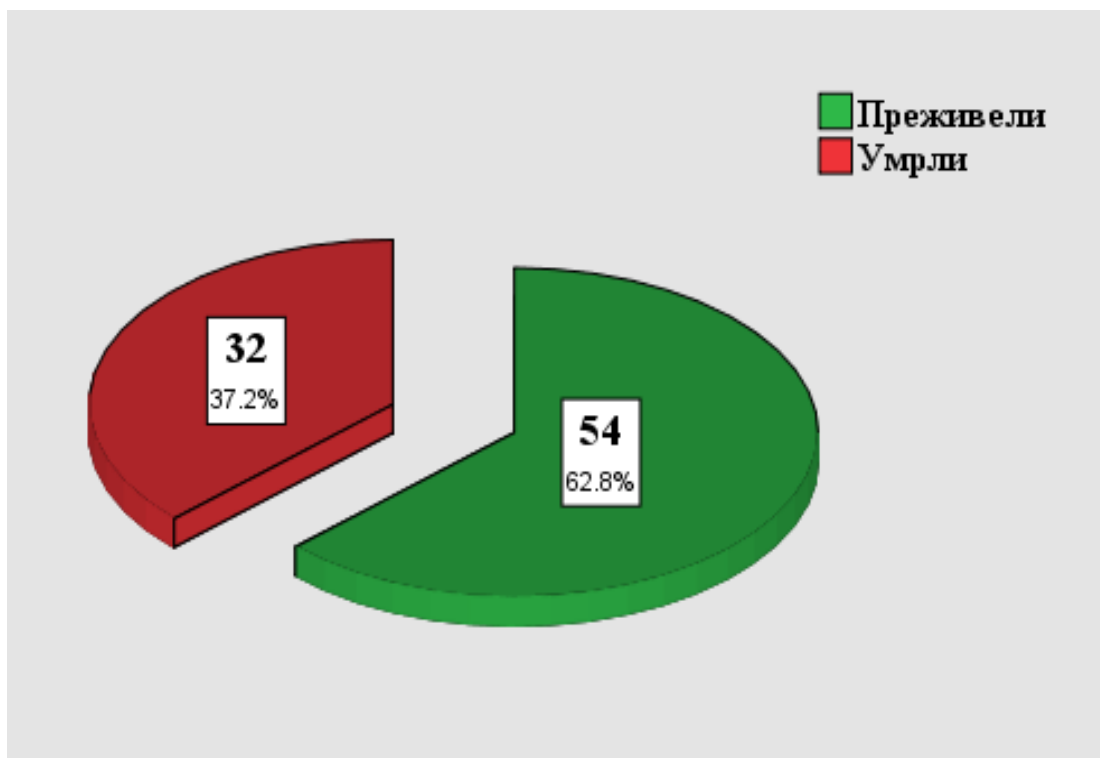
Графикон 4.1.2. Дистрибуција пацијената по основном обољењу које је довело до сепсе



Графикон 4.1.3. Дистрибуција пацијената по хемокултури



Графикон 4.1.4. Дистрибуција пацијената према исходу (болнички морталитет)



4.2. ПАРАМЕТРИ ИНФЛАМАТОРНОГ ОДГОВОРА

4.2.1. ПРЕСЕПСИН

Средње вредности, стандардне девијације, медијане, распони између минималне и максималне вредности пресепсина у три временска интервала (први, трећи и пети дан) приказане су код свих пацијената на табели 4.2.1.1.

Табела 4.2.1.1. Вредности пресепсина (пг/мЛ) у три временска интервала код свих пацијената

Време (дани)	Средња вредност	Стандардна девијација	Медијана	Распон вредности (минимална – максимална)
први	1307.55	1336.895	873.00	101.00 – 8144.00
трећи	1111.85	1434.093	646.00	67.30 – 9419.00
пети	868.67	1079.27	603.50	52.60 – 7123.00

Статистичком анализом утврђено је да постоји статистички високо значајна разлика у вредностима пресепсина између преживелих и умрлих у сва три временска интервала (табела 4.2.1.2. и графикон 4.2.1.1.).

Табела 4.2.1.2. Вредности пресепсина (пг/мЛ) у три временска интервала према исходу

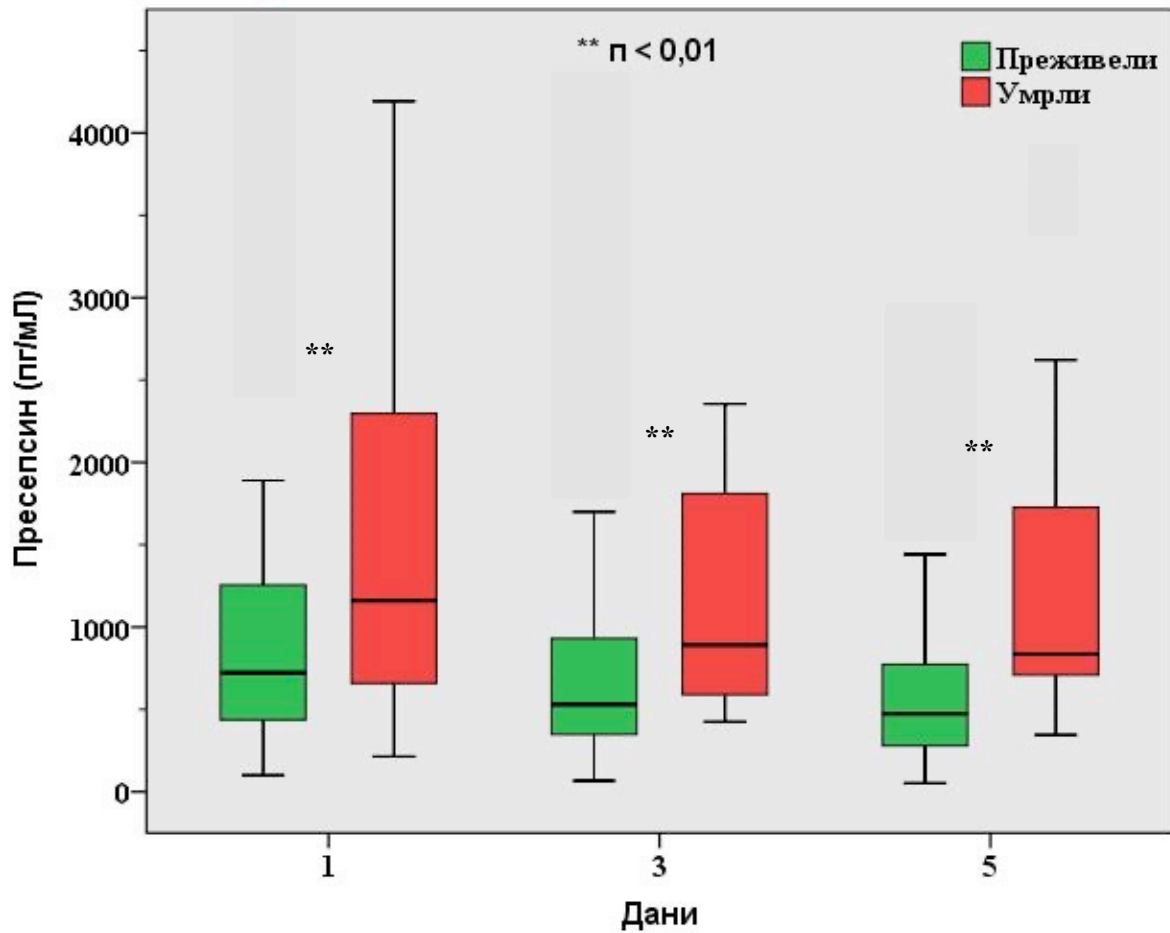
Време (дани)	Преживели (n=54) средња вредност ± СД; М; (мин-макс)	Умрли (n=32) средња вредност ± СД; М; (мин-макс)	вредност п
први	1068.59 ± 1105.38; 722.50; (101 – 5315)	1710.78 ± 1595.09; 1160.50; (214. – 8144)	п = 0.008
трећи	920.98 ± 1172.52; 530.00; (67.30 – 5880.00)	1493.59 ± 1816.20; 891.00; (425 – 9419)	п = 0.002
пети	683.23 ± 991.49; 473.50; (52.60 – 7123.00)	1323.86 ± 1171.99; 836.00; (345.00 – 5142)	п = 0.000

СД – стандардна девијација; М - медијана; Мин – минимална вредност; Макс – максимална вредност

Статистичком анализом је утврђено да не постоји статистички значајна разлика у вредностима пресепсина у односу на пол и старост пацијената, као ни на врсту бактеријског проузроковача изолованог хемокултуром ни у једном од три временска интервала.

Вредности пресепсина у три временска интервала према основном обољењу које је довело до секундарне сепсе приказане су на табелама 4.2.1.3., 4.2.1.4. и 4.2.1.5.

Графикон 4.2.1.1. Вредности пресепсина (пг/мЛ) у три временска интервала према исходу



Табела 4.2.1.3. Вредности пресепсина (пг/мЛ) у три временска интерва код пацијената са перитонитисом

Време (дани)	Средња вредност	Стандардна девијација	Медијана	Распон вредности (минимална – максимална)
први	1709.83	1630.795	1215.50	167.00 – 8144.00
трећи	1417.05	1863.280	847.50	176.00 – 9419.00
пети	736.66	852.240	600.00	196.00 – 5142.00

Табела 4.2.1.4. Вредности пресепсина (пг/мЛ) у три временска интервала код пацијената са панкреатитисом

Време (дани)	Средња вредност	Стандардна девијација	Медијана	Распон вредности (минимална – максимална)
први	1416.89	991.017	947.00	528.00 – 4193.00
трећи	1107.76	710.574	891.00	269.00 – 2354.00
пети	1130.37	953.838	817.50	160.00 – 3799.00

Табела 4.2.1.5. Вредности пресепсина (пг/мЛ) у три временска интервала код пацијената са траумом

Време (дани)	Средња вредност	Стандардна девијација	Медијана	Распон вредности (минимална – максимална)
први	662.57	698.336	450.50	101.00 – 3706.00
трећи	721.93	1006.044	506.50	67.30 – 5640.00
пети	874.94	1370.035	460.00	52.60 – 7123.00

Што се тиче вредности пресепсина и основног обољења које је довело до секундарне сепсе (перитонитис, панкреатитис, траума), статистичком анализом је утврђено да високо значајна општа разлика постоји првог дана ($p < 0.01$), општа разлика је значајна трећег дана ($p < 0.05$), док петог дана нема статистички значајне опште разлике ($p > 0.05$). Због тога је у прва два термина урађена додатна пост-хок анализа (*Mann-Whitney U* тестом) поређења између парова група што је приказано на табели 4.2.1.6.

Табела 4.2.1.6. Поређење вредности пресепсина и основног обољења које је довело до секундарне сепсе у три временска интервала

Пресепсин (пг/мЛ)	Први дан	Трећи дан	Пети дан
<i>Chi-square; Kruskal-Wallis</i>	21.378; $p < 0.01$	8.412; $p < 0.05$	$p > 0.05$
<i>z</i> перитонитис / панкреатитис	$p > 0.05$	$p > 0.05$	
<i>z</i> перитонитис / траума	-4.056; $p < 0.01$	-2.436; $p < 0.05$	
<i>z</i> панкреатитис / траума	-3.961; $p < 0.01$	-2.505; $p < 0.05$	

4.2.2. ПРОКАЛЦИТОНИН

Средње вредности, стандардне девијације, медијане, распони између минималне и максималне вредности прокалцитонина у три временска интервала (први, трећи и пети дан) приказане су код свих пацијената на табели 4.2.2.1.

Табела 4.2.2.1. Вредности прокалцитонина (нг/мЛ) у три временска интервала код свих пацијената

Време (дани)	Средња вредност	Стандардна девијација	Медијана	Распон вредности (минимална – максимална)
први	6.16	13.214	1.01	0.007 – 69.150
трећи	9.83	39.338	0.93	0.03 – 259.47
пети	2.76	8.122	0.54	0.060 – 60.36

Статистичком анализом утврђено је да не постоји статистички значајна разлика у вредностима прокалцитонина између преживелих и умрлих ни у једном од три временска интервала (табела 4.2.2.2. и графикон 4.2.2.1.)

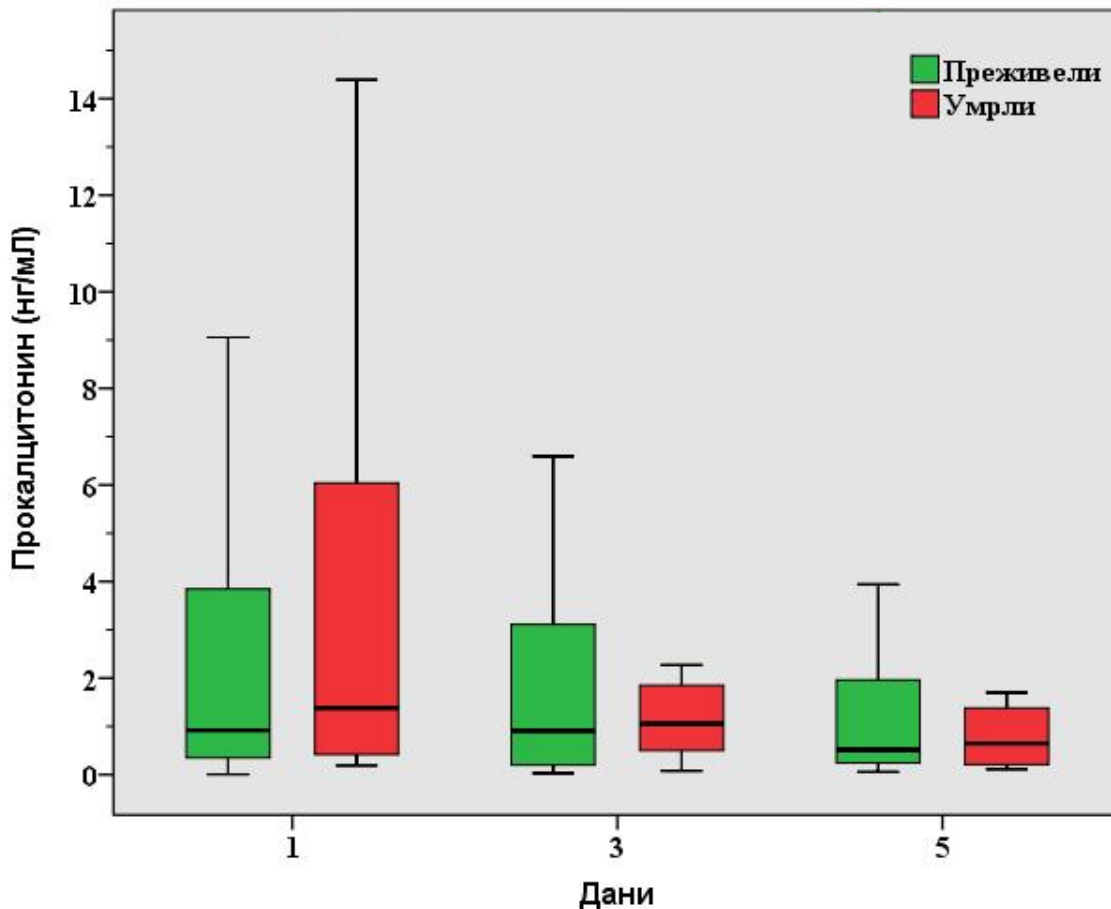
Табела 4.2.2.2. Вредности прокалцитонина (нг/мЛ) у три временска интервала према исходу

Време (дани)	Преживели (n=54) средња вредност \pm СД; М; (мин-макс)	Умрли (n=32) средња вредност \pm СД; М; (мин-макс)	вредност п
први	5.51 \pm 12.00; 0.92; (0.007 – 61.62)	7.22 \pm 15.16; 1.38; (0.19 – 69.15)	p>0.05
трећи	7.73 \pm 28.26; 0.91; (0.03 – 185.57)	14.56 \pm 57.68; 1.05; (0.08 – 259.48)	p>0.05
пети	3.12 \pm 9.42; 0.51; (0.06 – 60.36)	1.90 \pm 3.27; 0.64; (0.11 – 11.10)	p>0.05

СД – стандардна девијација; М - медијана; Мин – минимална вредност; Макс – максимална вредност

Статистичком анализом је утврђено да не постоји статистички значајна разлика у вредностима прокалцитонина у односу на пол и старост пацијената; на врсту бактеријског проузроковача изолованог хемокултуром, као ни у односу на основно обољење које је довело до секундарне сепсе ни у једном од три временска интервала.

Графикон 4.2.2.1. Вредности прокалцитонина (нг/мЛ) у три временска интервала према исходу



4.2.3. Ц-РЕАКТИВНИ ПРОТЕИН (ЦРП)

Средње вредности, стандардне девијације, медијане, распони између минималне и максималне вредности Ц-реактивног протеина у три временска интервала (први, трећи и пети дан) приказане су код свих пацијената на табели 4.2.3.1.

Табела 4.2.3.1. Вредности Ц-реактивног протеина (мг/Л) у три временска интервала код свих пацијената

Време (дани)	Средња вредност	Стандардна девијација	Медијана	Распон вредности (минимална – максимална)
први	177.59	83.147	172.66	6.37 – 396.97
трећи	162.50	81.037	156.97	10.15 – 412.79
пети	135.54	67.079	129.00	11.16 – 305.34

Статистичком анализом утврђено је да постоји статистички значајна разлика у вредностима Ц-реактивног протеина између преживелих и умрлих петог дана (). У прва два временска интервала (први и трећи дан) ова разлика није достигла статистичку значајност (табела 4.2.3.2. и графикон 4.2.3.1.).

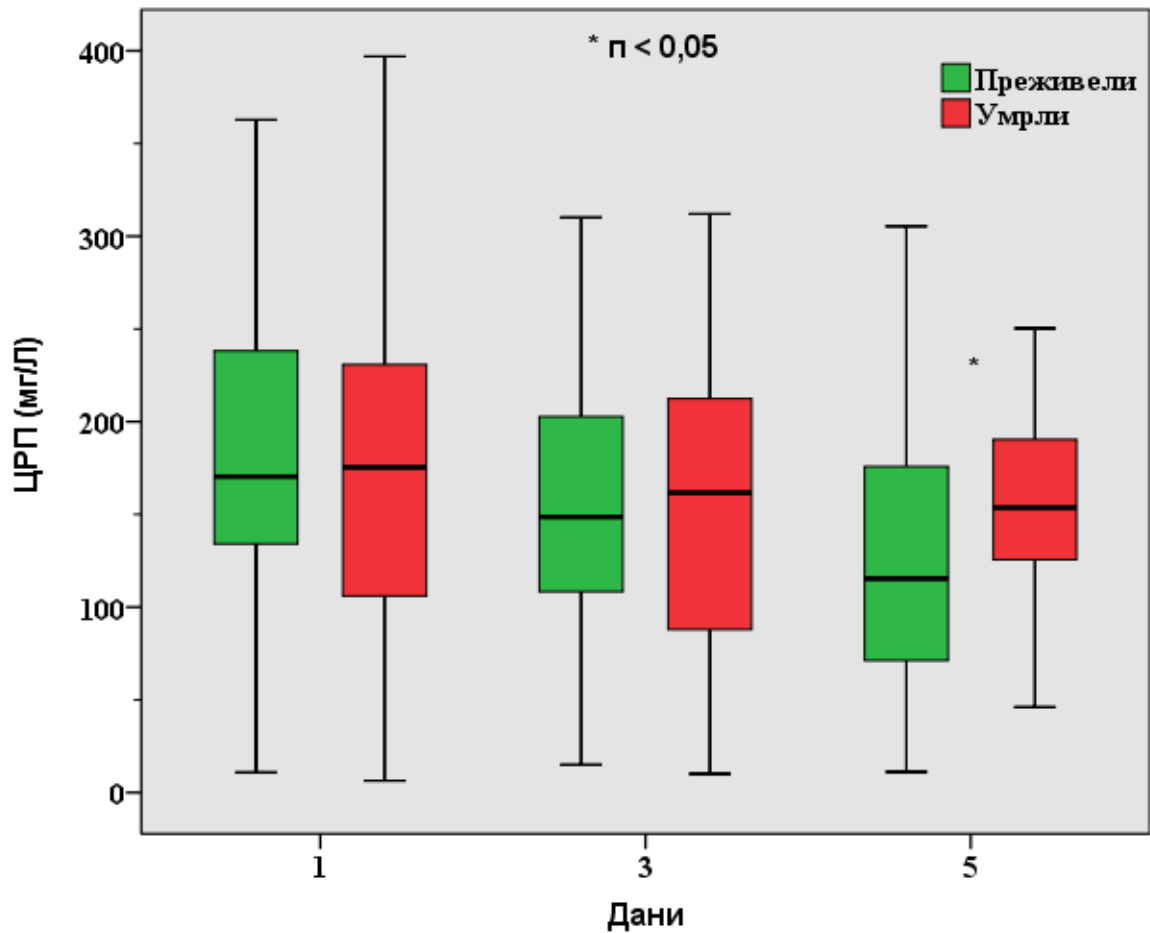
Табела 4.2.3.2. Вредности Ц-реактивног протеина (мг/Л) у три временска интервала према исходу

Време (дани)	Преживели (n=54)	Умрли (n=32)	вредност п
	средња вредност ± СД; М; (мин-макс)	средња вредност ± СД; М; (мин-макс)	
први	179.65 ± 76.04; 170.37; (10.95 – 362.87)	174.24 ± 94.75; 175.44; (6.37 – 396.97)	п>0.05
трећи	165.29 ± 80.36; 152.77; (14.97 – 412.79)	156.69 ± 83.78; 161.71; (10.15 – 312.08)	п>0.05
пети	126.98 ± 70.39; 115.28; (11.16 – 305.34)	156.72 ± 53.85; 153.63; (46.08 – 250.38)	п<0.05

СД – стандардна девијација; М - медијана; Мин – минимална вредност; Макс – максимална вредност

Статистичком анализом је утврђено да не постоји статистички значајна разлика у вредностима Ц-реактивног протеина у односу на пол и старост пацијената; на врсту бактеријског проузроковача изолованог хемокултуром, као ни у односу на основно обољење које је довело до секундарне сепсе ни у једном од три временска интервала.

Графикон 4.2.3.1. Вредности Ц-реактивног протеина (мг/Л) у три временска интервала према исходу



4.2.4. СРЕДЊИ ВОЛУМЕН ТРОМБОЦИТА (*MEAN PLATELET VOLUME*) – МПВ

Средње вредности, стандардне девијације, медијане, распони између минималне и максималне вредности МПВ у три временска интервала (први, трећи и пети дан) приказане су код свих пацијената на табели 4.2.4.1.

Табела 4.2.4.1. Вредности МПВ (фЛ) у три временска интервала код свих пацијената

Време (дани)	Средња вредност	Стандардна девијација	Медијана	Распон вредности (минимална – максимална)
први	9.08	1.43	8.85	7.00 – 16.10
трећи	9.09	1.40	9.00	6.60 – 14.60
пети	9.10	1.72	8.90	6.50 – 15.00

Статистичком анализом утврђено је да постоји статистички значајна разлика у вредностима МПВ између преживелих и умрлих трећег и петог дана; првог дана разлика није достигла статистичку значајност (табела 4.2.4.2. и графикон 4.2.4.1.)

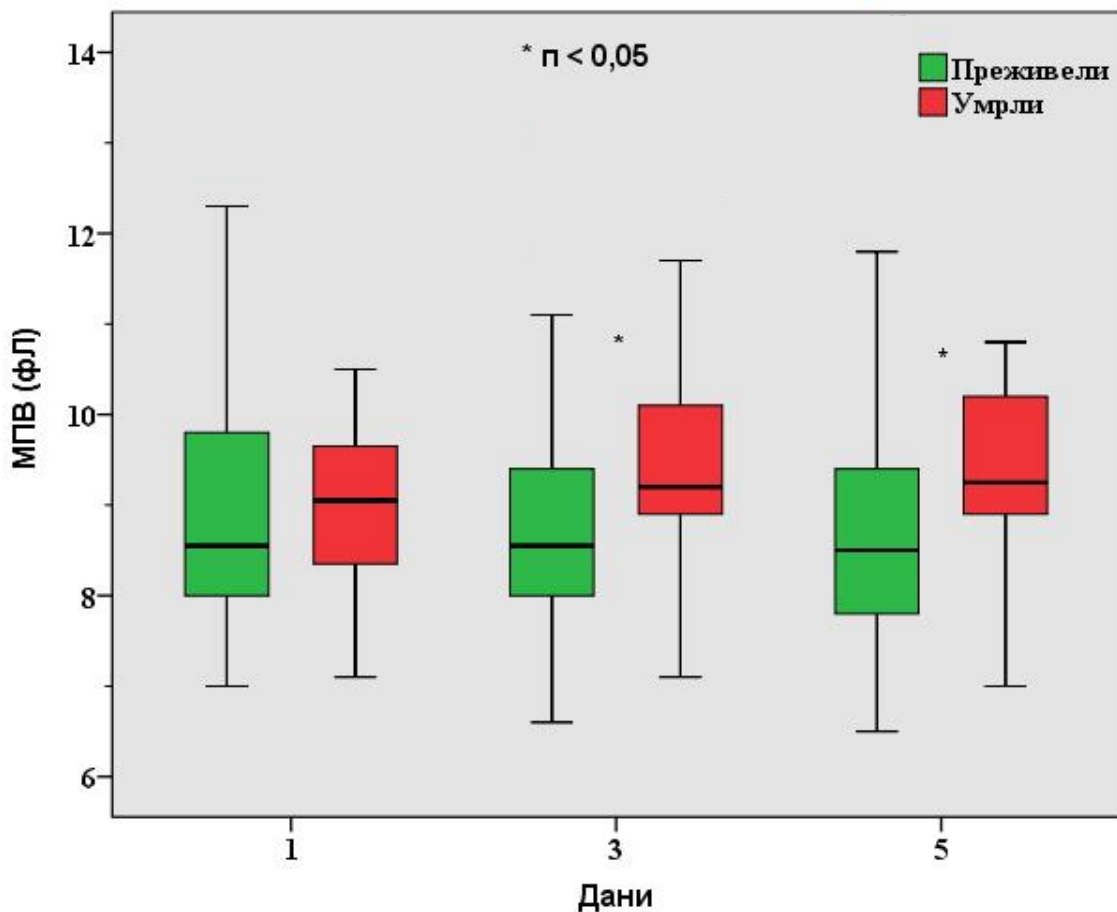
Табела 4.2.4.2. Вредности МПВ (фЛ) у три временска интервала према исходу

Време (дани)	Преживели (n=54) средња вредност \pm СД; М; (мин-макс)	Умрли (n=32) средња вредност \pm СД; М; (мин-макс)	вредност п
први	9.00 \pm 1.37; 8.55; (7.00 – 12.90)	9.22 \pm 1.54; 9.05; (7.10 – 16.10)	p>0.05
трећи	8.85 \pm 1.31; 8.55; (6.60 – 13.00)	9.57 \pm 1.49; 9.20; (7.10 – 14.60)	p<0.05
пети	8.86 \pm 1.65; 8.50; (6.50 – 14.30)	9.71 \pm 1.77; 9.25; (7.00 – 15.00)	p<0.05

СД – стандардна девијација; М - медијана; Мин – минимална вредност; Макс – максимална вредност

Статистичком анализом је утврђено да не постоји статистички значајна разлика у вредностима МПВ у односу на пол и старост пацијената; на врсту бактеријског проузроковача изолованог хемокултуром, као ни у односу на основно обољење које је довело до секундарне сепсе ни у једном од три временска интервала.

Графикон 4.2.4.1. Вредности МПВ (фЛ) у три временска интервала према исходу



4.2.5. ЛАКТАТИ

Средње вредности, стандардне девијације, медијане, распони између минималне и максималне вредности лактата у три временска интервала (први, трећи и пети дан) приказане су код свих пацијената на табели 4.2.5.1.

Табела 4.2.5.1. Вредности лактата (ммол/Л) у три временска интервала код свих пацијената

Време (дани)	Средња вредност	Стандардна девијација	Медијана	Распон вредности (минимална – максимална)
први	2.01	2.16	1.20	0.50 – 15.00
трећи	1.23	1.00	1.00	0.20 – 7.40
пети	1.02	0.59	0.80	0.20 – 4.30

Статистичком анализом утврђено је да постоји статистички значајна разлика у вредностима лактата између преживелих и умрлих трећег дана; првог и петог дана разлика није достигла статистичку значајност (табела 4.2.5.2. и графикон 4.2.5.1.)

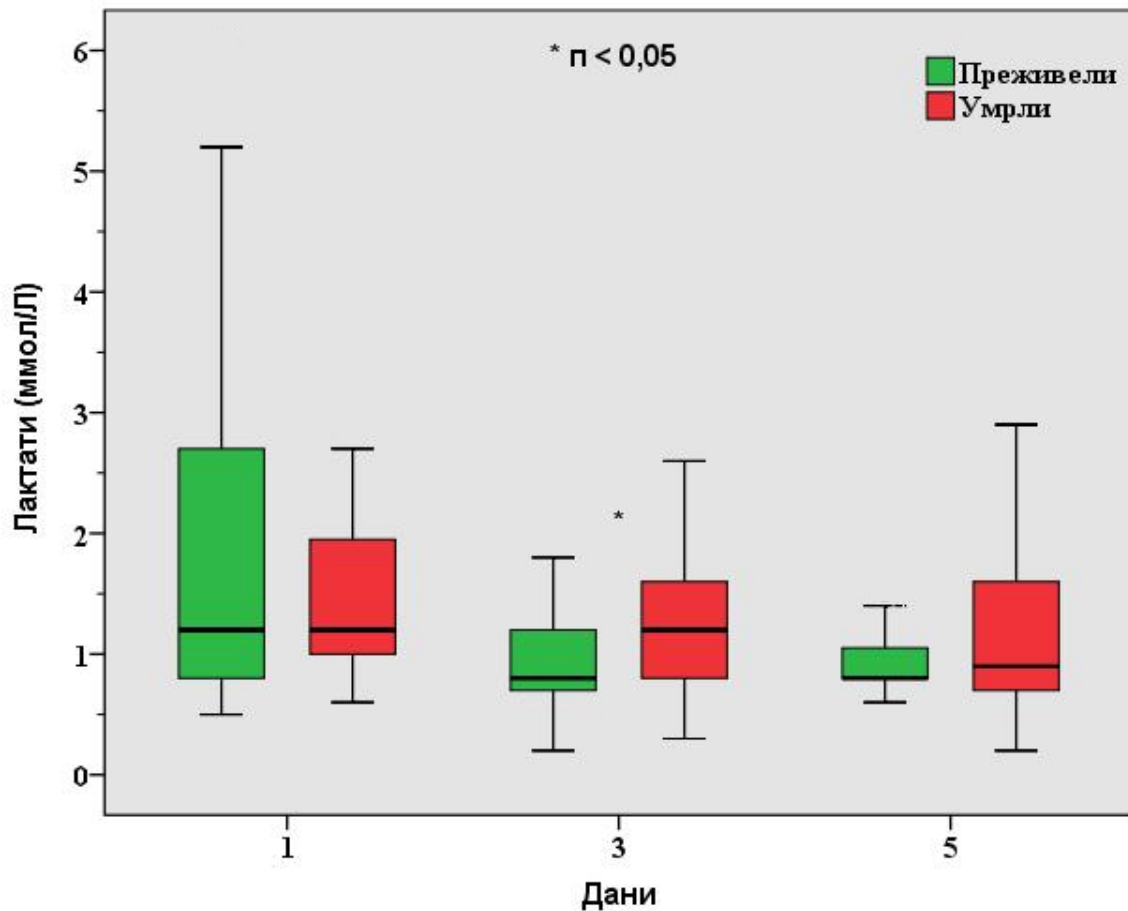
Табела 4.2.5.2. Вредности лактата (ммол/Л) у три временска интервала према исходу

Време (дани)	Преживели (n=54) средња вредност ± СД; М; (мин-макс)	Умрли (n=32) средња вредност ± СД; М; (мин-макс)	вредност п
први	2.00 ± 1.90; 1.20; (0.50 – 9.70)	2.03 ± 2.58; 1.20; (0.60 – 15.00)	п>0.05
трећи	1.06 ± 0.66; 0.80; (0.20 – 4.30)	1.59 ± 1.42; 1.20; (0.30 – 7.40)	п<0.05
пети	0.90 ± 0.26; 0.80; 0.50 – 1.60)	1.34 ± 0.97; 0.95; (0.20 – 4.30)	п>0.05

СД – стандардна девијација; М - медијана; Мин – минимална вредност; Макс – максимална вредност

Статистичком анализом је утврђено да не постоји статистички значајна разлика у вредностима лактата у односу на пол и старост пацијената; на врсту бактеријског проузроковача изолованог хемокултуром, као ни у односу на основно обољење које је довело до секундарне сепсе ни у једном од три временска интервала.

Графикон 4.2.5.1. Вредности лактата (ммол/Л) у три временска интервала према исходу



4.2.6. ПАРАМЕТРИ ИНФЛАМАТОРНОГ ОДГОВОРА У ТРИ ВРЕМЕНСКА ИНТЕРВАЛА УНУТАР ГРУПА ПРЕМА ИСХОДУ (ПРЕЖИВЕЛИ, УМРЛИ)

Средње вредности, стандардне девијације, медијане, распони између минималне и максималне вредности пресепсина (табела 4.2.6.1.), прокалцитонина (табела 4.2.6.2.), Ц-реактивног протеина (табела 4.2.6.3.), МПВ (табела 4.2.6.4.), лактата (табела 4.2.6.5.) и броја тромбоцита (табела 4.2.6.6.) у три временска интервала (први, трећи и пети дан) приказане су у групи преживелих и у групи умрлих пацијената.

Табела 4.2.6.1. Вредности пресепсина (пг/мЛ) у три временска интервала у групи преживелих и у групи умрлих пацијената

Време (дани)	Исход	Средња вредност	Стандардна девијација	Медијана	Распон вредности (минимална – максимална)
први	преживели	1068.59	1105.38	722.50	101.00 – 5315.00
	умрли	1217.64	922.28	926.50	214.00 – 4102.00
трећи	преживели	920.98	1172.52	530.00	67.30 – 5880.00
	умрли	1109.40	928.58	794.50	425.00 – 4551.00
пети	преживели	683.23	991.49	473.50	52.60 – 7123.00
	умрли	1323.86	1171.99	836.00	345.00 – 5142.00

Табела 4.2.6.2. Вредности прокалцитонина (нг/мЛ) у три временска интервала у групи преживелих и у групи умрлих пацијената

Време (дани)	Исход	Средња вредност	Стандардна девијација	Медијана	Распон вредности (минимална – максимална)
први	преживели	5.63	12.12	0.99	0.007 – 61.62
	умрли	2.35	4.19	0.73	0.19 – 14.39
трећи	преживели	8.08	28.88	0.97	0.03 – 185.57
	умрли	1.23	1.69	0.62	0.08 – 6.94
пети	преживели	3.19	9.52	0.53	0.06 – 60.36
	умрли	1.29	2.48	0.56	0.11 – 10.10

Табела 4.2.6.3. Вредности Ц-реактивног протеина (мг/Л) у три временска интервала у групи преживелих и у групи умрлих пацијената

Време (дани)	Исход	Средња вредност	Стандардна девијација	Медијана	Распон вредности (минимална – максимална)
први	преживели	181.94	74.96	172.62	10.95 – 362.87
	умрли	174.42	106.07	178.19	6.37 – 396.97
трећи	преживели	166.66	80.55	156.97	14.97 – 412.79
	умрли	156.12	81.86	161.71	10.15 – 312.08
пети	преживели	126.15	70.83	113.14	11.16 – 305.34
	умрли	156.78	52.76	153.63	46.08 – 250.38

Табела 4.2.6.4. Вредности МПВ (фЛ) у три временска интервала у групи преживелих и у групи умрлих пацијената

Време (дани)	Исход	Средња вредност	Стандардна девијација	Медијана	Распон вредности (минимална – максимална)
први	преживели	9.00	1.37	8.55	7.00 – 12.90
	умрли	9.33	1.74	9.05	7.10 – 16.10
трећи	преживели	8.85	1.31	8.55	6.60 – 13.00
	умрли	9.60	1.59	9.15	7.10 – 14.60
пети	преживели	8.86	1.65	8.50	6.50 – 14.30
	умрли	9.71	1.77	9.25	7.00 – 15.00

Табела 4.2.6.5. Вредности лактата (ммол/Л) у три временска интервала у групи преживелих и у групи умрлих пацијената

Време (дани)	Исход	Средња вредност	Стандардна девијација	Медијана	Распон вредности (минимална – максимална)
први	преживели	2.00	1.90	1.20	0.50 – 9.70
	умрли	1.85	2.96	1.20	0.60 – 15.00
трећи	преживели	1.06	0.66	0.80	0.20 – 4.30
	умрли	1.49	1.51	1.10	0.30 – 7.40
пети	преживели	0.90	0.26	0.80	0.50 – 1.60
	умрли	1.34	0.97	0.95	0.20 – 4.30

Табела 4.2.6.6. Вредности броја тромбоцита ($10^9/Л$) у три временска интервала у групи преживелих и у групи умрлих пацијената

Време (дани)	Исход	Средња вредност	Стандардна девијација	Медијана	Распон вредности (минимална – максимална)
први	преживели	241.42	142.75	199.00	53.20 – 623.00
	умрли	200.73	116.83	183.00	26.90 – 503.00
трећи	преживели	255.76	169.12	210.00	61.10 – 735.00
	умрли	195.07	90.51	188.00	48.00 – 409.00
пети	преживели	281.36	167.18	238.50	52.60 – 724.00
	умрли	219.02	107.78	232.00	49.10 – 399.00

Статистичка анализа је показала да се вредности МПВ нису значајно разликовале у три временска интервала ни у групи преживелих ни у групи умрлих пацијената. Вредности пресепсина, прокалцитонина, Ц-реактивног протеина и лактата значајно су се разликовале у три временска интервала унутар групе преживелих, док се број тромбоцита значајно разликовао у три временска интервала и унутар групе преживелих и унутар групе умрлих. Ова општа значајност разлике додатно је анализирана пост-хок *Mann-Whitney U* тестом поређења између парова група да би се утврдило егзактно између којих временских интервала постоји статистички значајна разлика у вредностима параметара унутар група што је приказано на табели 4.2.6.7.

Осим броја тромбоцита, сви остали параметри су се значајно разликовали само у групи преживелих.

Табела 4.2.6.7. Поређење вредности пресепсина, прокалцитонина, Ц-реактивног протеина, лактата и броја тромбоцита између три временска интервала унутар групе преживелих и групе умрлих

Параметар	пресепсин		прокалцитонин		Ц - реактивни протеин		број тромбоцита		лактати	
	преживели	умрли	преживели	умрли	преживели	умрли	преживели	умрли	преживели	умрли
<i>Chi-square</i> <i>Friedman Test</i>	23.284 п<0.01	0.273 п>0.05	9.682 п<0.01	3.763 п>0.05	19.241 п<0.01	1.263 п>0.05	19.411 п<0.01	6.909 п<0.05	28.583 п<0.01	1.848 п>0.05
z 3. дан / 1. дан	-3.225 п<0.01		-0.755 п>0.05		-0.984 п>0.05		-1.567 п>0.05	-0.432 п>0.05	-4.591 п<0.01	
z 5. дан / 1. дан	-3.687 п<0.01		-2.210 п<0.05		-3.684 п<0.01		-3.200 п<0.01	-1.737 п<0.05	-4.817 п<0.01	
z 5. дан / 3. дан	-2.734 п<0.01		-3.496 п<0.01		-3.799 п<0.01		-3.723 п<0.01	-2.078 п<0.05	-1.825 п<0.05	

4.2.7. КОРЕЛАЦИЈА ИЗМЕЂУ ПАРАМЕТАРА ИНФЛАМАТОРНОГ ОДГОВОРА У ТРИ ВРЕМЕНСКА ИНТЕРВАЛА УНУТАР ГРУПА ПРЕМА ИСХОДУ (ПРЕЖИВЕЛИ, УМРЛИ)

Корелација између параметара инфламаторног одговора у три временска интервала унутар група преживелих и умрлих анализирана је *Spearman*-овим тестом да би се утврдио коефицијент корелације ρ .

Првог дана утврђена је статистички значајна позитивна корелација између вредности лактата и прокалцитонина ($\rho = 0.414$; $p = 0.005$) у групи преживелих. Такође, утврђена је статистички значајна позитивна корелација између вредности пресепсина и прокалцитонина у групи умрлих ($\rho = 0.466$; $p = 0.014$).

Трећег дана је утврђена статистички значајна позитивна корелација између више параметара инфламаторног одговора у групи преживелих што је приказано на табели 4.2.7.1. Није било статистички значајних корелација између параметара инфламаторног одговора у групи умрлих у овом временском интервалу

Табела 4.2.7.1. *Spearman* ρ корелације између параметара инфламаторног одговора у групи преживелих трећег дана

Параметар	Прокалцитонин	Лактати
Пресепсин	$\rho = 0.503$ $p = 0.000$	
МПВ		$\rho = 0.279$ $p = 0.041$

Петог дана утврђена је статистички значајна позитивна корелација између вредности пресепсина са једне стране и прокалцитонина ($\rho = 0.504$; $p = 0.000$) и броја леукоцита ($\rho = 0.452$; $p = 0.001$) са друге стране у групи преживелих.

У групи умрлих, утврђена је статистички значајна позитивна корелација између више параметара инфламаторног одговора што је приказано на табели 4.2.7.2.

Табела 4.2.7.2. *Spearman* ρ корелације између параметара инфламаторног одговора у групи умрлих петог дана

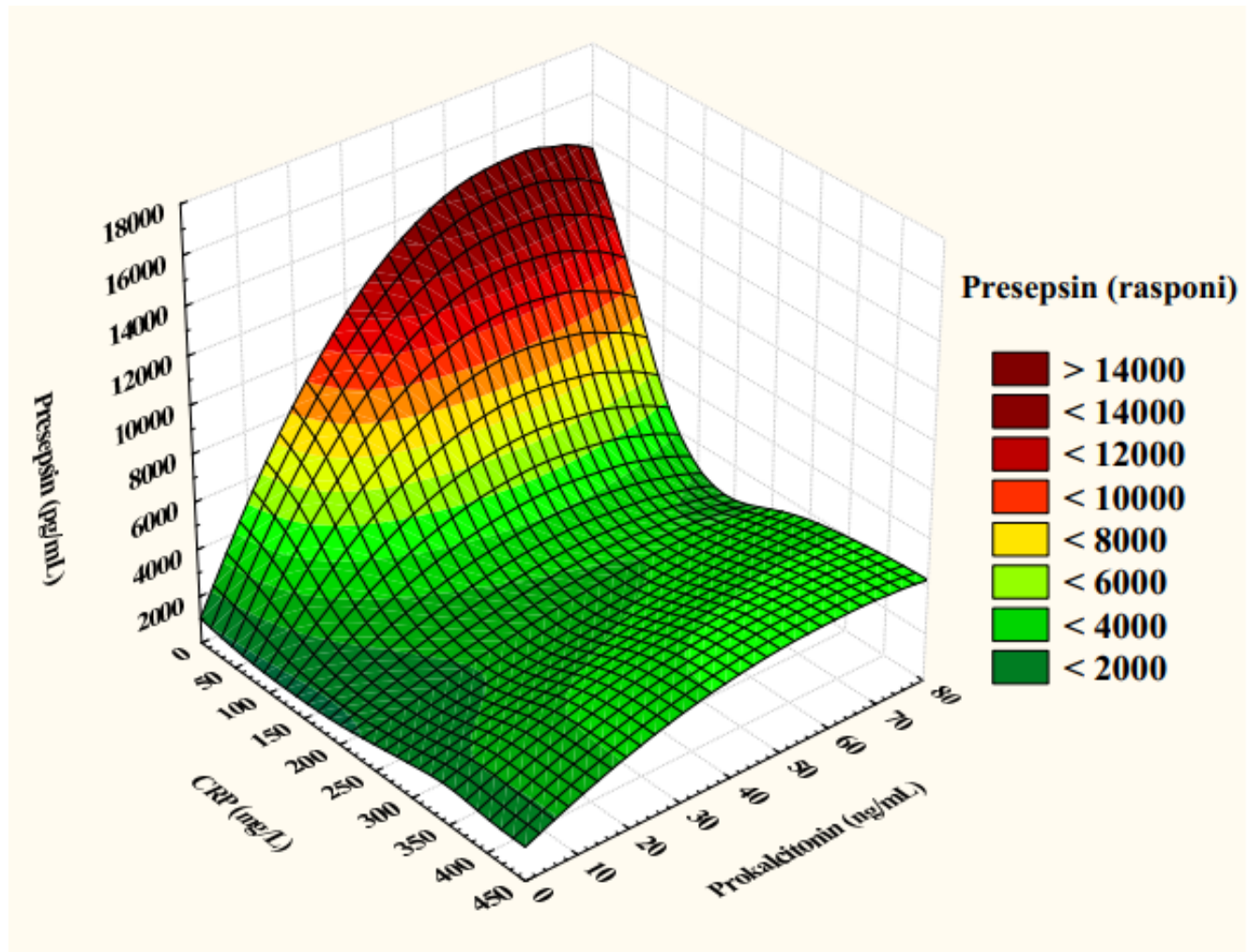
Параметар	Прокалцитонин	Број леукоцита
Пресепсин	$\rho = 0.465$ $p = 0.045$	
Лактати		$\rho = 0.662$ $p = 0.001$

Генерално гледано, када се у обзир узму сви пацијенти, утврђено је више статистички значајних и високо значајних позитивних корелација између неких од испитиваних параметара инфламаторног одговора. Без обзира на статистичку значајност, већина корелација је била слаба

(ρ испод или око 0.5) са изузетком корелације између лактата и броја леукоцита петог дана у групи умрлих, која је била добра ($\rho = 0.66$).

Однос вредности пресепсина, прокалцитонина и Ц-реактивног протеина за целокупну популацију пацијената приказан је на графикону 4.2.7.1.

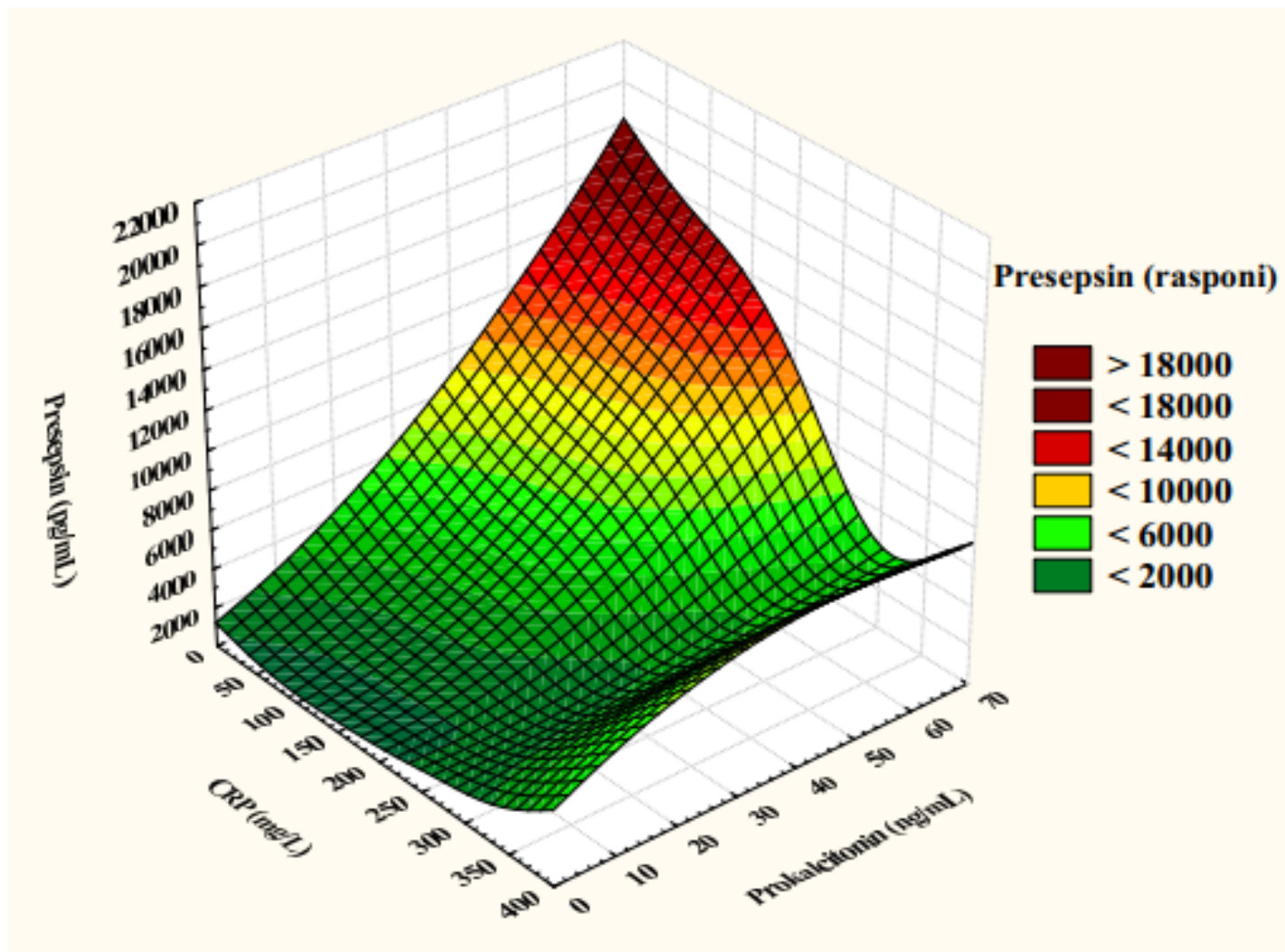
Графикон 4.2.7.1. Однос вредности пресепсина, прокалцитонина и Ц-реактивног протеина за све пацијенте



Максимални нивои пресепсина могу се очекивати при распону Ц-реактивног протеина 0 до 100 мг/Л и при вредностима прокалцитонина већим од 20 нг/мЛ у целокупној популацији пацијената.

Однос вредности пресепсина, прокалцитонина и Ц-реактивног протеина у групи преживелих пацијената приказан је на графикону 4.2.7.2.

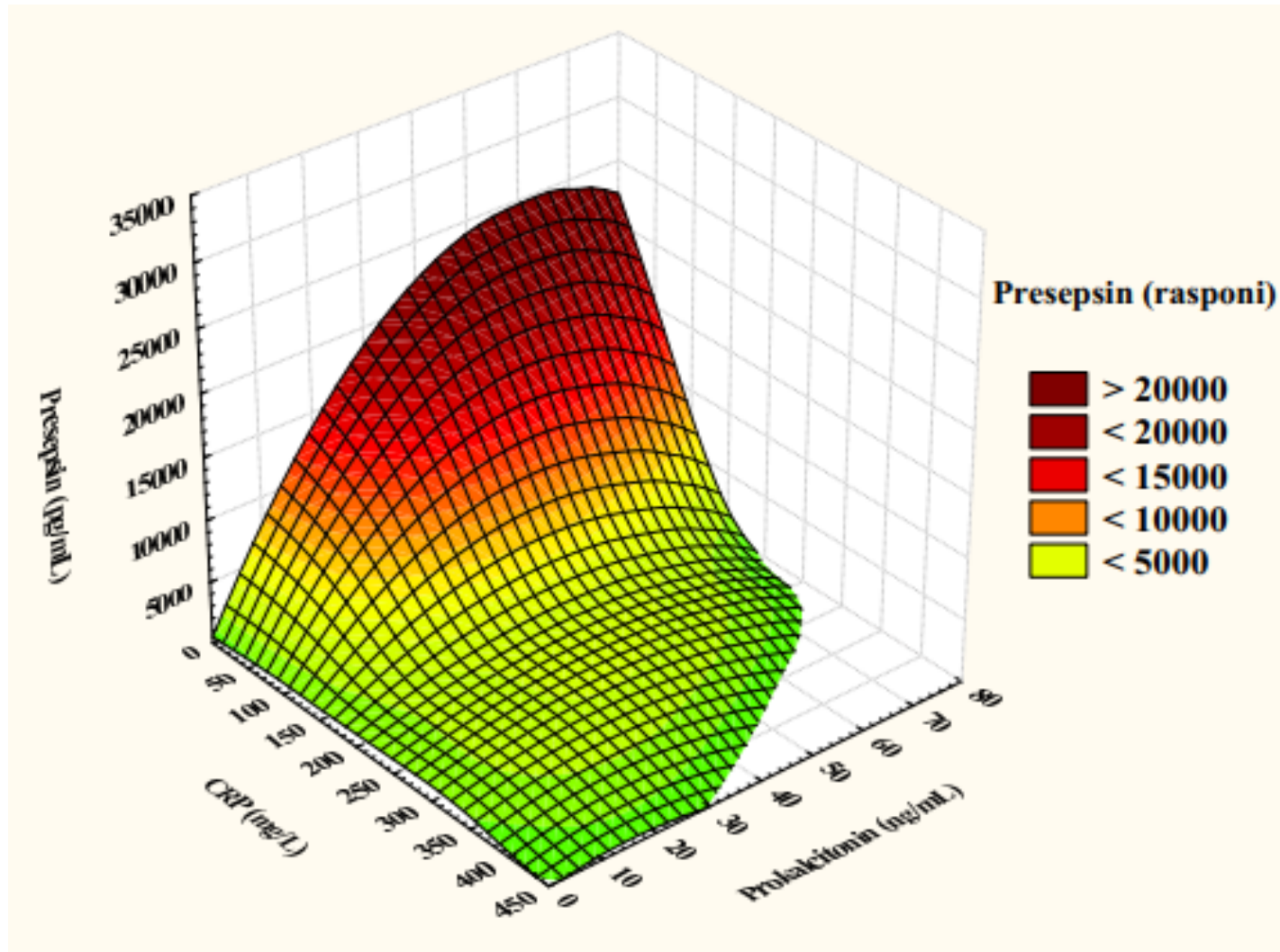
Графикон 4.2.7.2. Однос вредности пресепсина, прокалцитонина и Ц-реактивног протеина у групи преживелих пацијената



Максимални нивои пресепсина могу се очекивати при распону Ц-реактивног протеина од 0 до до 200 мг/Л и при вредностима прокалцитонина већим од 40 нг/мЛ у групи преживелих пацијената.

Однос вредности пресепсина, прокалцитонина и Ц-реактивног протеина у групи умрлих пацијената приказан је на графикону 4.2.7.3.

Графикон 4.2.7.3. Однос вредности пресепсина, прокалцитонина и Ц-реактивног протеина у групи умрлих пацијената



Максимални нивои пресепсина могу се очекивати при распону Ц-реактивног протеина од 0 до до 150 мг/Л и при вредностима прокалцитонина већим од 10 нг/мЛ у групи умрлих пацијената.

Генерално, високи нивои пресепсина могу бити праћени и ниским концентрацијама Ц-реактивног протеина, али су увек праћени повишеним концентрацијама прокалцитонина.

4.2.8. ПАРАМЕТРИ ИНФЛАМАТОРНОГ ОДГОВОРА КАО ПРЕДИКТОРИ ЛЕТАЛНОГ ИСХОДА

Клиничка тачност параметара инфламаторног одговора у предикцији леталног исхода испитивана је у свим временским интервалима. Првог дана, осим примењених скорова (*SAPS II*, *APACHE II*, *SOFA*), само је пресепсин показао статистички значајну способност предикције

леталног исхода. Вредности сва три скорa, као и нивои пресепсина већи од *cut-off* вредности су умерено добри предиктори леталног исхода (табела 4.2.8.1.).

Табела 4.2.8.1. Клиничка тачност параметара инфламаторног одговора у предикцији леталног исхода првог дана

Параметар	<i>AUC ROC</i>	вредност p	95% Интервал поверења		<i>Cut-off</i> вредност	Сензитивност (%)	Специфичност (%)	<i>Youden-ов</i> индекс
			Доња граница	Горња граница				
<i>APACHE II</i>	0.647	0.023	0.524	0.770	15.50	43.8	81.5	0.25
<i>SAPS II</i>	0.637	0.034	0.511	0.764	47.50	34.4	92.6	0.27
<i>SOFA</i>	0.623	0.045	0.498	0.748	5.50	56.3	68.5	0.25
Пресепсин	0.670	0.009	0.554	0.786	812.50	71.9	57.4	0.29

Трећег дана, осим вредности *SAPS II* и *SOFA* скорa, три параметра инфламаторног одговора: пресепсин, МПВ и лактати, били су статистички значајни предиктори исхода. Вредности скорова, као и нивои пресепсина, МПВ и лактата већи од *cut-off* вредности су добри предиктори леталног исхода (табела 4.2.8.2.).

Табела 4.2.8.2. Клиничка тачност параметара инфламаторног одговора у предикцији леталног исхода трећег дана

Параметар	<i>AUC ROC</i>	вредност p	95% Интервал поверења		<i>Cut-off</i> вредност	Сензитивност (%)	Специфичност (%)	<i>Youden-ов</i> индекс
			Доња граница	Горња граница				
<i>SAPS II</i>	0.701	0.003	0.580	0.821	30.50	74.1	63.0	0.37
<i>SOFA</i>	0.662	0.018	0.539	0.784	3.50	88.9	64.8	0.35
Пресепсин	0.716	0.002	0.606	0.825	539.50	88.9	51.9	0.41
МПВ	0.667	0.015	0.546	0.788	8.65	85.2	53.7	0.39
Лактати	0.642	0.039	0.503	0.781	1.15	55.6	70.4	0.26

Петог дана, осим вредности *SAPS II* и *SOFA* скорa, четири параметра инфламаторног одговора: пресепсин, МПВ, Ц-реактивни протеин и број леукоцита, били су статистички значајни предиктори исхода. Вредности скорова, као и нивои пресепсина, МПВ, Ц-реактивног протеина и број леукоцита већи од *cut-off* вредности су веома добри предиктори леталног исхода (табела 4.2.8.3.).

Табела 4.2.8.3. Клиничка тачност параметара инфламаторног одговора у предикцији леталног исхода петог дана

Параметар	<i>AUC ROC</i>	вредност p	95% Интервал поверења		<i>Cut-off</i> вредност	Сензитивност (%)	Специфичност (%)	<i>Youden-ов</i> индекс
			Доња граница	Горња граница				
<i>SAPS II</i>	0.813	0.000	0.696	0.929	39.00	68.2	90.7	0.59
<i>SOFA</i>	0.761	0.000	0.645	0.876	3.50	90.9	55.6	0.46
Пресепсин	0.790	0.000	0.688	0.893	639.50	81.8	72.2	0.54
МПВ	0.681	0.014	0.557	0.806	8.85	81.8	61.1	0.43
ЦРП	0.643	0.040	0.518	0.779	118.56	81.0	51.9	0.33
Леукоцити	0.654	0.036	0.518	0.791	14.90	45.5	85.2	0.31

4.2.8.1. КОМБИНАЦИЈА ПРЕСЕПСИНА, МПВ И ЛАКТАТА У КОМПОЗИТНИ БИОСКОР

Комбинација пресепсина, МПВ и лактата у један композитни биоскор трећег дана је спроведена да би се утврдило да ли би се тиме побољшала способност предикције леталног исхода. Индивидуалне вредности параметара су скорирани са 0 бодова или 1 бодом у зависности од тога да ли су испод или изнад претходно утврђених *cut-off* нивоа применом *ROC* анализе. Овај композитни биоскор има распон од 0 до 3 бода.

Трећег дана, композитни биоскор је показао статистички високо значајну способност предикције леталног исхода. Вредности веће од *cut-off* нивоа су веома добри предиктори леталног исхода (табела 4.2.8.1.1.)

Табела 4.2.8.1.1. Клиничка тачност композитног биоскора у предикцији леталног исхода трећег дана

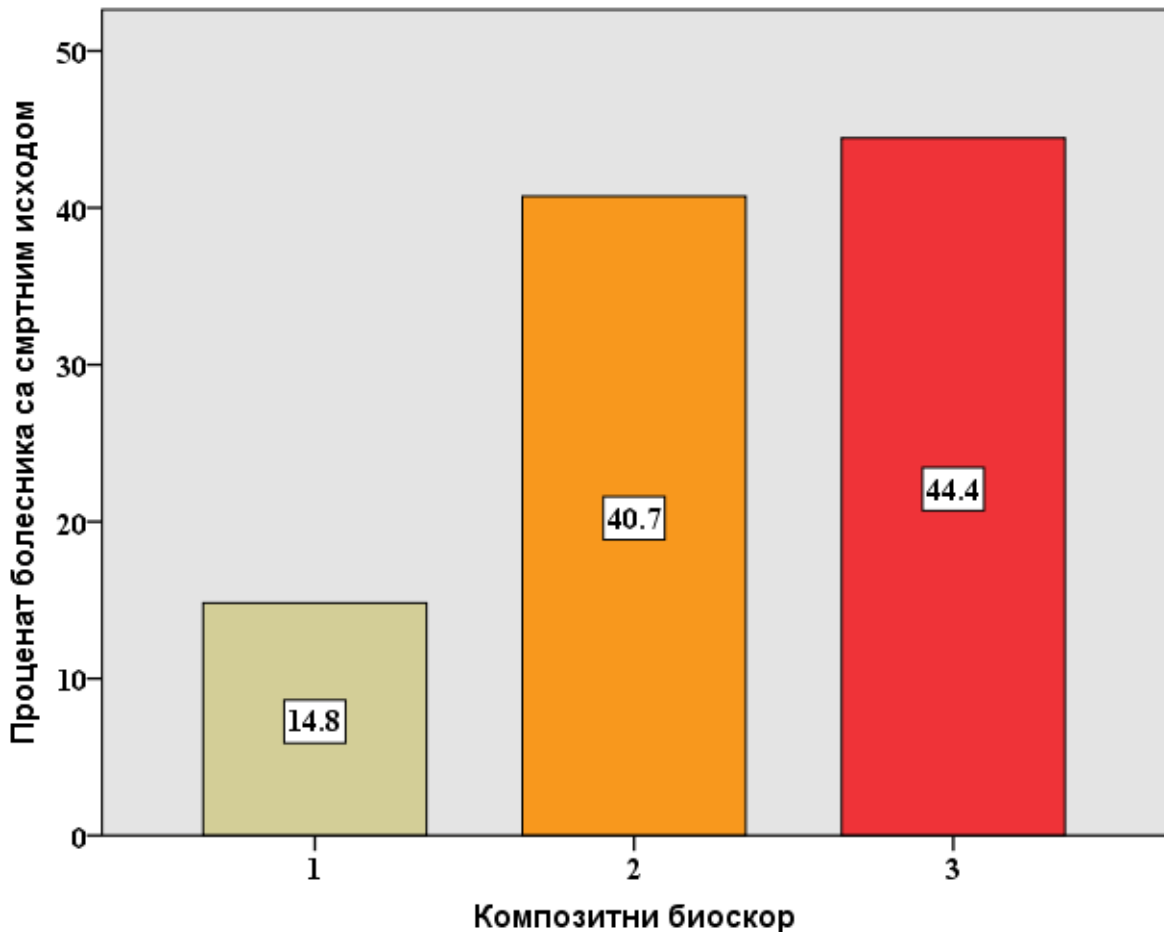
Композитни биоскор	<i>AUC ROC</i>	вредност п	95% Интервал поверења		<i>Cut-off</i> вредност	Сензитивност (%)	Специфичност (%)	<i>Youden</i> -ов индекс
			Доња граница	Горња граница				
	0.820	0.000	0.701	0.895	2.00	75.8	78.0	0.51

Трећег дана композитни биоскор је имао највећу *AUC/ROC* вредност и најбољу комбинацију сензитивности и специфичности, што се види по високом *Youden*-овом индексу који је већи од 0.5, у поређењу са индивидуалним скоровима и параметрима.

Тек петог дана вредности *SAPS II* скорa и пресепсина су достигле прогностичку снагу композитног биоскора. Треба имати у виду да се то десило цела два дана касније, што је прилично дуг временски период за критично оболеле са секундарном сепсом.

На графикону 4.2.8.1.1. приказан је проценат умрлих према свакој вредности композитног биоскора у бодовима трећег дана.

Графикон 4.2.8.1.1. Процент умрлих према сваком боду композитног биоскора трећег дана



4.2.8.2. НЕЗАВИСНИ ПРОГНОСТИЧКИ ЗНАЧАЈ ПАРАМЕТАРА ИНФЛАМАТОРНОГ ОДГОВОРА У ПРЕДИКЦИЈИ ЛЕТАЛНОГ ИСХОДА

Повезаност испитиваних параметара инфламаторног одговора и леталног исхода процењивана је униваријантном логистичком регресионом анализом. Однос шанси (*Odds ratio – OR*) са 95%-ним интервалом поверења (*Confidence Interval – CI*) је израчунат за сваки параметар. Даљи мултиваријантни логистички регресиони модел је коришћен да се утврде потенцијални независни предиктори леталног исхода, без могућих других утицаја, у сваком временском интервалу.

На табели 4.2.8.2.1. приказана је униваријантна и мултиваријантна логистичка регресиона анализа параметара инфламаторног одговора у предикцији леталног исхода првог, трећег и петог дана. Једини независни предиктор леталног исхода утврђен мултиваријантном логистичком регресионом анализом првог дана је пресепсин.

Трећег дана, униваријантна логистичка регресиона анализа свих параметара показала је статистичку значајност само за МПВ. Овај биомаркер је остао независни предиктор леталног исхода потврђен и мултиваријантном регресионом анализом.

Петог дана, униваријантна логистичка регресиона анализа свих параметара инфламаторног одговора показала је статистичку значајност само за број леукоцита и вредност лактата. Оба ова параметра су изгубила статистичку значајност у мултиваријантној регресионој анализи, тако да нису били независни предиктори леталног исхода у овом временском интервалу.

Табела 4.2.8.2.1. Униваријантна и мултиваријантна логистичка регресиона анализа параметара инфламаторног одговора као предиктора леталног исхода првог, трећег и петог дана

Параметар		OR	униваријантна логистичка регресиона анализа				OR	мултиваријантна логистичка регресиона анализа			
			95% CI		п вредност			95% CI		п вредност	
Први дан	Пресепсин	1.000	1.000	1.001	0.040	1.000	1.000	1.001	0.035		
	Прокалцитонин	1.010	0.974	1.046	0.596						
	Ц-реактивни протеин	0.999	0.994	1.005	0.771						
	Број леукоцита	0.994	0.939	1.052	0.833						
	МПВ	1.113	0.822	1.507	0.489						
	Лактати	1.006	0.822	1.231	0.953						
Трећи дан	МПВ	1.440	1.017	2.039	0.030	1.634	1.110	2.405	0.008		
Пети дан	Број леукоцита	1.146	1.025	1.280	0.016						
	Лактати	4.063	1.303	12.66	0.016						

4.2.8.3. ВРЕМЕ ПРЕЖИВЉАВАЊА У ОДНОСУ НА ТЕРЦИЛЕ КОНЦЕНТРАЦИЈЕ ПРЕСЕПСИНА ПРВОГ ДАНА

Време преживљавања између три терцила концентрације пресепсина првог дана анализирано је тестом *Mantel-Cox log rank* а вероватноћа леталног исхода између три терцила анализирана је *Kaplan-Meier*-овом кривом преживљавања.

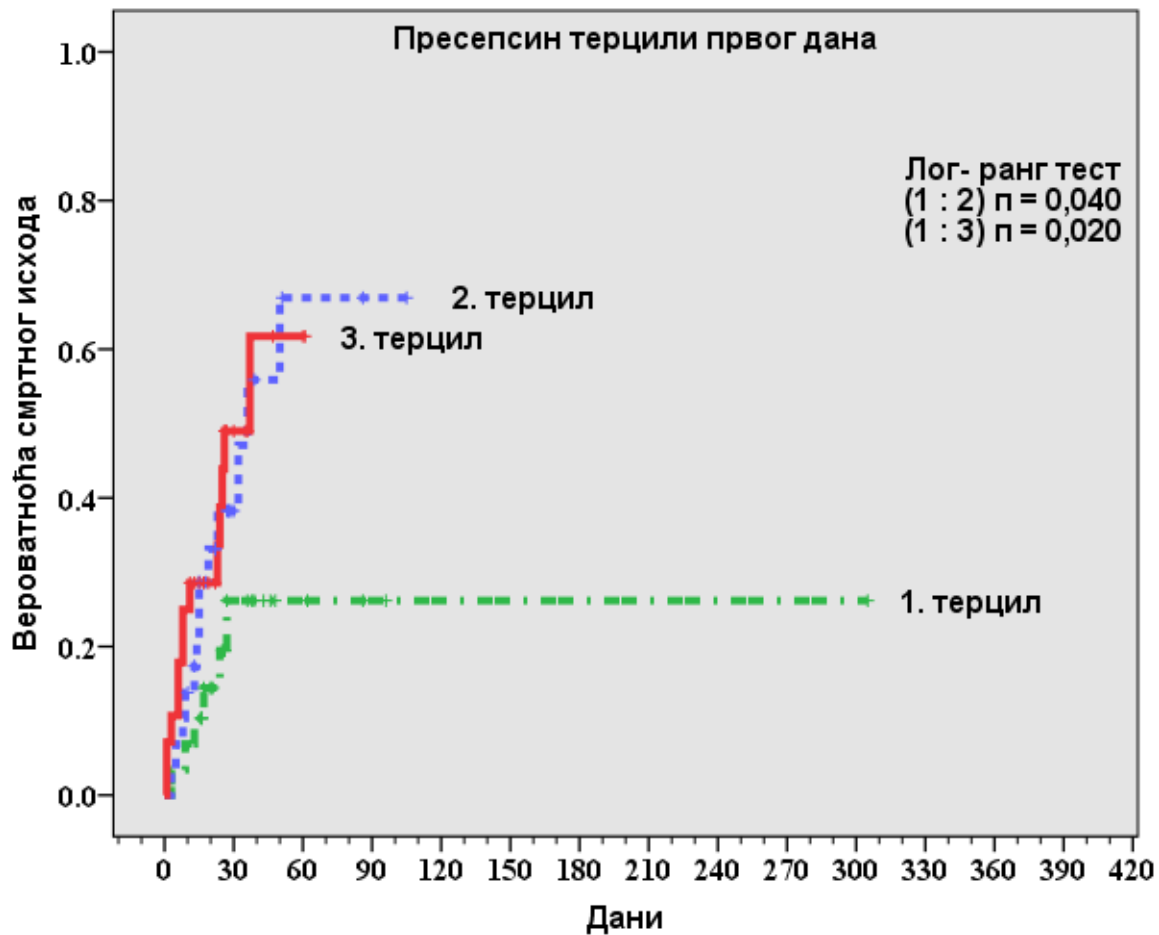
Анализа медијана преживљавања у данима, у три терцила концентрације пресепсина, показала је да је у испитиваној популацији критично оболелих са секундарном сепсом критичан био педесети дан због тога што је тог дана процењени морталитет био 50%.

Log rank поређења између парова група утврдила су да постоји статистички значајна разлика између терцила концентрације пресепсина у времену преживљавања (табела 4.2.8.3.1. и графикон 4.2.8.3.1.).

Табела 4.2.8.3.1. *Log rank* поређења времена преживљавања између терцила концентрације пресепсина првог дана

<i>Mantel Cox Log Rank</i>	Терцили пресепсина првог дана	<i>Chi-Square</i>	п вредност
	терцил 1/терцил 2	3.857	0.040
	терцил 1/терцил 3	4.671	0.020

Графикон 4.2.8.3.1. *Kaplan-Meier*-ова крива преживљавања за хоспитални морталитет у односу на терциле концентрације пресепсина првог дана



4.3. МЕЂУСОБНИ ОДНОСИ НЕУТРОФИЛА, МОНОЦИТА, ТРОМБОЦИТА И ЛИМФОЦИТА

Статистичком анализом обухваћени су следећи односи између имунокомпетентних ћелија: неутрофили/лимфоцити – НЛ, моноцити/лимфоцити – МЛ, тромбоцити/лимфоцити – ТЛ и однос између средњег волумена и броја тромбоцита – МПВ/Тр ($\text{фЛ}^{-5}\mu\text{Л}^{-1}$). Средње вредности, стандардне девијације, медијане, распони између минималне и максималне вредности свих ћелијских односа у три временска интервала (први, трећи и пети дан) приказане су код свих пацијената на табелама 4.3.1., 4.3.2 и 4.3.3.

Табела 4.3.1. Вредности МПВ/Тр, НЛ, МЛ и ТЛ првог дана

ПРВИ ДАН	МПВ/Тр	НЛ	МЛ	ТЛ
Средња вредност	5.82	13.76	0.73	281.93
Стандардна девијација	6.37	9.56	0.60	212.99
Минимална вредност	0.00	0.91	0.04	15.36
Максимална вредност	43.7	81.31	3.87	1642.85
Медијана	3.51	11.07	0.56	221.34

Табела 4.3.2. Вредности МПВ/Тр, НЛ, МЛ и ТЛ трећег дана

ТРЕЋИ ДАН	МПВ/Тр	НЛ	МЛ	ТЛ
Средња вредност	5.61	13.61	0.77	301.77
Стандардна девијација	4.22	8.97	0.46	223.51
Минимална вредност	1.15	1.12	0.13	30.87
Максимална вредност	35.93	68.36	2.74	967.11
Медијана	4.43	10.98	0.62	233.78

Табела 4.3.3. Вредности МПВ/Тр, НЛ, МЛ и ТЛ петог дана

ПЕТИ ДАН	МПВ/Тр	НЛ	МЛ	ТЛ
Средња вредност	5.49	11.88	0.71	307.02
Стандардна девијација	5.62	7.32	0.51	205.90
Минимална вредност	1.10	2.73	0.01	40.23
Максимална вредност	30.55	33.76	3.00	1159.68
Медијана	3.73	10.34	0.53	243.82

Статистичком анализом је утврђено да не постоји статистички значајна разлика у вредностима МПВ/Тр, НЛ, МЛ и ТЛ у односу на пол и старост пацијената.

4.3.1. ПОВЕЗАНОСТ МПВ/Тр, НЛ, МЛ и ТЛ СА ОСНОВНИМ ОБОЉЕЊЕМ КОЈЕ ЈЕ ДОВЕЛО ДО СЕКУНДАРНЕ СЕПСЕ

Средње вредности, стандардне девијације, медијане, распони између минималне и максималне вредности МПВ/Тр, НЛ, МЛ и ТЛ првог дана приказане су по групама пацијената према основном обољењу које је довело до секундарне сепсе (перитонитис, панкреатитис, траума) на табели 4.3.1.1.

Табела 4.3.1.1. Вредности МПВ/Тр, НЛ, МЛ и ТЛ првог дана према основном обољењу које је довело до секундарне сепсе

ПРВИ ДАН		МПВ/Тр	НЛ	МЛ	ТЛ
перитонитис	Средња вредност	6.84	13.72	0.77	246.43
	Стандардна девијација	7.51	10.70	0.69	213.00
	Минимална вредност	0.00	1,14	0.00	13.83
	Максимална вредност	49.2	75.34	3.54	1475.00
	Медијана	3.74	10.32	0.42	231.43
панкреатитис	Средња вредност	6.33	12.20	0.86	254.66
	Стандардна девијација	6.65	7.49	0.59	175.50
	Минимална вредност	0.00	0.53	0.02	25.39
	Максимална вредност	37.78	41.56	2.53	951.35
	Медијана	4.23	11.49	0.73	219.83
траума	Средња вредност	4.73	10.92	0.72	243.77
	Стандардна девијација	3.52	9.82	0.62	142.13
	Минимална вредност	1.3	1.41	0.01	37.31
	Максимална вредност	23.57	50.27	3.75	798.55
	Медијана	3.57	9.09	0.63	211.92

Што се тиче вредности МПВ/Тр, НЛ, МЛ и ТЛ првог дана и основног обољења које је довело до секундарне сепсе (перитонитис, панкреатитис, траума), статистичком анализом је утврђено да високо значајна општа разлика постоји ($p < 0.01$) код НЛ и МЛ. Због тога је у том термину урађена додатна пост-хок анализа (*Mann-Whitney U* тестом) поређења између парова група што је приказано на табели 4.3.1.2. У друга два термина, трећег и петог дана није било статистички значајне разлике у вредностима ових параметара у односу на основно обољење које је довело до секундарне сепсе.

Табела 4.3.1.2. Поређење вредности МПВ/Тр, НЛ, МЛ и ТЛ и основног обољења које је довело до секундарне сепсе првог дана

Први дан	МПВ/Тр	НЛ	МЛ	ТЛ
<i>Chi-square; Kruskal-Wallis</i>	$p > 0.05$	8.897; $p < 0.01$	10.106; $p < 0.01$	$p > 0.05$
<i>z</i> перитонитис / панкреатитис		-2.156; $p < 0.05$	-2.048; $p < 0.05$	
<i>z</i> перитонитис / траума		$p > 0.05$	-2.991; $p < 0.01$	
<i>z</i> панкреатитис / траума		-2.866; $p < 0.01$	$p > 0.05$	

4.3.2. ПОВЕЗАНОСТ МПВ/Тр, НЛ, МЛ и ТЛ СА БАКТЕРИЈСКИМ ПРОУЗРОКОВАЧЕМ У ХЕМОКУЛТУРИ

Средње вредности, стандардне девијације, медијане, распони између минималне и максималне вредности МПВ/Тр, НЛ, МЛ и ТЛ првог дана приказане су по групама пацијената према бактеријском проузроковачу у хемокултури (Грам-позитивна, Грам-негативна, полимикробна, негативна хемокултура) на табели 4.3.2.1.

Табела 4.3.2.1. Вредности МПВ/Тр, НЛ, МЛ и ТЛ првог дана према бактеријском проузроковачу у хемокултури

ПРВИ ДАН		МПВ/Тр	НЛ	МЛ	ТЛ
Грам-позитивна хемокултура	Средња вредност	5.43	9.93	0.60	203.33
	Стандардна девијација	6.28	7.26	0.36	128.39
	Минимална вредност	0.00	2.91	0.01	22.27
	Максимална вредност	46.82	50.61	1.49	633.21
	Медијана	3.42	9.67	0.42	195.35
Грам-негативна хемокултура	Средња вредност	4.58	14.29	0.67	285.57
	Стандардна девијација	2.68	7.71	0.53	114.33
	Минимална вредност	1.00	2.55	0.10	156.26
	Максимална вредност	9.74	32.07	2.41	480.51
	Медијана	5.54	11.70	0.55	230.38
Полимикробна хемокултура	Средња вредност	7.08	12.71	0.71	281.89
	Стандардна девијација	7.75	10.74	0.60	220.47
	Минимална вредност	0.00	0.51	0.01	11.12
	Максимална вредност	46.52	75.21	3.52	1145.03
	Медијана	4.71	11.49	0.58	218.52
Негативна хемокултура	Средња вредност	4.55	12.87	0.85	309.28
	Стандардна девијација	5.79	10.16	0.58	236.99
	Минимална вредност	0.07	1.65	0.02	37.75
	Максимална вредност	48.10	56.45	3.21	1802.22
	Медијана	3.51	11.81	0.68	268.06

Што се тиче вредности МПВ/Тр, НЛ, МЛ и ТЛ првог дана и бактеријског проузроковача у хемокултури (Грам-позитивна, Грам-негативна, полимикробна, негативна хемокултура) статистичком анализом је утврђено да значајна општа разлика постоји ($p < 0.05$) постоји код свих параметара осим НЛ. Због тога је у тим терминима урађена додатна пост-хок анализа (*Mann-Whitney*

U тестом) поређења између парова група што је приказано на табели 4.3.2.2. У друга два термина, трећег и петог дана није било статистички значајне разлике у вредностима ових параметара у односу на бактеријског проузроковача у хемокултури.

Табела 4.3.2.2. Поређење вредности МПВ/Тр, НЛ, МЛ и ТЛ и бактеријског проузроковача у хемокултури првог дана

Први дан	МЛ	МПВ/Тр	НЛ	ТЛ
<i>Chi-square; Kruskal-Wallis</i>	8.148; $p < 0.05$	8.234; $p < 0.05$	$p > 0.05$	8.521; $p < 0.05$
<i>z</i> Грам-позитивна / Грам-негативна	-2.138; $p < 0.05$	-2.254; $p < 0.05$		-2.218; $p < 0.05$
<i>z</i> Грам-позитивна / Полимикробна	-2.185; $p < 0.05$	-2.215; $p < 0.05$		-2.267; $p < 0.05$
<i>z</i> Грам-позитивна / Негативна	-2.211; $p < 0.05$	$p > 0.05$		-2.194; $p < 0.05$
<i>z</i> Грам-негативна / Полимикробна	$p > 0.05$	$p > 0.05$		$p > 0.05$
<i>z</i> Грам-негативна / Негативна	$p > 0.05$	$p > 0.05$		$p > 0.05$
<i>z</i> Полимикробна / Негативна	-2.174; $p < 0.05$	-2.286; $p < 0.05$		-2.186; $p < 0.05$

4.3.3. ПОВЕЗАНОСТ МПВ/Тр, НЛ, МЛ и ТЛ СА ИСХОДОМ (ПРЕЖИВЕЛИ, УМРЛИ)

Средње вредности, стандардне девијације, медијане, распони између минималне и максималне вредности МПВ/Тр, НЛ, МЛ и ТЛ приказане су по групама пацијената према исходу (преживели, умрли) у три временска интервала (први, трећи и пети дан) на табелама 4.3.3.1., 4.3.3.2. и 4.3.3.3.

Табела 4.3.3.1. Вредности МПВ/Тр, НЛ, МЛ и ТЛ првог дана према исходу (преживели, умрли)

ПРВИ ДАН		МПВ/Тр	НЛ	МЛ	ТЛ
преживели	Средња вредност	4.65	11.34	0.79	267.17
	Стандардна девијација	5.11	8.30	0.53	195.95
	Минимална вредност	0.00	1.72	0.01	24.56
	Максимална вредност	46.52	56.41	3.54	1852.69
	Медијана	3.42	9.52	0.64	228.62
умрли	Средња вредност	7.15	15.31	0.75	290.50
	Стандардна девијација	7.06	11.16	0.55	232.33
	Минимална вредност	0.00	0.60	0.01	11.03
	Максимална вредност	48.20	78.56	2.93	1145.68
	Медијана	4.83	12.84	0.60	218.75

Што се тиче вредности МПВ/Тр, НЛ, МЛ и ТЛ првог дана и исхода (преживели, умрли) статистичком анализом је утврђено да значајна разлика постоји ($p < 0.05$) код МПВ/Тр (*Mann-Whitney U z*: - 2.059; $p < 0.05$) и НЛ (*Mann-Whitney U z*: - 2.215; $p < 0.05$).

Табела 4.3.3.2. Вредности МПВ/Тр, НЛ, МЛ и ТЛ трећег дана према исходу (преживели, умрли)

ТРЕЋИ ДАН		МПВ/Тр	НЛ	МЛ	ТЛ
преживели	Средња вредност	5.09	13.53	0.71	335.30
	Стандардна девијација	3.46	9.57	0.42	242.01
	Минимална вредност	1.15	3.12	0.13	40.87
	Максимална вредност	18.17	48.36	2.06	967.11
	Медијана	3.73	9.92	0.63	284.24
умрли	Средња вредност	6.65	13.76	0.75	234.70
	Стандардна девијација	5.35	7.75	0.54	165.26
	Минимална вредност	2.09	3.58	0.15	52.62
	Максимална вредност	25.93	40.00	2.74	908.89
	Медијана	4.55	12.89	0.58	271.66

Што се тиче вредности МПВ/Тр, НЛ, МЛ и ТЛ трећег дана и исхода (преживели, умрли) статистичком анализом је утврђено да значајна разлика постоји ($p < 0.05$) само код НЛ (*Mann-Whitney U z*: - 2.011; $p < 0.05$).

Табела 4.3.3.3. Вредности МПВ/Тр, НЛ, МЛ и ТЛ петог дана према исходу (преживели, умрли)

ПЕТИ ДАН		МПВ/Тр	НЛ	МЛ	ТЛ
преживели	Средња вредност	4.71	10.59	0.69	312.83
	Стандардна девијација	4.16	7.16	0.46	222.71
	Минимална вредност	1.10	2.73	0.13	42.79
	Максимална вредност	26.81	32.94	2.15	1159.68
	Медијана	3.57	8.21	0.51	207.29
умрли	Средња вредност	7.40	15.02	0.77	282.75
	Стандардна девијација	7.99	6.88	0.62	161.02
	Минимална вредност	1.89	5.53	0.01	40.23
	Максимална вредност	30.55	33.76	3.00	607.84
	Медијана	4.96	12.82	0.55	189.17

Што се тиче вредности МПВ/Тр, НЛ, МЛ и ТЛ петог дана и исхода (преживели, умрли) статистичком анализом је утврђено да високо значајна разлика постоји ($p < 0.01$) само код НЛ (*Mann-Whitney U z*: - 2.909; $p < 0.01$).

Такође је спроведена статистичка анализа вредности МПВ/Тр, НЛ, МЛ и ТЛ у сва три временска интервала у групама по исходу (преживели, умрли).

Вредности МПВ/Тр статистички високо значајно су се разликовале у три временска интервала унутар групе преживелих, а статистички значајно у групи умрлих. Вредности НЛ статистички значајно су се разликовале само у групи преживелих, док код вредности МЛ није било статистички значајне разлике ни у групи преживелих ни у групи умрлих. Вредности ТЛ статистички високо значајно су се разликовале само у групи умрлих. Све ове опште значајности разлика додатно су анализирани пост-хок *Mann-Whitney U* тестом поређења између парова група да би се утврдило егзактно између којих временских интервала постоји статистички значајна разлика у вредностима параметара унутар група што је приказано на табели 4.3.3.4.

Табела 4.3.3.4. Поређење вредности МПВ/Тр, НЛ, МЛ и ТЛ у три временска интервала унутар групе преживелих и групе умрлих

Параметар	МПВ/Тр		НЛ		МЛ		ТЛ	
	преживели	умрли	преживели	умрли	преживели	умрли	преживели	умрли
<i>Chi-square</i> <i>Friedman Test</i>	16.772 п<0.01	6.909 п<0.05	6.704 п<0.05	1.238 п>0.05	0.778 п>0.05	2.545 п>0.05	1.815 п>0.05	10.091 п<0.01
z 3. дан/1. дан	-0.547 п>0.05	-0.721 п>0.05	-1.580 п>0.05					-1.538 п>0.05
z 5. дан/1. дан	-2.535 п<0.01	-1.967 п<0.05	-2.536 п<0.01					-2.419 п<0.01
z 5. дан/3. дан	-3.908 п<0.01	-1.640 п>0.05	-3.095 п<0.01					-1.510 п>0.05

4.4. АКТИВАЦИОНИ СТАТУС НЕУТРОФИЛА

Активациони статус неутрофила процењен је експресијом нЦД64, нЦД14, нПД-Л1 (израженом у процентима - % и у W/m^2) као и индексом дивергенције неутрофила – ИДН у два временска интервала: првог и петог дана.

Средње вредности, стандардне девијације, медијане, распони између минималне и максималне вредности нЦД64, нЦД14, нПД-Л1 и ИДН приказане су у два временска интервала (први и пети дан) на табелама 4.4.1. и 4.4.2.

Табела 4.4.1. Вредности експресије ЦД64, ЦД14, ПД-Л1 на неутрофилима и ИДН првог дана

НЕУТРОФИЛИ ПРВИ ДАН	ЦД64 %	ЦД64 W/m^2	ЦД14 %	ЦД14 W/m^2	ПД-Л1 %	ПД-Л1 W/m^2	ИДН
Средња вредност	3.87	1.59	0.59	1.27	1.50	2.12	8.75
Стандардна девијација	6.35	1.24	1.60	1.38	5.50	2.59	21.04
Минимална вредност	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.01
Максимална вредност	42.20	11.00	11.60	7.40	41.80	18.00	99.00
Медијана	1.70	1.50	0.10	1.30	0.20	1.60	0.74

Табела 4.4.2. Вредности експресије ЦД64, ЦД14, ПД-Л1 на неутрофилима и ИДН петог дана

НЕУТРОФИЛИ ПЕТИ ДАН	ЦД64 %	ЦД64 W/m^2	ЦД14 %	ЦД14 W/m^2	ПД-Л1 %	ПД-Л1 W/m^2	ИДН
Средња вредност	4.20	1.71	1.44	1.67	3.24	2.79	4.31
Стандардна девијација	6.18	0.95	8.87	1.72	12.92	2.99	12.49
Минимална вредност	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.02
Максимална вредност	30.40	6.80	76.00	9.20	77.00	15.00	99.00
Медијана	1.60	1.60	0.20	1.40	0.30	1.90	0.49

Статистичком анализом је утврђено да не постоји статистички значајна разлика у вредностима експресије ЦД64, ЦД14, ПД-Л1 на неутрофилима и ИДН у односу на пол и старост пацијената као ни у односу на врсту бактеријског проузроковача изолованог хемокултуром ни у једном од два временска интервала.

4.5. АКТИВАЦИОНИ СТАТУС МОНОЦИТА

Активациони статус моноцита процењен је експресијом мХЛА-ДР, мЦД14, мПД-Л1 и мЦД64 (израженом у процентима - % и у W/m^2) у два временска интервала: првог и петог дана. Средње вредности, стандардне девијације, медијане, распони између минималне и максималне вредности мХЛА-ДР, мЦД14, мПД-Л1 и мЦД64 приказане су у два временска интервала (први и пети дан) на табелама 4.5.1. и 4.5.2.

Табела 4.5.1. Вредности експресије ХЛА-ДР, ЦД14, ПД-Л1 и ЦД64 на моноцитим првог дана

МОНОЦИТИ ПРВИ ДАН	ХЛА-ДР %	ХЛА-ДР W/m^2	ЦД14 %	ЦД14 W/m^2	ПД-Л1 %	ПД-Л1 W/m^2	ЦД64 %	ЦД64 W/m^2
Средња вредност	24.07	5.72	67.68	1.16	2.11	3.58	88.46	1.77
Стандардна девијација	21.68	2.32	30.37	0.79	6.63	8.72	14.06	1.43
Минимална вредност	1.40	2.30	7.00	0.50	0.00	0.00	0.40	0.90
Максимална вредност	99.00	11.00	99.00	4.80	43.50	50.00	100.00	14.00
Медијана	18.00	5.40	82.00	0.85	0.30	1.30	92.20	1.60

Табела 4.5.2. Вредности експресије ХЛА-ДР, ЦД14, ПД-Л1 и ЦД64 на моноцитим петог дана

МОНОЦИТИ ПЕТИ ДАН	ХЛА-ДР %	ХЛА-ДР W/m^2	ЦД14 %	ЦД14 W/m^2	ПД-Л1 %	ПД-Л1 W/m^2	ЦД64 %	ЦД64 W/m^2
Средња вредност	25.07	5.14	62.68	1.00	2.36	5.09	79.98	1.63
Стандардна девијација	20.55	2.06	30.95	0.57	7.15	12.45	24.59	0.94
Минимална вредност	0.00	0.00	0.20	0.10	0.00	0.00	0.40	0.70
Максимална вредност	99.60	11.00	98.00	4.10	49.00	76.80	99.00	7.10
Медијана	20.00	5.10	76.00	0.80	0.40	1.40	89.00	1.40

Статистичком анализом је утврђено да не постоји статистички значајна разлика у вредностима експресије ХЛА-ДР, ЦД14, ПД-Л1 и ЦД64 на моноцитима у односу на пол и старост пацијената као ни у односу на врсту бактеријског проузроковача изолованог хемокултуром ни у једном од два временска интервала.

4.6. ПОВЕЗАНОСТ ПАРАМЕТАРА АКТИВАЦИОНОГ СТАТУСА НЕУТРОФИЛА И МОНОЦИТА СА ОСНОВНИМ ОБОЉЕЊЕМ КОЈЕ ЈЕ ДОВЕЛО ДО СЕКУНДАРНЕ СЕПСЕ

4.6.1. ПОВЕЗАНОСТ нЦД64, нЦД14, нПД-Л1 и ИДН СА ОСНОВНИМ ОБОЉЕЊЕМ КОЈЕ ЈЕ ДОВЕЛО ДО СЕКУНДАРНЕ СЕПСЕ

Средње вредности, стандардне девијације, медијане, распони између минималне и максималне вредности нЦД64, нЦД14, нПД-Л1 и ИДН првог дана приказане су по групама пацијената према основном обољењу које је довело до секундарне сепсе (перитонитис, панкреатитис, траума) на табели 4.6.1.1.

Табела 4.6.1.1. Вредности нЦД64, нЦД14, нПД-Л1 и ИДН првог дана према основном обољењу које је довело до секундарне сепсе

НЕУТРОФИЛИ ПРВИ ДАН		ЦД64 %	ЦД64 W/m^2	ЦД14 %	ЦД14 W/m^2	ПД-Л1 %	ПД-Л1 W/m^2	ИДН
перитонитис	Средња вредност	4.97	1.59	0.74	1.21	2.96	2.20	14.78
	Стандардна девијација	6.04	0.49	2.02	1.23	7.94	2.95	28.64
	Минимална вредност	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.03
	Максимална вредност	23.20	3.30	11.60	5.30	41.80	18.00	99.00
	Медијана	2.30	1.55	0.15	1.30	0.45	1.45	2.03
панкреатитис	Средња вредност	4.74	1.37	0.41	1.66	0.31	2.43	2.90
	Стандардна девијација	9.94	0.66	0.51	1.15	0.33	2.24	7.67
	Минимална вредност	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.01
	Максимална вредност	42.20	2.10	2.10	4.50	1.20	8.40	32.33
	Медијана	1.60	1.55	0.30	1.55	0.25	2.15	0.61
траума	Средња вредност	1.75	1.74	0.50	1.10	0.24	1.81	4.39
	Стандардна девијација	1.92	2.06	1.41	1.68	0.44	2.30	10.60
	Минимална вредност	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.01
	Максимална вредност	5.80	11.00	7.10	7.40	1.70	8.10	49.00
	Медијана	0.70	1.50	0.00	0.00	0.05	1.30	0.23

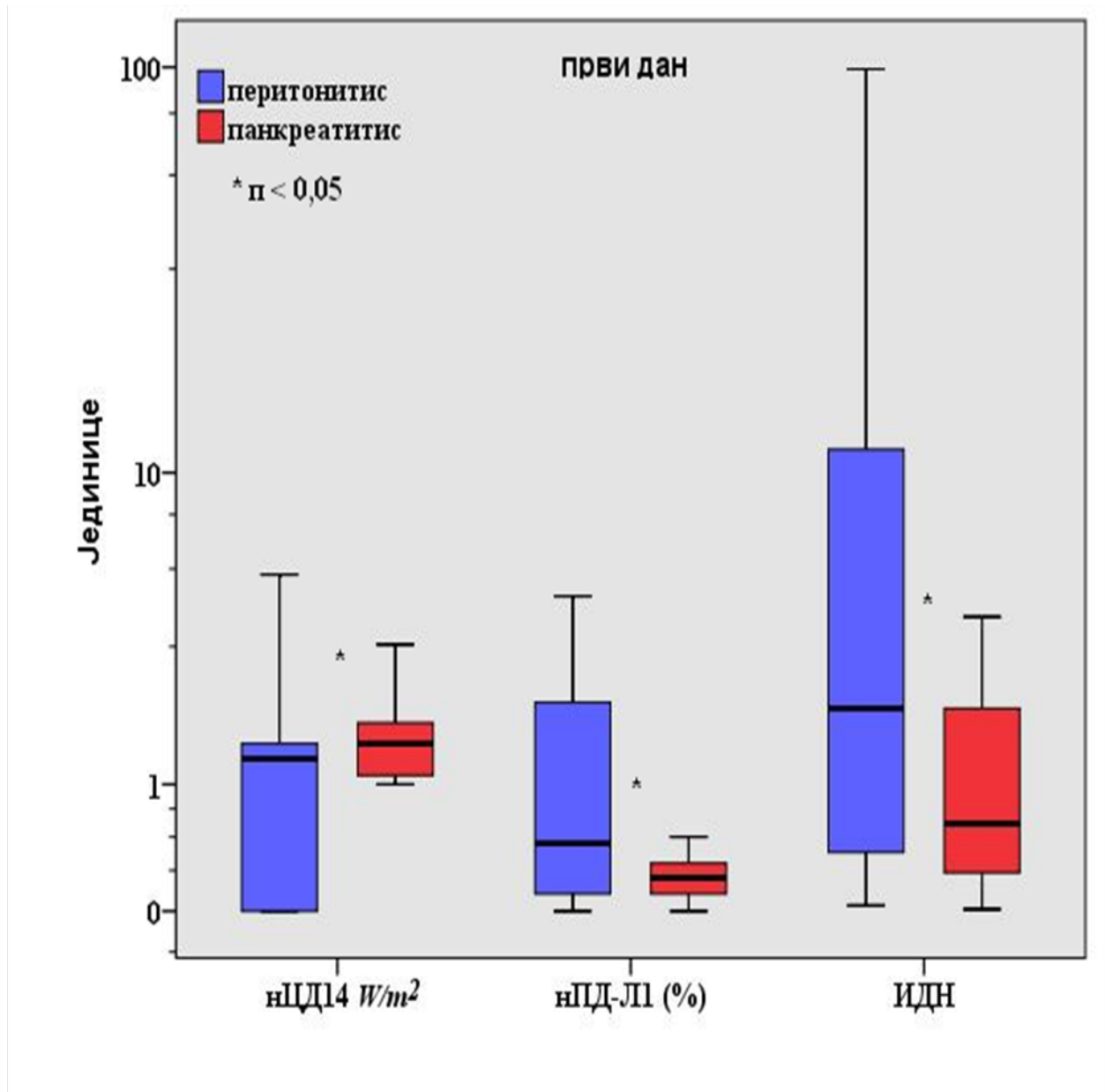
Што се тиче вредности нЦД64, нЦД14, нПД-Л1 и ИДН првог дана и основног обољења које је довело до секундарне сепсе (перитонитис, панкреатитис, траума), статистичком анализом је утврђено да високо значајна општа разлика ($p < 0.01$) постоји код нЦД64 % и нПД-Л1 % а статистички значајна општа разлика ($p < 0.05$) код нЦД14 W/m^2 и ИДН. Због тога је у том термину урађена додатна пост-хок анализа (*Mann-Whitney U* тестом) поређења између парова група што је приказано на табели 4.6.1.2.

Табела 4.6.1.2. Поређење вредности нЦД64 %, нПД-Л1 %, нЦД14 W/m^2 , ИДН и основног обољења које је довело до секундарне сепсе првог дана

Први дан	нЦД64 %	нПД-Л1 %	нЦД14 W/m^2	ИДН
<i>Chi-square; Kruskal-Wallis</i>	9.575; $p < 0.01$	13.013; $p < 0.01$	6.184; $p < 0.05$	7.484; $p < 0.05$
<i>z</i> перитонитис / панкреатитис	$p > 0.05$	-2.010; $p < 0.05$	-1.903; $p < 0.05$	-1.980; $p < 0.05$
<i>z</i> перитонитис / траума	-2.931; $p < 0.01$	-3.435; $p < 0.01$	$p > 0.05$	-2.557; $p < 0.01$
<i>z</i> панкреатитис / траума	$p > 0.05$	$p > 0.05$	-1.966; $p < 0.05$	$p > 0.05$

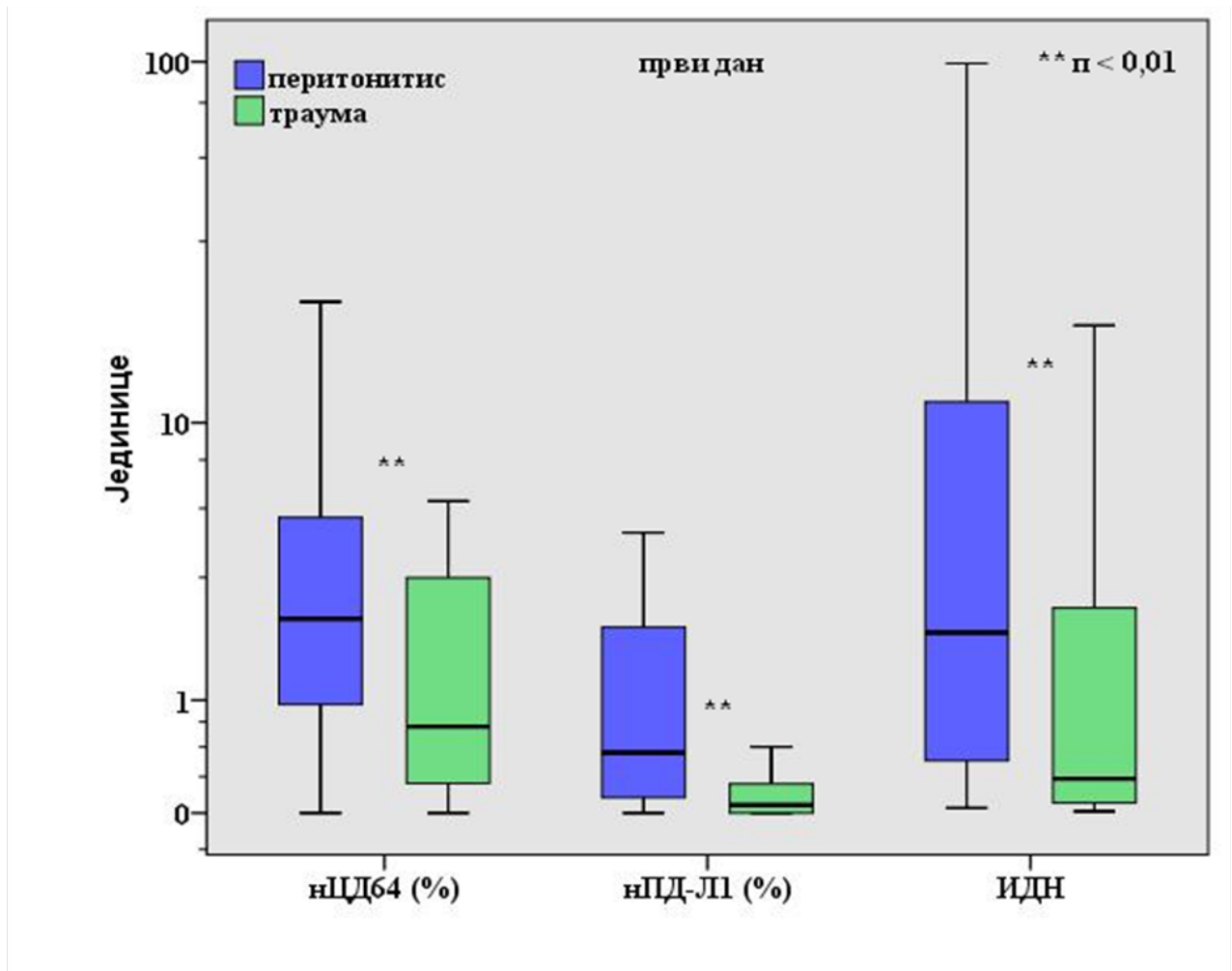
На графикону 4.6.1.1. приказано је поређење вредности нЦД14 W/m^2 , нПД-Л1 % и ИДН првог дана између перитонитиса и панкреатитиса који су довели до секундарне сепсе.

Графикон 4.6.1.1. Вредности нЦД14 W/m^2 , нПД-Л1 % и ИДН код пацијената са перитонитисом и панкреатитисом



На графикону 4.6.1.2. приказано је поређење вредности нЦД64 %, нПД-Л1 % и ИДН првог дана између перитонитиса и трауме који су довели до секундарне сепсе.

Графикон 4.6.1.2. Вредности нЦД64 %, нПД-Л1 % и ИДН код пацијената са перитонитисом и траумом



Средње вредности, стандардне девијације, медијане, распони између минималне и максималне вредности нЦД64, нЦД14, нПД-Л1 и ИДН петог дана приказане су по групама пацијената према основном обољењу које је довело до секундарне сепсе (перитонитис, панкреатитис, траума) на табели 4.6.1.3.

Што се тиче вредности нЦД64, нЦД14, нПД-Л1 и ИДН петог дана и основног обољења које је довело до секундарне сепсе (перитонитис, панкреатитис, траума), статистичком анализом је утврђено да високо значајна општа разлика ($p < 0.01$) постоји само код нПД-Л1 W/m^2 . Због тога је у том термину урађена додатна пост-хок анализа (*Mann-Whitney U* тестом) поређења између парова група што је приказано на табели 4.6.1.4.

Табела 4.6.1.3. Вредности нЦД64, нЦД14, нПД-Л1 и ИДН петог дана према основном обољењу које је довело до секундарне сепсе

НЕУТРОФИЛИ ПЕТИ ДАН		ЦД64 %	ЦД64 W/m^2	ЦД14 %	ЦД14 W/m^2	ПД-Л1 %	ПД-Л1 W/m^2	ИДН
перитонитис	Средња вредност	6.26	1.64	0.42	1.66	4.45	2.88	5.97
	Стандардна девијација	8.24	0.72	0.71	1.64	14.39	3.21	17.84
	Минимална вредност	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.03
	Максимална вредност	30.40	3.40	3.10	6.40	68.00	13.00	99.00
	Медијана	2.70	1.60	0.20	1.40	0.30	2.00	0.72
панкреатитис	Средња вредност	2.35	1.50	0.28	1.60	0.54	1.23	3.53
	Стандардна девијација	2.67	0.85	0.28	1.47	0.81	0.90	7.16
	Минимална вредност	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.02
	Максимална вредност	8.00	3.80	0.90	5.10	3.20	2.70	24.00
	Медијана	0.90	1.50	0.20	1.30	0.25	1.45	0.58
траума	Средња вредност	2.90	1.91	3.38	1.72	3.45	3.65	2.81
	Стандардна девијација	3.90	1.22	14.84	2.00	15.02	3.27	5.52
	Минимална вредност	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.02
	Максимална вредност	14.00	6.80	76.00	9.20	77.00	15.00	19.00
	Медијана	1.25	1.60	0.25	1.60	0.25	3.10	0.39

Табела 4.6.1.4. Поређење вредности нПД-Л1 W/m^2 и основног обољења које је довело до секундарне сепсе петог дана

Пети дан	нПД-Л1 W/m^2
<i>Chi-square; Kruskal-Wallis</i>	9.495; $p < 0.01$
<i>z</i> перитонитис / панкреатитис	-1.982; $p < 0.05$
<i>z</i> перитонитис / траума	$p > 0.05$
<i>z</i> панкреатитис / траума	-3.091; $p < 0.01$

4.6.2. ПОВЕЗАНОСТ мХЛА-ДР, мЦД14, мПД-Л1 и мЦД64 СА ОСНОВНИМ ОБОЉЕЊЕМ КОЈЕ ЈЕ ДОВЕЛО ДО СЕКУНДАРНЕ СЕПСЕ

Средње вредности, стандардне девијације, медијане, распони између минималне и максималне вредности мХЛА-ДР, мЦД14, мПД-Л1 и мЦД64 првог дана приказане су по групама пацијената према основном обољењу које је довело до секундарне сепсе (перитонитис, панкреатитис, траума) на табели 4.6.2.1.

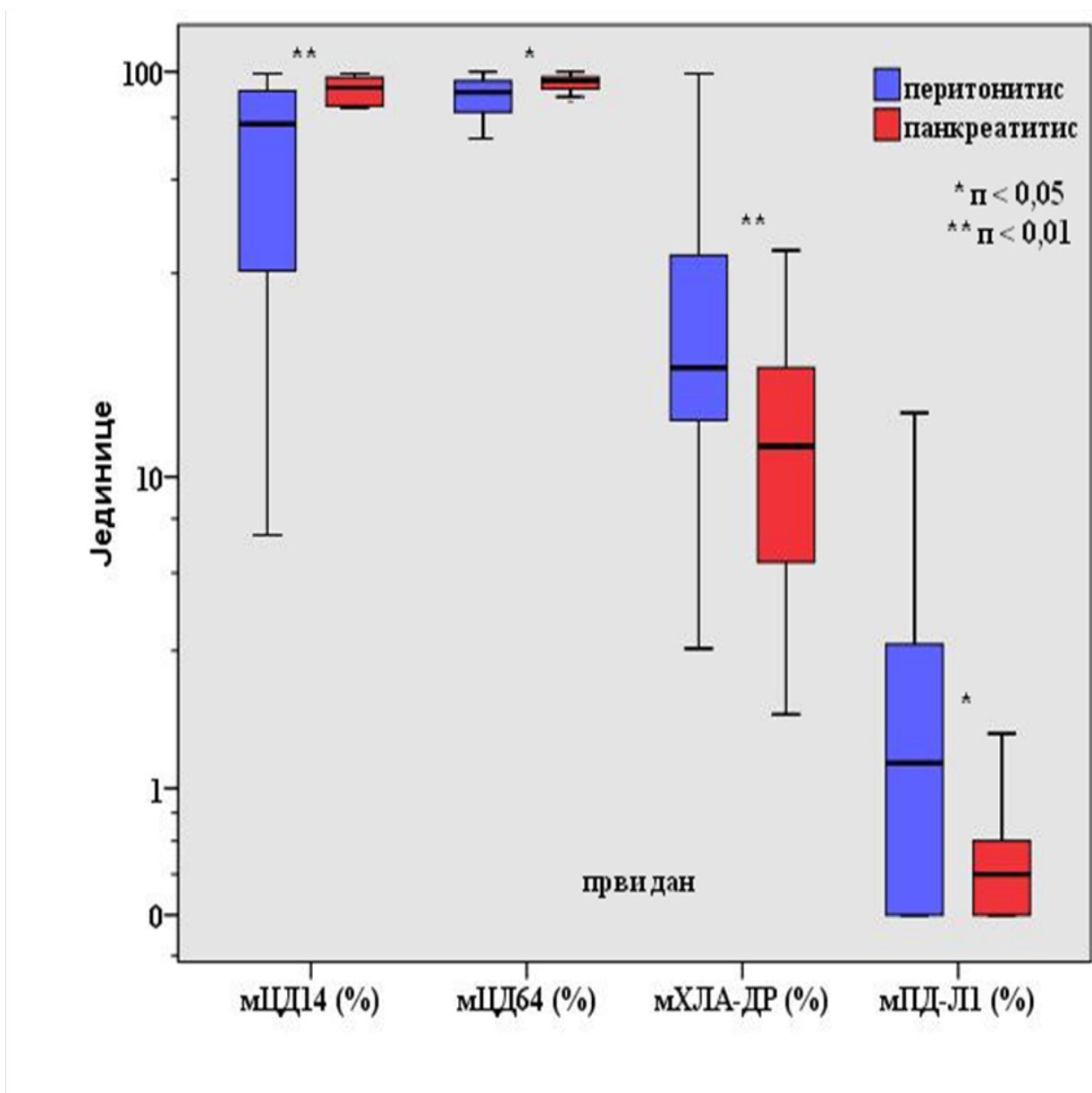
Табела 4.6.2.1. Вредности мХЛА-ДР, мЦД14, мПД-Л1 и мЦД64 првог дана према основном обољењу које је довело до секундарне сепсе

МОНОЦИТИ ПРВИ ДАН		ХЛА-ДР %	ХЛА-ДР W/m^2	ЦД14 %	ЦД14 W/m^2	ПД-Л1 %	ПД-Л1 W/m^2	ЦД64 %	ЦД64 W/m^2
перитонитис	Средња вредност	26.80	6.29	63.70	1.22	4.13	1.98	86.78	1.90
	Стандардна девијација	21.58	2.46	30.60	0.83	9.45	2.86	10.89	2.05
	Минимална вредност	3.30	2.40	7.00	0.50	0.00	0.00	53.40	0.90
	Максимална вредност	99.00	11.00	99.00	4.30	43.50	14.60	100.00	14.00
	Медијана	19.00	6.15	75.00	0.90	1.30	1.30	89.20	1.50
панкреатитис	Средња вредност	13.06	5.53	83.17	1.22	0.46	6.73	93.06	1.61
	Стандардна девијација	8.95	2.19	23.02	0.52	0.68	13.42	6.21	0.30
	Минимална вредност	2.00	2.40	12.00	0.60	0.00	0.00	77.20	1.00
	Максимална вредност	37.00	9.10	99.00	2.60	2.50	47.00	100.00	2.10
	Медијана	12.00	4.95	91.50	1.10	0.25	1.30	94.90	1.65
траума	Средња вредност	27.58	5.04	62.96	1.02	0.36	3.71	87.74	1.71
	Стандардна девијација	25.69	2.05	31.91	0.88	0.61	9.99	20.24	0.62
	Минимална вредност	1.40	2.30	11.00	0.50	0.00	0.00	0.40	1.10
	Максимална вредност	93.00	10.00	99.00	4.80	3.10	50.00	100.00	4.30
	Медијана	18.00	4.80	65.40	0.70	0.20	1.10	94.00	1.60

Што се тиче вредности ХЛА-ДР %, мЦД14 %, м ЦД14 W/m^2 , мПД-Л1 % и мЦД64 % првог дана и основног обољења које је довело до секундарне сепсе (перитонитис, панкреатитис, траума), статистичком анализом је утврђено да високо значајна општа разлика ($p < 0.01$) постоји код ХЛА-ДР % и мПД-Л1 % а статистички значајна општа разлика ($p < 0.05$) код мЦД14 %, мЦД14 W/m^2 и мЦД64 %. Због тога је у том термину урађена додатна пост-хок анализа (*Mann-Whitney U* тестом) поређења између парова група што је приказано на табели 4.6.2.2.

На графикону 4.6.2.1. приказано је поређење вредности мЦД14 %, мЦД64 %, мХЛА-ДР % и мПД-Л1 % првог дана између перитонитиса и панкреатитиса који су довели до секундарне сепсе.

Графикон 4.6.2.1. Вредности мЦД14 %, мЦД64 %, мХЛА-ДР % и мПД-Л1 % код пацијената са перитонитисом и панкреатитисом

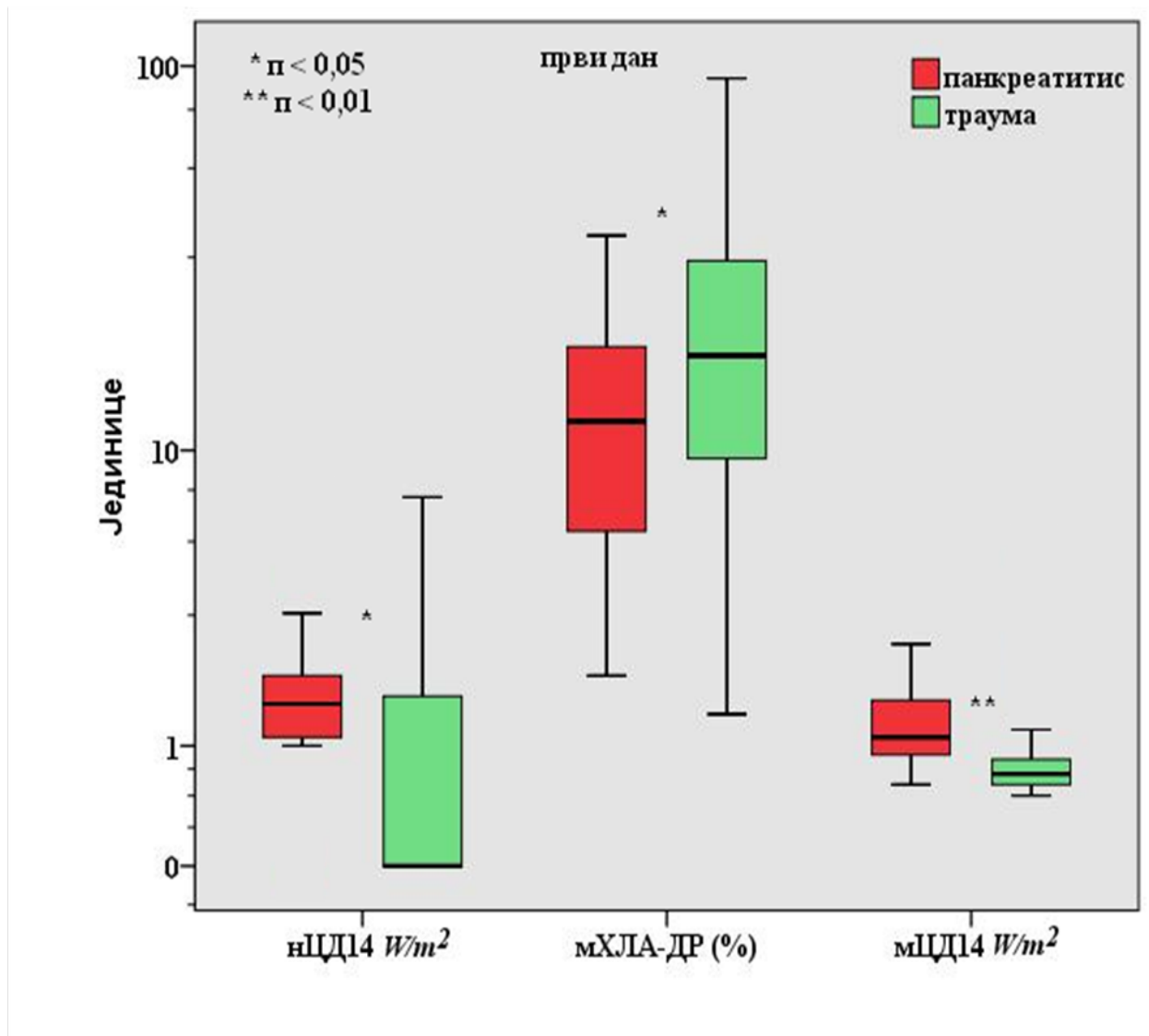


Табела 4.6.2.2. Поређење вредности мХЛА-ДР %, мЦД14 %, мЦД14 W/m^2 , мПД-Л1 %, мЦД64 % и основног обољења које је довело до секундарне сепсе првог дана

Први дан	мХЛА-ДР %	мЦД14 %	мЦД14 W/m^2	мПД-Л1 %	мЦД64 %
<i>Chi-square; Kruskal-Wallis</i>	7.190; $p < 0.01$	6.417; $p < 0.05$	5.824; $p < 0.05$	10.572; $p < 0.01$	5.648; $p < 0.05$
<i>z</i> перитонитис / панкреатитис	-2.720; $p < 0.01$	-2.615; $p < 0.01$	$p > 0.05$	-2.327; $p < 0.05$	-2.160; $p < 0.05$
<i>z</i> перитонитис / траума	$p > 0.05$	$p > 0.05$	$p > 0.05$	-2.947; $p < 0.01$	-1.826; $p < 0.05$
<i>z</i> панкреатитис / траума	-1.923; $p < 0.05$	-1.851; $p < 0.05$	-2.713; $p < 0.01$	$p > 0.05$	$p > 0.05$

На графикону 4.6.2.2. приказано је поређење вредности $n\text{ЦД}14 \text{ W/m}^2$, $\text{ХЛА-ДР } \%$ и $m\text{ЦД}14 \text{ W/m}^2$ првог дана између панкреатитиса и трауме који су довели до секундарне сепсе.

Графикон 4.6.2.2. Вредности $n\text{ЦД}14 \text{ W/m}^2$, $\text{ХЛА-ДР } \%$ и $m\text{ЦД}14 \text{ W/m}^2$ код пацијената са панкреатитисом и траумом



Средње вредности, стандардне девијације, медијане, распони између минималне и максималне вредности $m\text{ХЛА-ДР}$, $m\text{ЦД}14$, $m\text{ПД-Л1}$ и $m\text{ЦД}64$ петог дана приказане су по групама пацијената према основном обољењу које је довело до секундарне сепсе (перитонитис, панкреатитис, траума) на табели 4.6.2.3.

Табела 4.6.2.3. Вредности мХЛА-ДР, мЦД14, мПД-Л1 и мЦД64 петог дана према основном обољењу које је довело до секундарне сепсе

МОНОЦИТИ ПЕТИ ДАН		ХЛА-ДР %	ХЛА-ДР W/m^2	ЦД14 %	ЦД14 W/m^2	ПД-Л1 %	ПД-Л1 W/m^2	ЦД64 %	ЦД64 W/m^2
перитонитис	Средња вредност	21.50	5.03	53.87	0.89	3.28	4.38	75.96	1.42
	Стандардна девијација	19.37	2.29	31.53	0.53	9.19	14.18	27.89	0.58
	Минимална вредност	0.00	0.00	5.90	0.10	0.00	0.00	3.00	0.70
	Максимална вредност	81.00	11.00	97.00	2.80	49.00	76.80	98.00	3.50
	Медијана	16.00	5.00	53.00	0.70	0.60	1.05	87.00	1.35
панкреатитис	Средња вредност	20.95	5.10	73.71	1.36	0.52	8.64	88.31	1.68
	Стандардна девијација	12.25	2.02	26.51	0.80	0.68	15.62	10.38	0.55
	Минимална вредност	4.80	1.30	0.20	0.70	0.00	0.00	67.00	1.00
	Максимална вредност	41.00	8.30	97.00	4.10	2.50	47.00	99.00	3.40
	Медијана	19.65	5.35	83.50	1.20	0.30	2.05	92.60	1.65
траума	Средња вредност	31.88	5.29	66.38	0.92	2.42	3.73	79.64	1.85
	Стандардна девијација	24.52	1.84	30.92	0.35	6.61	7.10	26.05	1.35
	Минимална вредност	0.30	2.50	3.00	0.50	0.00	0.00	0.40	1.00
	Максимална вредност	99.60	10.00	98.00	1.70	33.00	36.00	99.00	7.10
	Медијана	24.00	5.10	81.70	0.85	0.45	1.80	91.00	1.45

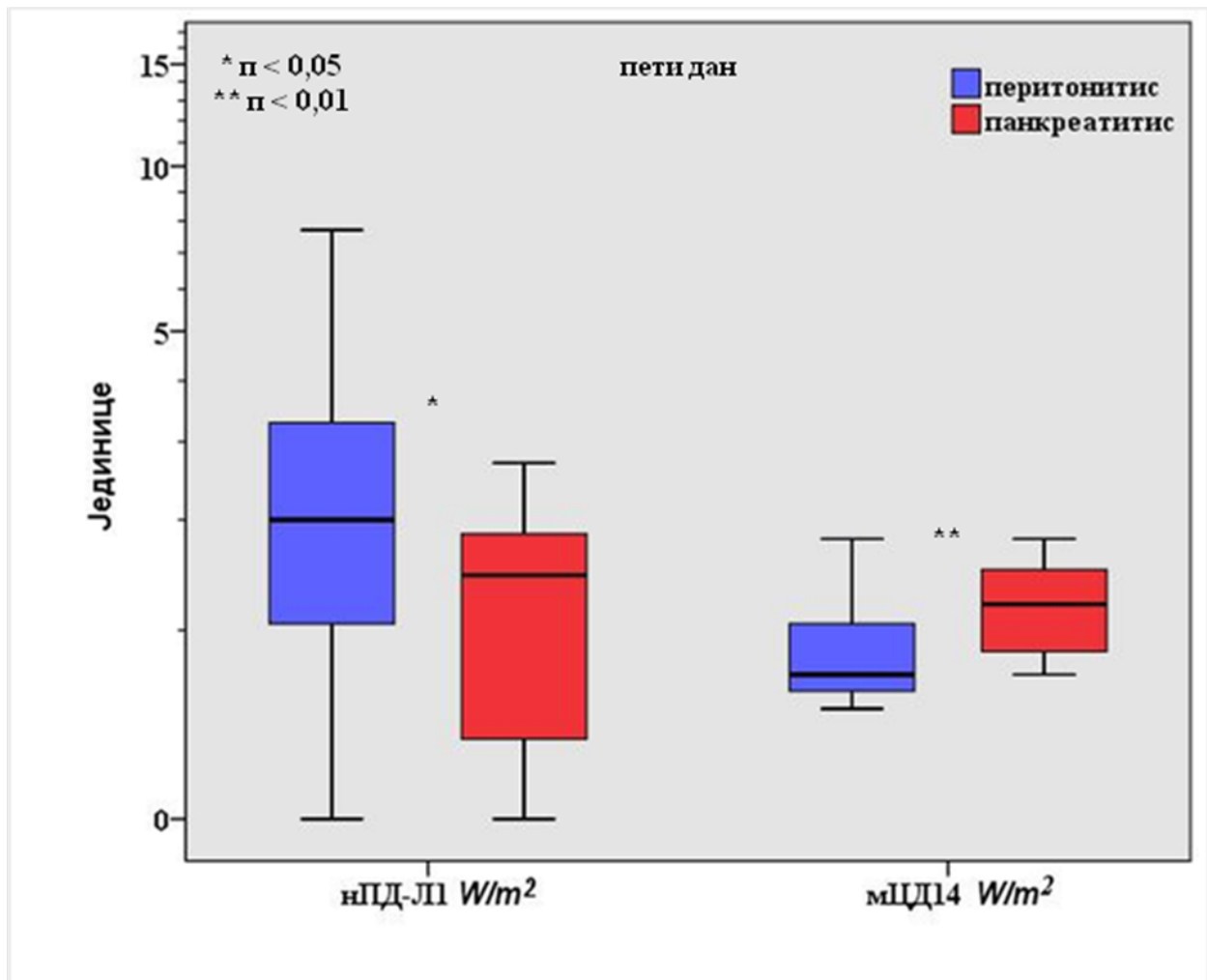
Што се тиче вредности мХЛА-ДР, мЦД14, мПД-Л1 и мЦД64 петог дана и основног обољења које је довело до секундарне сепсе (перитонитис, панкреатитис, траума), статистичком анализом је утврђено да високо значајна општа разлика ($p < 0.01$) постоји само код мЦД14 W/m^2 . Због тога је у том термину урађена додатна пост-хок анализа (*Mann-Whitney U* тестом) поређења између парова група што је приказано на табели 4.6.2.4.

Табела 4.6.2.4. Поређење вредности мЦД14 W/m^2 и основног обољења које је довело до секундарне сепсе петог дана

Пети дан	мЦД14 W/m^2
<i>Chi-square; Kruskal-Wallis</i>	10.479; $p < 0.01$
<i>z</i> перитонитис / панкреатитис	-3.071; $p < 0.01$
<i>z</i> перитонитис / траума	$p > 0.05$
<i>z</i> панкреатитис / траума	-2.561; $p < 0.01$

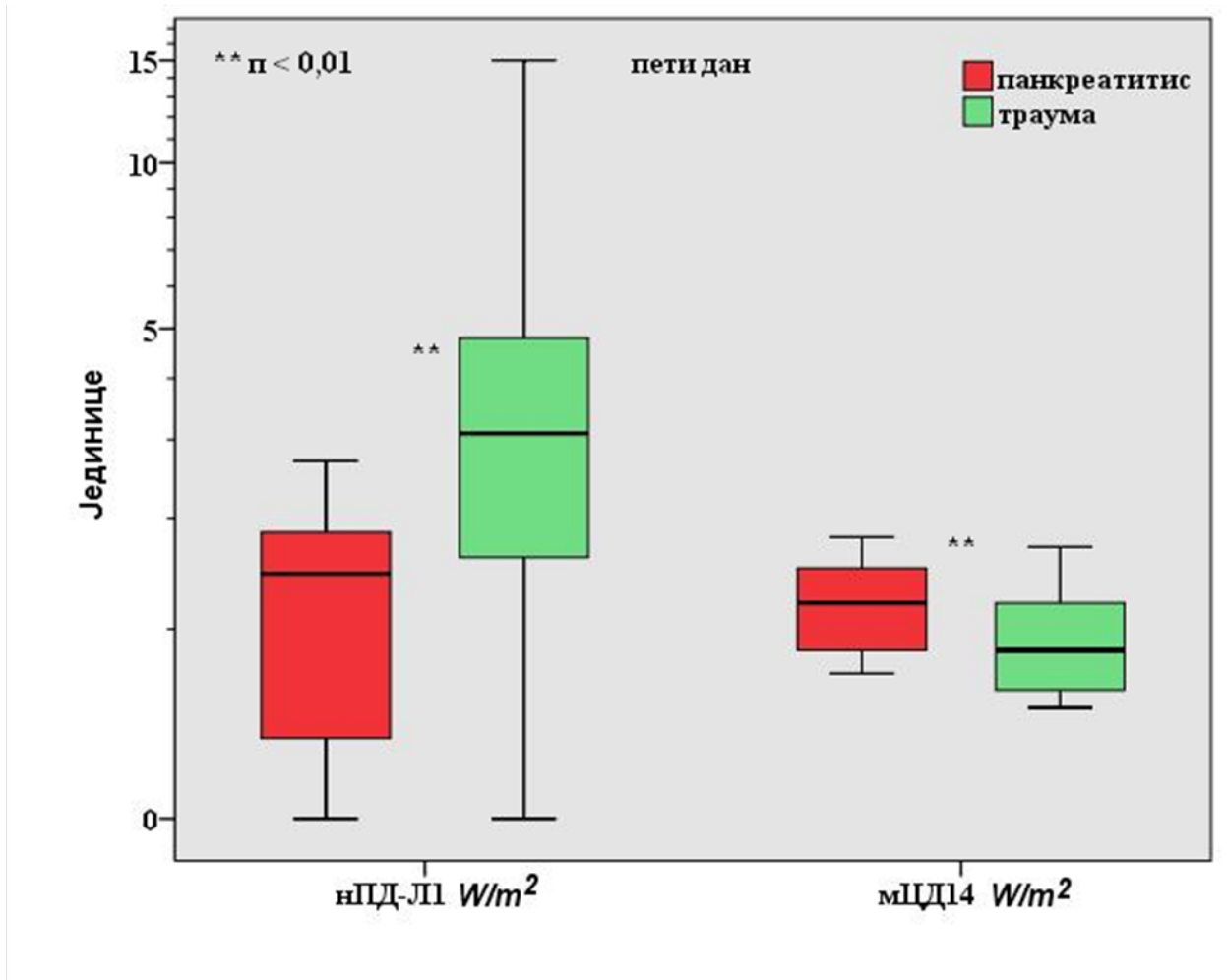
На графикону 4.6.2.3. приказано је поређење вредности нПД-Ј11 W/m^2 и мЦД14 W/m^2 петог дана између перитонитиса и панкреатитиса који су довели до секундарне сепсе.

Графикон 4.6.2.3. Вредности нПД-Ј11 W/m^2 и мЦД14 W/m^2 код пацијената са перитонитисом и панкреатитисом



На графикону 4.6.2.4. приказано је поређење вредности нПД-Ј11 W/m^2 и мЦД14 W/m^2 петог дана између панкреатитиса и трауме који су довели до секундарне сепсе.

Графикон 4.6.2.4. Вредности нПД-Л1 W/m^2 и мЦД14 W/m^2 код пацијената са панкреатитисом и траумом



4.7. ПОВЕЗАНОСТ ПАРАМЕТАРА АКТИВАЦИОНОГ СТАТУСА НЕУТРОФИЛА И МОНОЦИТА СА ИСХОДОМ (ПРЕЖИВЕЛИ, УМРЛИ)

4.7.1. ПОВЕЗАНОСТ нЦД64, нЦД14, нПД-Л1 и ИДН СА ИСХОДОМ (ПРЕЖИВЕЛИ, УМРЛИ)

Средње вредности, стандардне девијације, медијане, распони између минималне и максималне вредности нЦД64, нЦД14, нПД-Л1 и ИДН првог дана приказане су по групама пацијената према исходу (преживели, умрли) на табели 4.7.1.1.

Табела 4.7.1.1. Вредности нЦД64, нЦД14, нПД-Л1 и ИДН првог дана према исходу

НЕУТРОФИЛИ ПРВИ ДАН		ЦД64 %	ЦД64 W/m^2	ЦД14 %	ЦД14 W/m^2	ПД- Л1 %	ПД- Л1 W/m^2	ИДН
преживели	Средња вредност	2.49	1.68	0.52	1.13	1.05	2.35	13.13
	Стандардна девијација	2.62	1.50	1.26	1.27	3.86	3.08	25.38
	Минимална вредност	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.01
	Максимална вредност	12.80	11.00	7.10	5.30	27.30	18.00	99.00
	Медијана	1.50	1.50	0.10	1.20	0.10	1.80	1.38
умрли	Средња вредност	6.06	1.45	0.71	1.50	2.23	1.76	1.04
	Стандардна девијација	9.35	0.59	2.04	1.52	7.43	1.47	1.39
	Минимална вредност	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.02
	Максимална вредност	42.20	2.90	11.60	7.40	41.80	6.00	4.56
	Медијана	1.85	1.50	0.25	1.35	0.30	1.35	0.33

Што се тиче вредности нЦД64, нЦД14, нПД-Л1 и ИДН првог дана и исхода (преживели, умрли), статистичком анализом је утврђено да високо значајна разлика ($p < 0.01$) постоји само код ИДН (Mann-Whitney U z: - 2.733; $p < 0.01$).

Средње вредности, стандардне девијације, медијане, распони између минималне и максималне вредности нЦД64, нЦД14, нПД-Л1 и ИДН петог дана приказане су по групама пацијената према исходу (преживели, умрли) на табели 4.7.1.2.

Табела 4.7.1.2. Вредности нЦД64, нЦД14, нПД-Л1 и ИДН петог дана према исходу

НЕУТРОФИЛИ ПЕТИ ДАН		ЦД64 %	ЦД64 W/m^2	ЦД14 %	ЦД14 W/m^2	ПД- Л1 %	ПД- Л1 W/m^2	ИДН
преживели	Средња вредност	4.57	1.61	1.90	1.65	3.29	2.91	2.74
	Стандардна девијација	6.90	0.82	10.61	1.79	14.16	3.15	5.32
	Минимална вредност	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.02
	Максимална вредност	30.40	3.80	76.00	9.20	77.00	15.00	24.00
	Медијана	1.60	1.50	0.20	1.30	0.30	2.10	0.47
умрли	Средња вредност	3.36	1.93	0.38	1.71	3.10	2.51	7.94
	Стандардна девијација	4.09	1.20	0.65	1.59	9.74	2.65	21.16
	Минимална вредност	0.10	1.10	0.00	0.00	0.00	0.00	0.02
	Максимална вредност	16.00	6.80	3.10	6.40	46.00	10.00	99.00
	Медијана	1.60	1.60	0.20	1.50	0.40	1.55	1.27

Статистичком анализом је утврђено да не постоји статистички значајна разлика у вредностима експресије нЦД64, нЦД14, нПД-Л1 и ИДН петог дана у односу на исход (преживели, умрли).

4.7.2. ПОВЕЗАНОСТ мХЛА-ДР, мЦД14, мПД-Л1 и мЦД64 СА ИСХОДОМ (ПРЕЖИВЕЛИ, УМРЛИ)

Средње вредности, стандардне девијације, медијане, распони између минималне и максималне вредности мХЛА-ДР, мЦД14, мПД-Л1 и мЦД64 првог дана приказане су по групама пацијената према исходу (преживели, умрли) на табели 4.7.2.1.

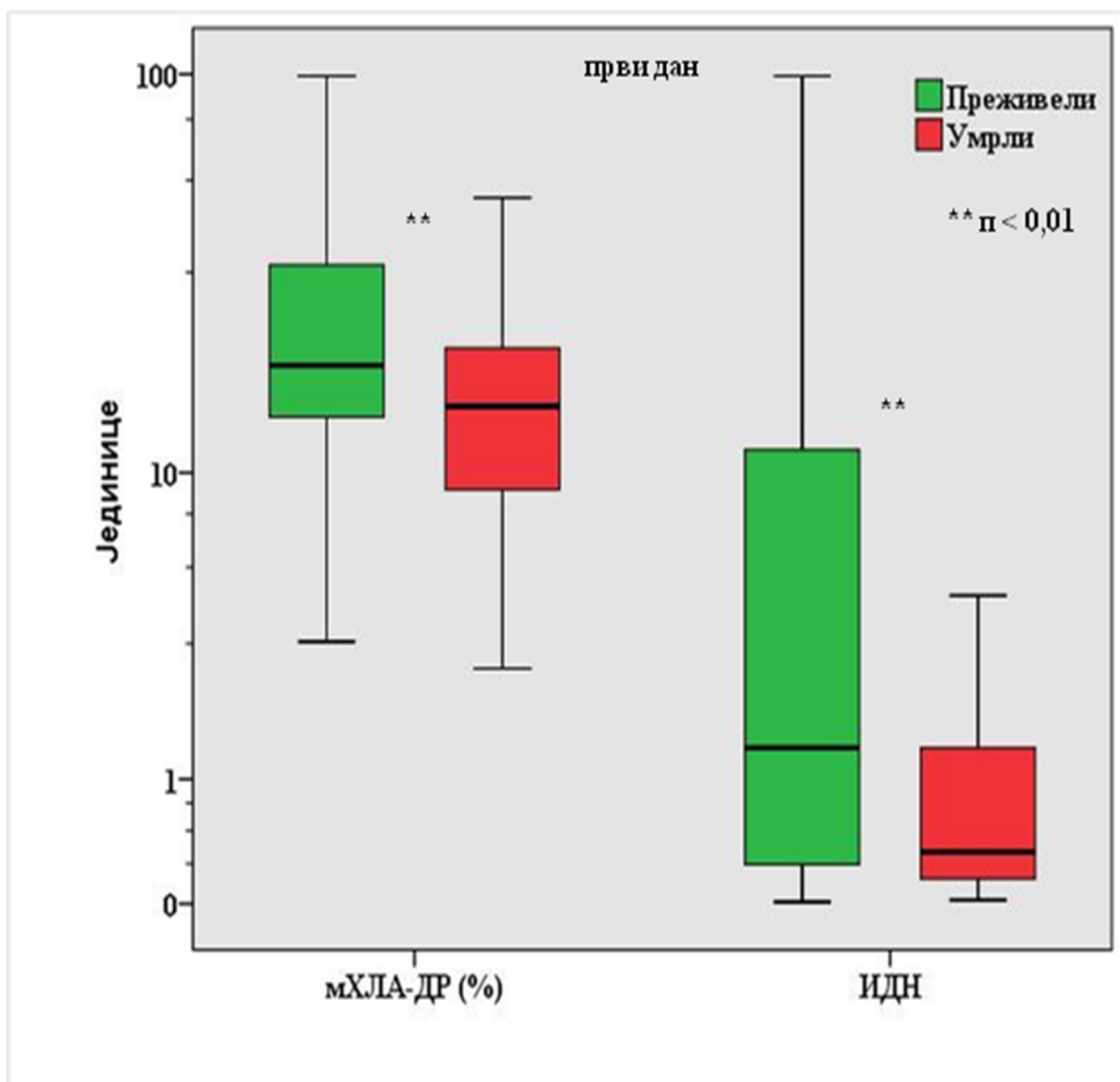
Табела 4.7.2.1. Вредности мХЛА-ДР, мЦД14, мПД-Л1 и мЦД64 првог дана према исходу

МОНОЦИТИ ПРВИ ДАН		ХЛА- ДР %	ХЛА- ДР W/m^2	ЦД14 %	ЦД14 W/m^2	ПД- Л1 %	ПД-Л1 W/m^2	ЦД64 %	ЦД6 4 W/m^2
преживел и	Средња вредност	28.65	5.74	61.64	1.14	2.01	2.75	90.35	1.90
	Стандардна девијација	24.98	2.36	31.53	0.83	6.42	7.47	9.39	1.81
	Минимална вредност	1.40	2.30	7.00	0.50	0.00	0.00	55.00	0.90
	Максимална вредност	99.00	11.00	99.00	4.80	43.50	50.00	100.0 0	14.00
	Медијана	19.00	5.40	63.00	0.70	0.40	0.90	94.00	1.60
умрли	Средња вредност	16.77	5.68	77.31	1.19	2.26	4.89	85.43	1.56
	Стандардна девијација	12.17	2.28	26.09	0.74	7.06	10.41	19.11	0.27
	Минимална вредност	2.70	2.30	10.00	0.50	0.00	0.00	0.40	1.00
	Максимална вредност	49.80	10.00	99.00	4.30	40.20	47.00	100.0 0	2.14
	Медијана	13.15	5.00	86.00	1.00	0.30	1.70	91.00	1.55

Што се тиче вредности мХЛА-ДР, мЦД14, мПД-Л1 и мЦД64 првог дана и исхода (преживели, умрли), статистичком анализом је утврђено да високо значајна разлика ($p < 0.01$) постоји код мХЛА-ДР % (Mann-Whitney U z: - 2.400; $p < 0.01$) а статистички значајна разлика постоји код, мПД-Л1 W/m^2 (Mann-Whitney U z: - 2.150; $p < 0.05$).

На графикону 4.7.2.1. приказано је поређење вредности мХЛА-ДР % и ИДН првог дана између преживелих и умрлих.

Графикон 4.7.2.1. Вредности мХЛА-ДР % и ИДН првог дана према исходу (преживели, умрли)



Средње вредности, стандардне девијације, медијане, распони између минималне и максималне вредности мХЛА-ДР, мЦД14, мПД-Л1 и мЦД64 петог дана приказане су по групама пацијената према исходу (преживели, умрли) на табели 4.7.2.2.

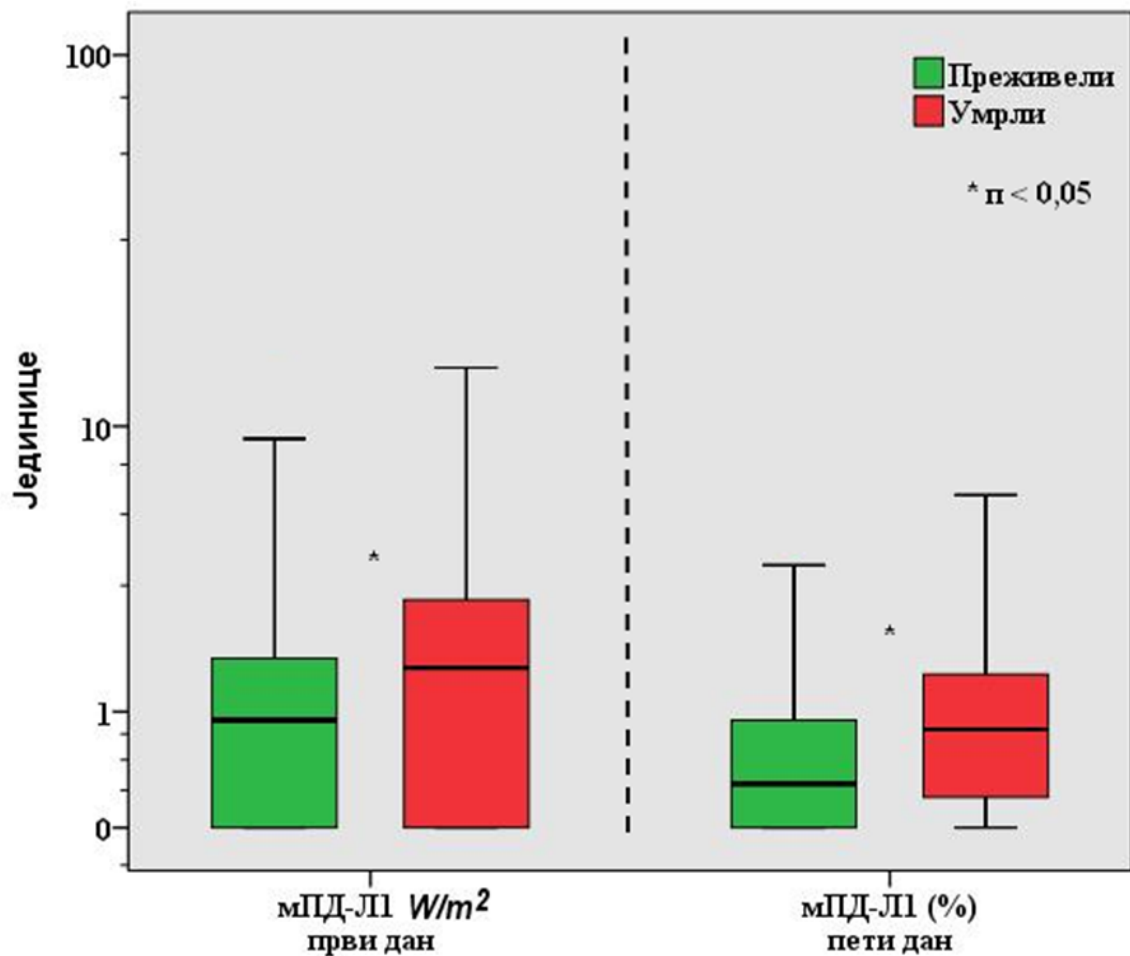
Табела 4.7.2.2. Вредности мХЛА-ДР, мЦД14, мПД-Л1 и мЦД64 петог дана према исходу

МОНОЦИТИ ПЕТИ ДАН		ХЛА- ДР %	ХЛА- ДР W/m^2	ЦД14 %	ЦД14 W/m^2	ПД- Л1 %	ПД- Л1 W/m^2	ЦД64 %	ЦД64 W/m^2
преживели	Средња вредност	26.40	5.22	59.63	0.95	2.48	3.93	80.05	1.59
	Стандардна девијација	21.74	2.20	31.09	0.46	8.27	11.77	25.66	0.78
	Минимална вредност	0.00	0.00	3.00	0.50	0.00	0.00	0.40	0.70
	Максимална вредност	99.60	11.00	98.00	2.80	49.00	76.80	99.00	5.20
	Медијана	22.00	5.10	67.00	0.80	0.30	1.12	89.00	1.40
умрли	Средња вредност	22.00	4.95	69.75	1.12	2.08	7.73	79.82	1.74
	Стандардна девијација	17.58	1.71	30.13	0.78	3.60	13.80	22.47	1.23
	Минимална вредност	4.80	1.30	0.20	0.10	0.00	0.00	9.00	1.00
	Максимална вредност	80.00	8.15	97.00	4.10	15.70	47.00	99.00	7.10
	Медијана	16.65	5.35	83.00	0.90	0.80	1.70	86.15	1.55

Статистичком анализом вредности мХЛА-ДР, мЦД14, мПД-Л1 и мЦД64 петог дана и исхода (преживели, умрли) утврђено је значајна разлика постоји само код мПД-Л1 % (Mann-Whitney U z: - 2.126; $p < 0.05$).

На графикону 4.7.2.2. приказано је поређење вредности мПД-Л1 W/m^2 првог дана и мПД-Л1 % петог дана између преживелих и умрлих.

Графикон 4.7.2.2. Вредности мПД-Л1 W/m^2 првог дана и мПД-Л1 % петог дана према исходу (преживели, умрли)



4.8. ПАРАМЕТРИ АКТИВАЦИОНОГ СТАТУСА НЕУТРОФИЛА И МОНОЦИТА У ДВА ВРЕМЕНСКА ИНТЕРВАЛА УНУТАР ГРУПА ПРЕМА ИСХОДУ (ПРЕЖИВЕЛИ, УМРЛИ)

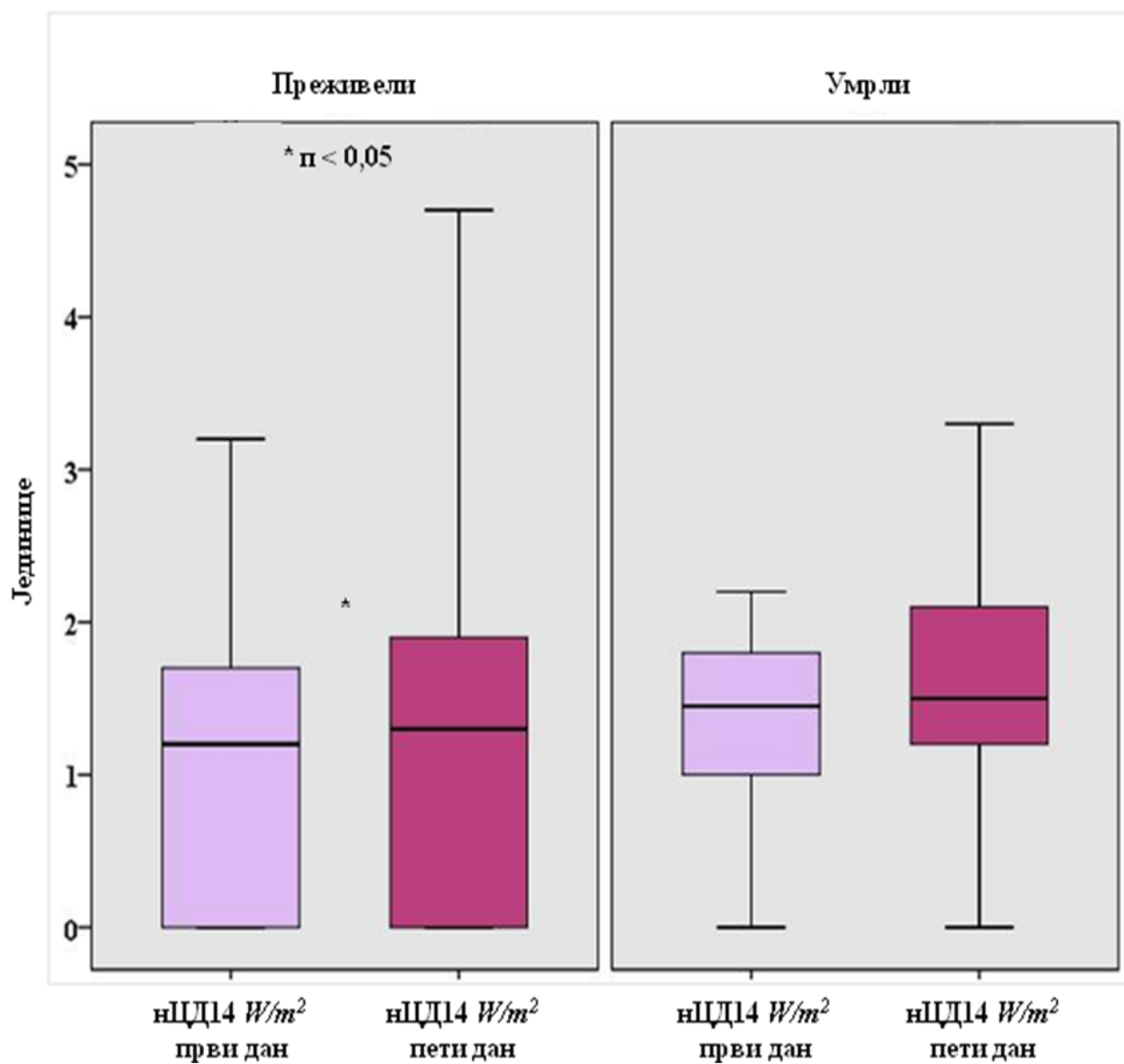
4.8.1. ПОВЕЗАНОСТ нЦД64, нЦД14, нПД-Л1 и ИДН У ДВА ВРЕМЕНСКА ИНТЕРВАЛА СА ИСХОДОМ (ПРЕЖИВЕЛИ, УМРЛИ)

Статистички су анализирани вредности нЦД64, нЦД14, нПД-Л1 и ИДН у два временска интервала (први и пети дан) у односу на исход (преживели, умрли). Утврђено је да су се вредности нЦД14 W/m^2 статистички значајно разликовале у групи преживелих а вредности нПД-Л1 % у групи умрлих. Вредности ИДН су се разликовале у обе групе: статистички високо значајно у групи преживелих и статистички значајно у групи умрлих. Ова статистичка анализа приказана је на табели 4.8.1.1.

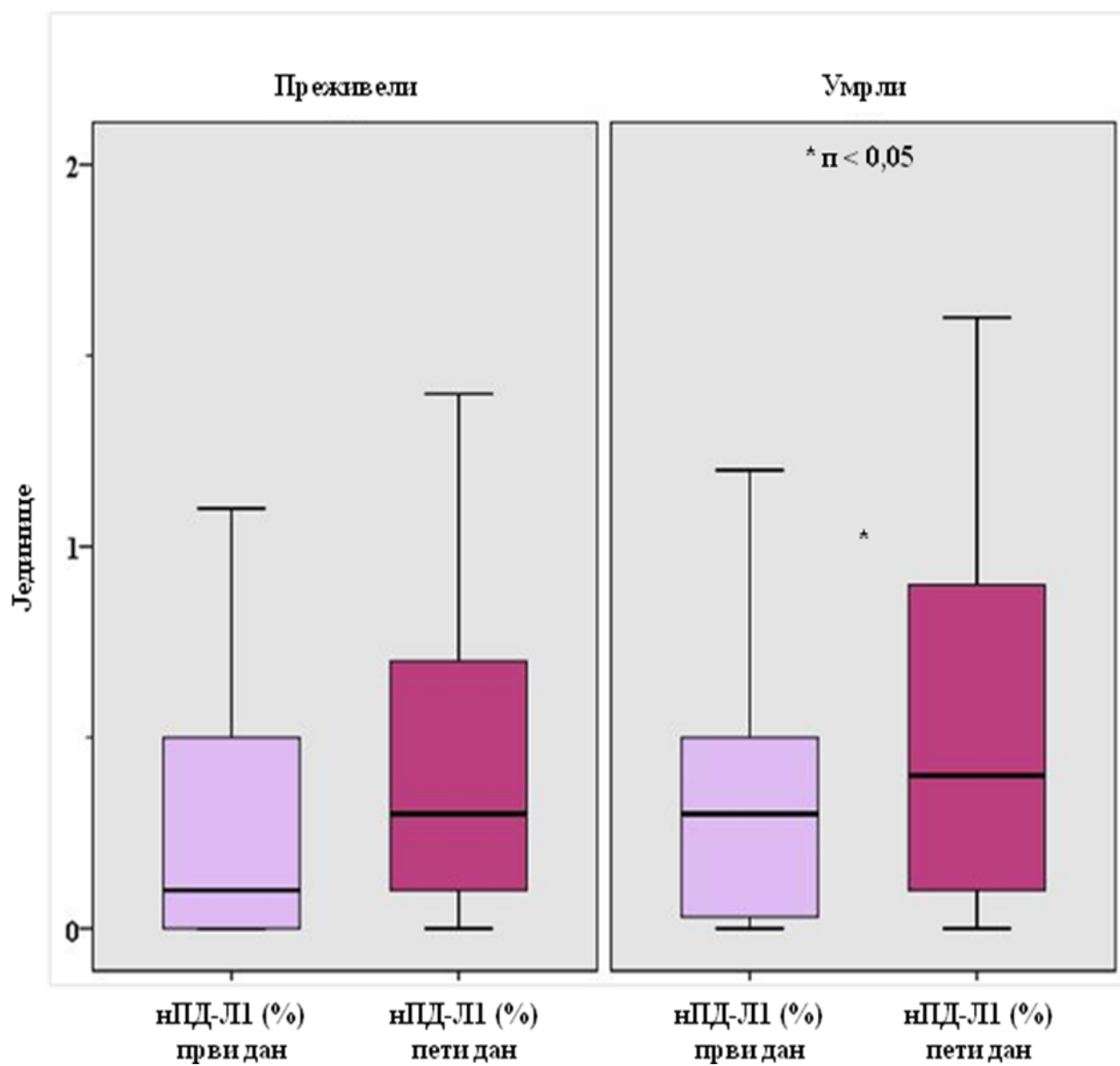
Табела 4.8.1.1. Поређење вредности нЦД14 W/m^2 , нПД-Л1 % и ИДН у два временска интервала унутар групе преживелих и групе умрлих

Параметар	нЦД14 W/m^2		нПД-Л1 %		ИДН	
	преживели	умрли	преживели	умрли	преживели	умрли
<i>Chi-square</i> <i>Mann-Whitney U</i>	$z: -2.023$ $p < 0.05$	$p > 0.05$	$p > 0.05$	$z: -2.003$ $p < 0.05$	$z: -2.691$ $p < 0.01$	$z: -2.107$ $p < 0.05$

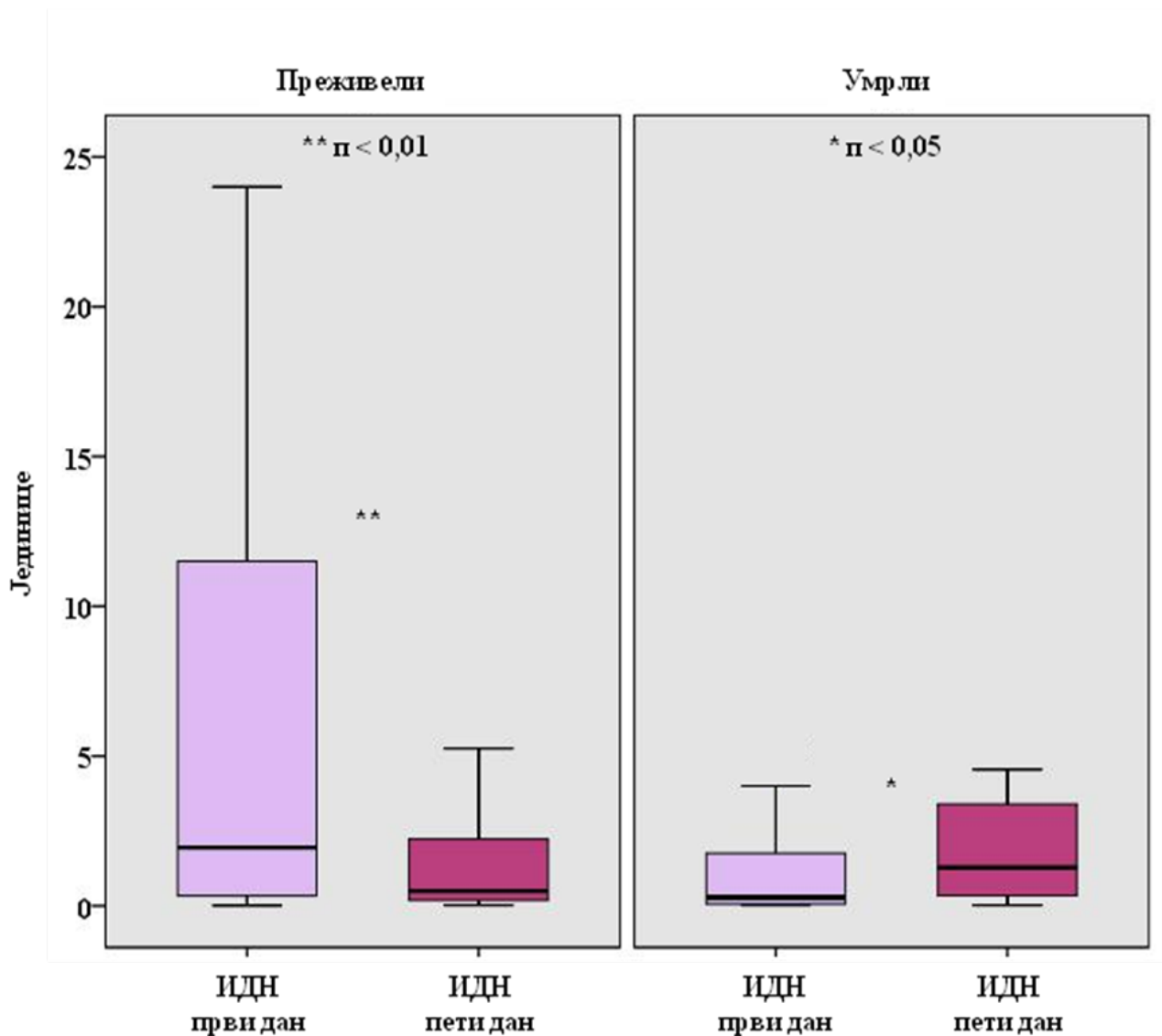
На графиконима 4.8.1.1., 4.8.1.2 и 4.8.1.3. приказане су вредности нЦД14 W/m^2 , нПД-Л1 % и ИДН у два временска интервала (први и пети дан) унутар групе преживелих и групе умрлих.

Графикон 4.8.1.1. Вредности нЦД14 W/m^2 првог и петог дана према исходу (преживели, умрли)

Графикон 4.8.1.2. Вредности нПД-Л1 % првог и петог дана према исход (преживели, умрли)



Графикон 4.8.1.3. Вредности ИДН првог и петог дана према исходу (преживели, умрли)



4.8.2. ПОВЕЗАНОСТ мХЛА-ДР, мЦД14, мПД-Л1 и мЦД64 У ДВА ВРЕМЕНСКА ИНТЕРВАЛА СА ИСХОДОМ (ПРЕЖИВЕЛИ, УМРЛИ)

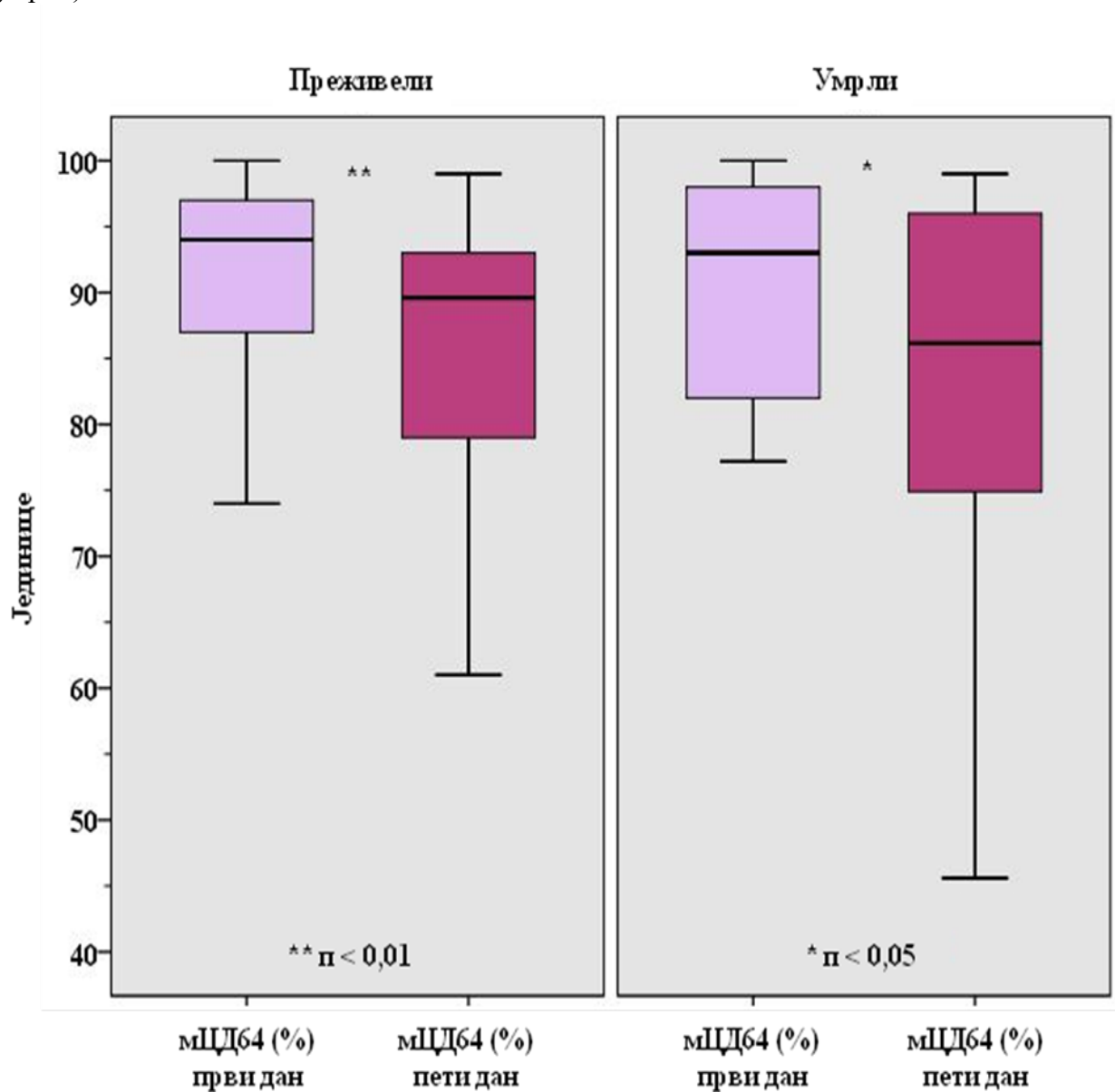
Статистички су анализирани вредности мХЛА-ДР, мЦД14, мПД-Л1 и мЦД64 у два временска интервала (први и пети дан) у односу на исход (преживели, умрли). Утврђено је да су се вредности мЦД64 % разликовале у обе групе: статистички високо значајно у групи преживелих и статистички значајно у групи умрлих. Поред тога, статистички значајно су се разликовале вредности мЦД14 % и ПД-Л1 % у групи умрлих. Ова статистичка анализа приказана је на табели 4.8.2.1.

Табела 4.8.2.1. Поређење вредности мЦД64 %, мЦД14 % и мПД-Л1 % у два временска интервала унутар групе преживелих и групе умрлих

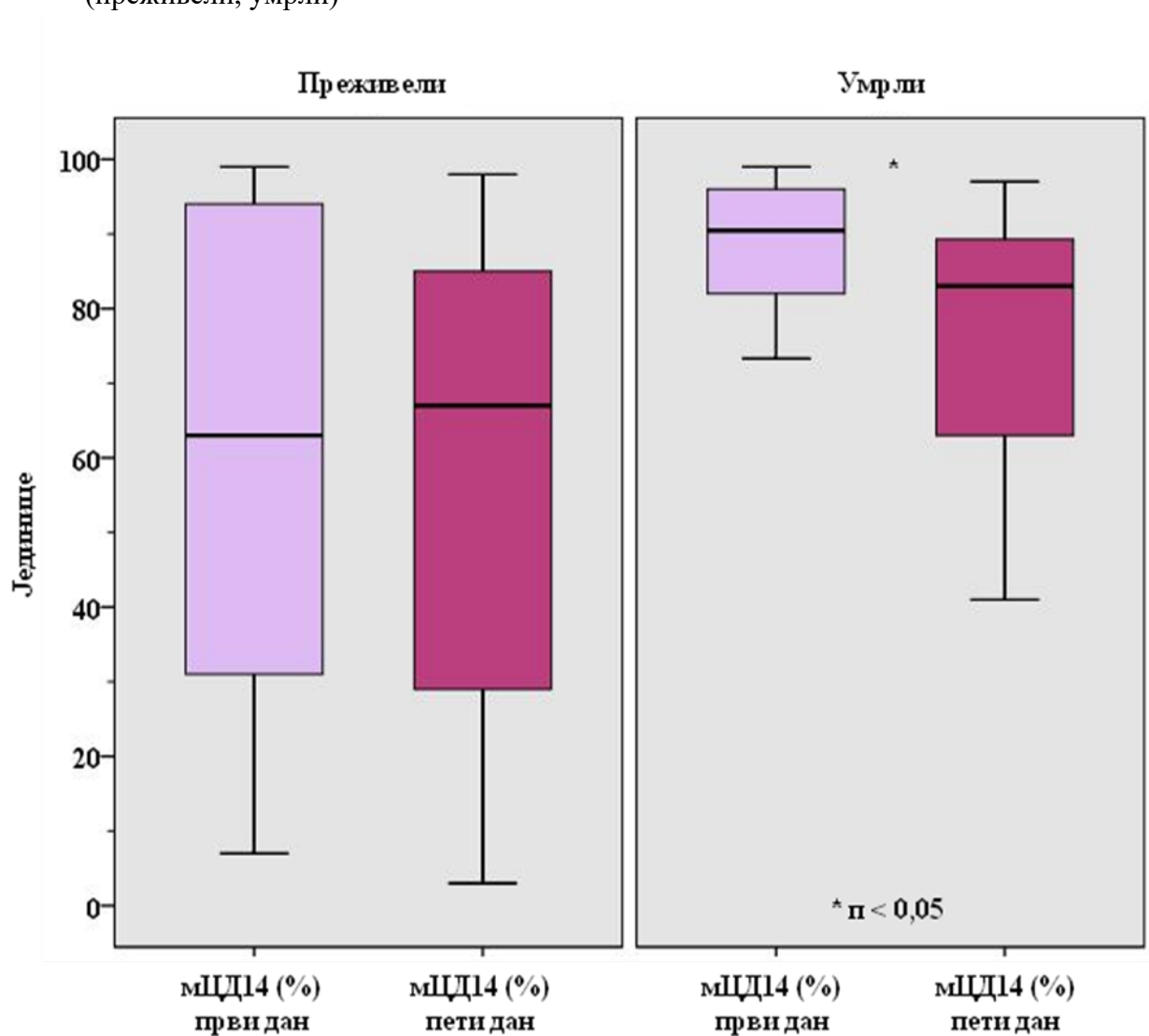
Параметар	мЦД64 %		мЦД14 %		мПД-Л1 %	
	преживели	умрли	преживели	умрли	преживели	умрли
<i>Chi-square</i> <i>Mann-Whitney U</i>	$z: -2.553$ $p < 0.01$	$z: -2.030$ $p < 0.05$	$p > 0.05$	$z: -2.014$ $p < 0.05$	$p > 0.05$	$z: -2.257$ $p < 0.05$

На графиконима 4.8.2.1., 4.8.2.2 и 4.8.2.3. приказане су вредности мЦД64 %, мЦД14 % и мПД-Л1 % у два временска интервала (први и пети дан) унутар групе преживелих и групе умрлих.

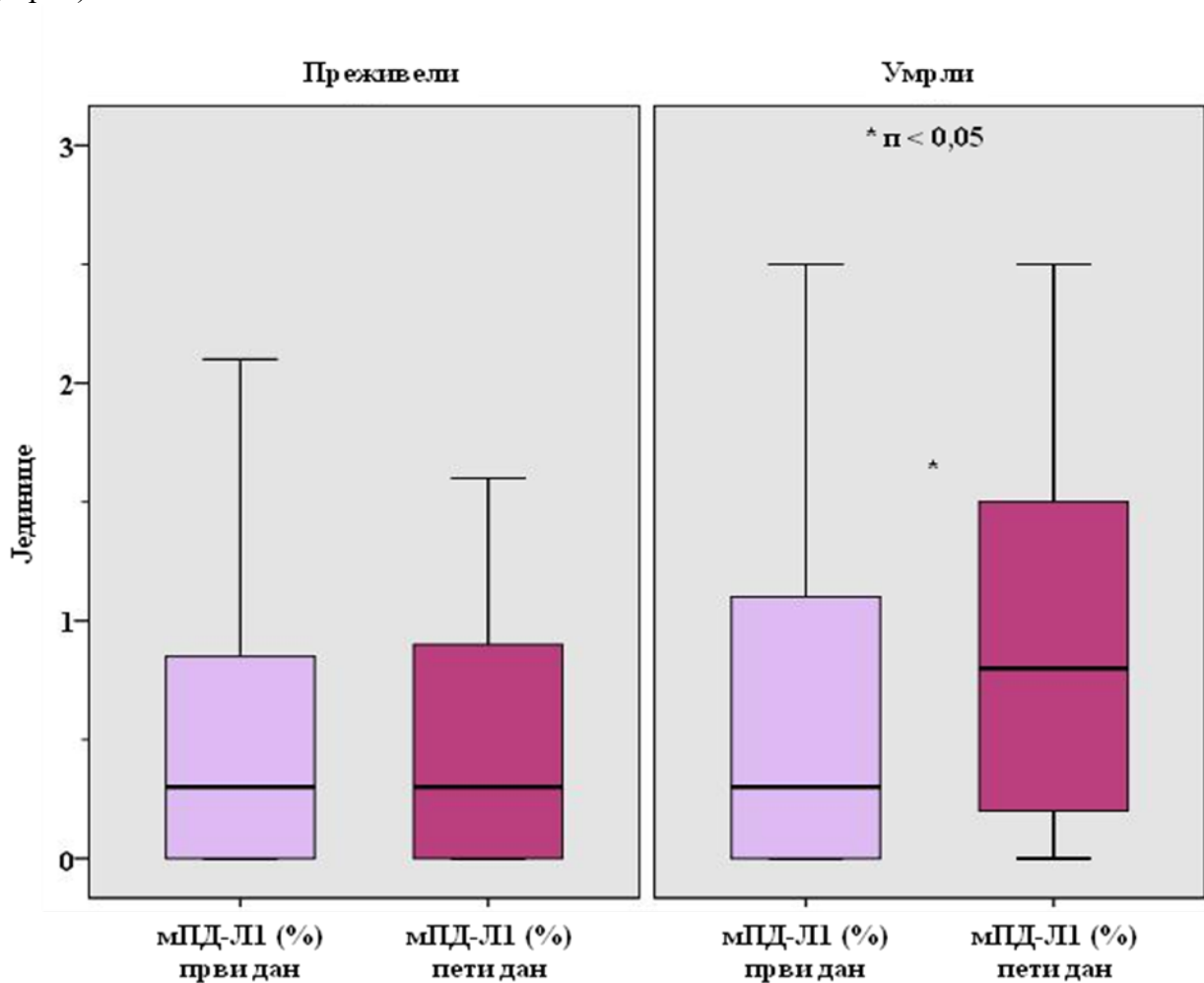
Графикон 4.8.2.1. Вредности мЦД64 % првог и петог дана према исходу (преживели, умрли)



Графикон 4.8.2.2. Вредности мЦД14 % првог и петог дана према исходу (преживели, умрли)



Графикон 4.8.2.3. Вредности мПД-Л1 % првог и петог дана према исходу (преживели, умрли)



4.9. КОРЕЛАЦИЈА ИЗМЕЂУ ПАРАМЕТАРА АКТИВАЦИОНОГ СТАТУС НЕУТРОФИЛА И МОНОЦИТА

4.9.1. КОРЕЛАЦИЈА ИЗМЕЂУ нЦД64, нЦД14, нПД-Л1 и ИДН У ДВА ВРЕМЕНСК ИНТЕРВАЛА

Корелација између нЦД64, нЦД14, нПД-Л1 и ИДН у два временска интервала анализирана је *Spearman*-овим тестом да би се утврдио коефицијент корелације ρ . Статистички значајне и високо значајне позитивне корелације између ових параметара активационог статуса неутрофила првог дана приказане су на табели 4.9.1.1.

Табела 4.9.1.1. *Spearman* ρ корелације између параметара активационог статуса неутрофила првог дана

Параметар	нЦД14 %	нПД-Л1 %	нПД-Л1 W/m^2
нЦД64 %	$\rho = 0.316$ $p = 0.004$		
нЦД64 W/m^2	$\rho = 0.261$ $p = 0.018$		
нЦД14 %		$\rho = 0.448$ $p = 0.000$	
нЦД14 W/m^2		$\rho = 0.343$ $p = 0.002$	$\rho = 0.266$ $p = 0.015$
ИДН			$\rho = 0.240$ $p = 0.032$

Статистички значајне и високо значајне позитивне корелације између параметара активационог статуса неутрофила петог дана приказане су на табели 4.9.1.2.

Табела 4.9.1.2. *Spearman* ρ корелације између параметара активационог статус неутрофила петог дана

Параметар	нЦД14 W/m^2	нПД-Л1 %	нПД-Л1 W/m^2	ИДН
нЦД64 W/m^2	$\rho = 0.250$ $p = 0.033$			
нЦД14 %		$\rho = 0.397$ $p = 0.001$		$\rho = 0.281$ $p = 0.016$
нЦД14 W/m^2		$\rho = 0.313$ $p = 0.007$	$\rho = 0.293$ $p = 0.012$	

4.9.2. КОРЕЛАЦИЈА ИЗМЕЂУ мХЛА-ДР, мЦД14, мПД-Л1 и мЦД64 У ДВА ВРЕМЕНСКА ИНТЕРВАЛА

Корелација између мХЛА-ДР, мЦД14, мПД-Л1 и мЦД64 у два временска интервала анализирана је *Spearman*-овим тестом да би се утврдио коефицијент корелације ρ . Статистички значајне и високо значајне позитивне корелације између ових параметара активационог статуса моноцита првог дана приказане су на табели 4.9.2.1.

Табела 4.9.2.1. *Spearman* ρ корелације између параметара активационог статуса моноцита првог дана

Параметар	МПД-Л1 %	МПД-Л1 W/m^2	МПД64 %	МПД64 W/m^2
МХЛА-ДР %	$\rho = 0.206$ $n = 0.047$		$\rho = 0.215$ $n = 0.041$	
МПД14 %		$\rho = 0.214$ $n = 0.040$	$\rho = 0.369$ $n = 0.001$	$\rho = 0.256$ $n = 0.020$
МПД14 W/m^2	$\rho = 0.301$ $n = 0.006$	$\rho = 0.273$ $n = 0.013$		$\rho = 0.231$ $n = 0.036$
МПД-Л1 %			$\rho = 0.292$ $n = 0.007$	

Статистички високо значајне позитивне корелације између параметара активационог статуса моноцита петог дана приказане су на табели 4.9.2.2.

Табела 4.9.2.2. *Spearman* ρ корелације између параметара активационог статус моноцита петог дана

Параметар	МПД64 %
МПД14 %	$\rho = 0.382$ $n = 0.001$
МПД14 W/m^2	$\rho = 0.325$ $n = 0.005$

4.9.3. КОРЕЛАЦИЈА ИЗМЕЂУ ПАРАМЕТАРА АКТИВАЦИОНОГ СТАТУС НЕУТРОФИЛА И МОНОЦИТА УНУТАР ГРУПА ПРЕМА ИСХОДУ (ПРЕЖИВЕЛИ, УМРЛИ)

Корелација између параметара активационог статуса неутрофила и моноцита унутар група према исходу анализирана је *Spearman*-овим тестом да би се утврдио коефицијент корелације ρ . Статистички значајне и високо значајне позитивне корелације између ових параметара активационог статуса неутрофила и моноцита првог дана приказане су на табели 4.9.3.1.

Табела 4.9.3.1. *Spearman* ρ корелације између параметара активационог статус неутрофила и моноцита унутар група према исходу првог дана

	Параметар	ИДН	мПД-Л1 W/m^2
Сви пацијенти	мХЛА-ДР %	$\rho = 0.330$ $p = 0.003$	
Преживели	мХЛА-ДР %	$\rho = 0.267$ $p = 0.040$	
Умрли	мХЛА-ДР %		$\rho = 0.340$ $p = 0.037$

Генерално гледано, када се у обзир узму сви пацијенти, утврђено је више статистички значајних и високо значајних позитивних корелација између неких од испитиваних параметара активационог статуса неутрофила и моноцита. Без обзира на статистичку значајност, већина корелација је била слаба (ρ испод или око 0.5).

4.9.4. КОРЕЛАЦИЈА ИЗМЕЂУ ПРЕСЕПСИНА (СОЛУБИЛНИ ЦД14 – сЦД14), нЦД14 и мЦД14 У ДВА ВРЕМЕНСКА ИНТЕРВАЛА

Корелација између сЦД64, нЦД14, и мЦД14 у два временска интервала анализирана је *Spearman*-овим тестом да би се утврдио коефицијент корелације ρ . Статистички значајне и високо значајне позитивне корелације између ових параметара првог дана приказане су на табели 4.9.4.1.

Табела 4.9.4.1. *Spearman* ρ корелације између сЦД64, нЦД14, и мЦД14 првог дана

Параметар	сЦД14 пг/мЛ	нЦД14 %	нЦД14 W/m^2	мЦД14 %	мЦД14 W/m^2
сЦД14 пг/мЛ		$\rho = 0.218$ $p = 0.045$	$p > 0.05$	$p > 0.05$	$p > 0.05$
нЦД14 %			$\rho = 0.681$ $p = 0.000$	$\rho = 0.596$ $p = 0.000$	$\rho = 0.728$ $p = 0.000$
нЦД14 W/m^2				$\rho = 0.448$ $p = 0.000$	$\rho = 0.478$ $p = 0.000$
мЦД14 %					$\rho = 0.713$ $p = 0.000$
мЦД14 W/m^2					

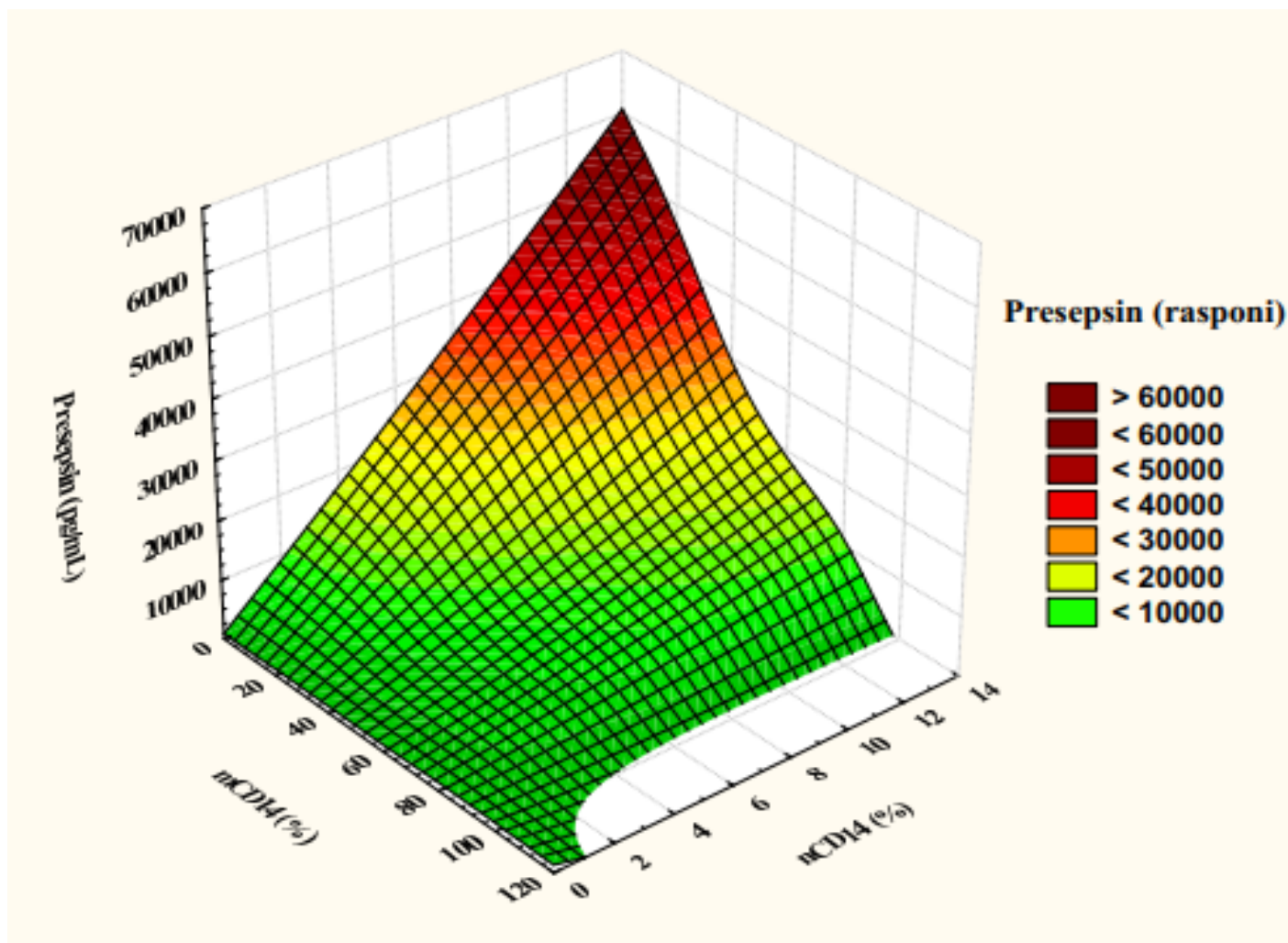
Статистички значајне и високо значајне позитивне корелације између сЦД64, нЦД14, и мЦД14 петог дана приказане су на табели 4.9.4.2.

Табела 4.9.4.2. *Spearman* ρ корелације између сЦД14, нЦД14, и мЦД14 петог дана

Параметар	сЦД14 пг/мЛ	нЦД14 %	нЦД14 W/m^2	мЦД14 %	мЦД14 W/m^2
сЦД14 пг/мЛ		$p > 0.05$	$p > 0.05$	$p > 0.05$	$\rho = 0.246$ $p = 0.036$
нЦД14 %			$\rho = 0.515$ $p = 0.000$	$\rho = 0.264$ $p = 0.024$	$\rho = 0.368$ $p = 0.001$
нЦД14 W/m^2				$p > 0.05$	$p > 0.05$
мЦД14 %					$\rho = 0.613$ $p = 0.000$
мЦД14 W/m^2					

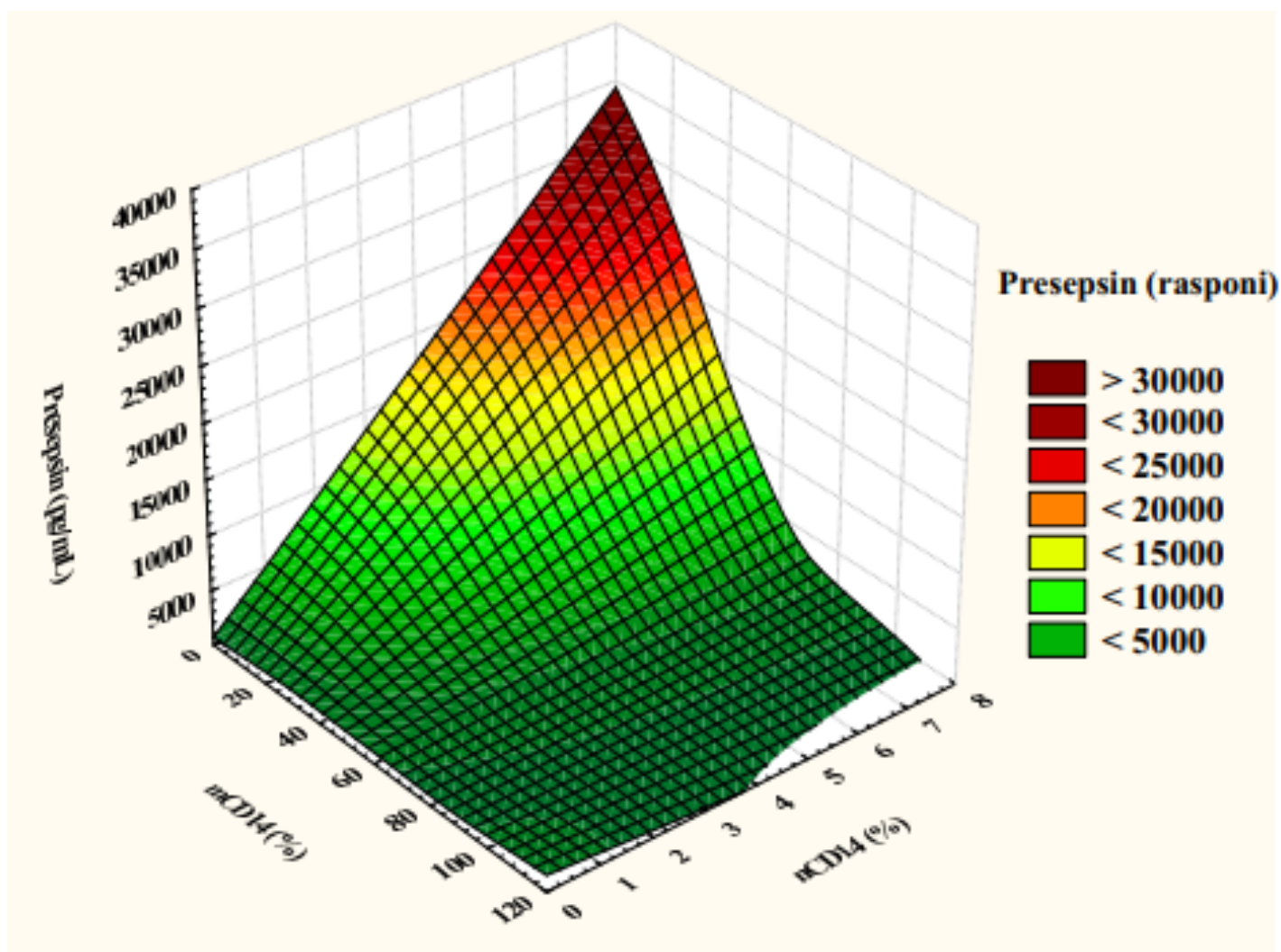
Однос вредности пресепсина, нЦД14, и мЦД14 за целокупну популацију пацијената приказан је на графикону 4.9.4.1., за групу преживелих на графикону 4.9.4.2. а за групу умрлих 4.9.4.3.

Графикон 4.9.4.1. Однос вредности пресепсина, нЦД14, и мЦД14 за све пацијенте



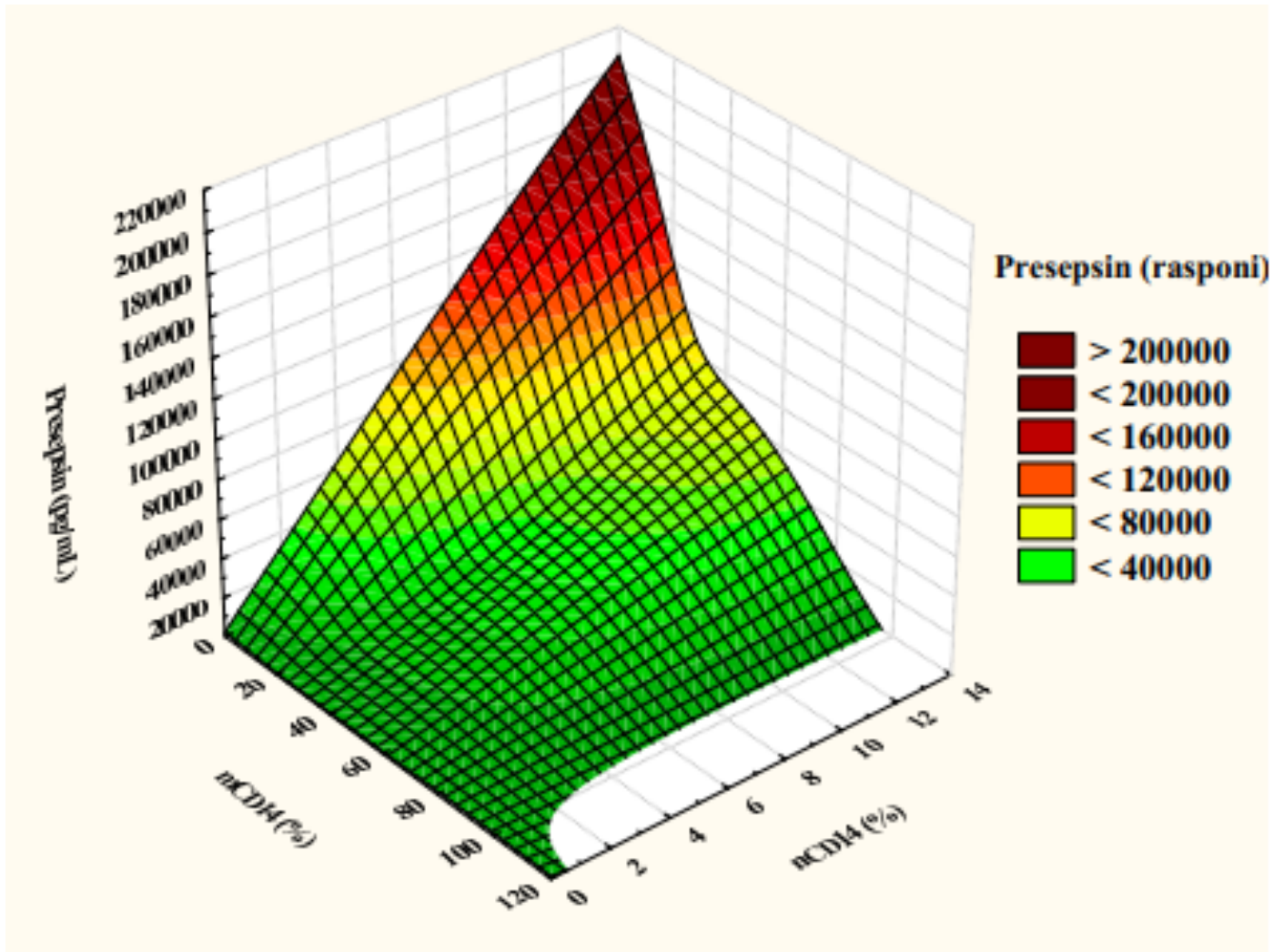
У целокупној популацији пацијената максимални нивои пресепсина могу се очекивати при распону мЦД14 од 0% до 60% и при вредностима нЦД14 изнад 6%

Графикон 4.9.4.2. Однос вредности пресепсина, нЦД14, и мЦД14 у групи преживелих пацијената



У групи преживелих пацијената, максимални нивои пресепсина се могу очекивати при распону мЦД14 од 0% до 40% и при вредностима нЦД14 изнад 4%.

Графикон 4.9.4.3. Однос вредности пресепсина, нЦД14, и мЦД14 у групи умрлих пацијената



У групи умрлих пацијената, максимални нивои пресепсина се могу очекивати при распону мЦД14 од 0% до 40% и при вредностима нЦД14 изнад 6%.

Генерално, високи нивои пресепсина могу бити праћени и ниским вредностима мЦД14% али су увек праћени повишеним вредностима нЦД14%.

4.10. ПАРАМЕТРИ АКТИВАЦИОНОГ СТАТУСА НЕУТРОФИЛА И МОНОЦИТА КАО ПРЕДИКТОРИ ЛЕТАЛНОГ ИСХОДА

Клиничка тачност параметара активационог статуса неутрофила и моноцита у предикцији леталног исхода испитивана је у оба временска интервала (први и пети дан). Првог дана ИДН, мХЛА-ДР % и мПД-Л1 W/m^2 показали су статистички значајну способност предикције леталног исхода. Нивои ИДН и мХЛА-ДР % мањи од *cut-off* вредности, као и нивои мПД-Л1 W/m^2 већи од *cut-off* вредности су умерено добри предиктори леталног исхода (табела 4.10.1.).

Табела 4.10.1. Клиничка тачност параметара активационог статуса неутрофила и моноцита у предикцији леталног исхода првог дана

Параметар	<i>AUC ROC</i>	вредност п	95% Интервал поверења		<i>Cut-off</i> вредност	Сензитивност (%)	Специфичност (%)	<i>Youden-ов</i> индекс
			Доња граница	Горња граница				
ИДН	0.671	0.011	0.555	0.787	2.398	86.2	47.1	0.333
мХЛА-ДР %	0.657	0.015	0.538	0.776	13.65	53.1	76.5	0.296
мПД-Л1 W/m^2	0.612	0.045	0.485	0.739	1.55	56.3	68.6	0.249

Петог дана ни један од испитиваних параметара активационог статуса неутрофила и моноцита није показао статистички значајну способност предикције леталног исхода.

4.11. КОМБИНАЦИЈА ИДН, мХЛА-ДР % и мПД-Л1 W/m^2 У КОМПОЗИТНИ БИОСКОР

Комбинација ИДН, мХЛА-ДР % и мПД-Л1 W/m^2 у један композитни биоскор првог дана је спроведена да би се утврдило да ли би се тиме побољшала способност предикције леталног исхода. Индивидуалне вредности параметара су скориране са 0 бодова или 1 бодом у зависности од тога да ли су испод или изнад претходно утврђених *cut-off* нивоа применом *ROC* анализе. Овај композитни биоскор има распон од 0 до 3 бода.

Првог дана, композитни биоскор је показао статистички високо значајну способност предикције леталног исхода. Вредности веће од *cut-off* нивоа су веома добри предиктори леталног исхода (табела 4.11.1.)

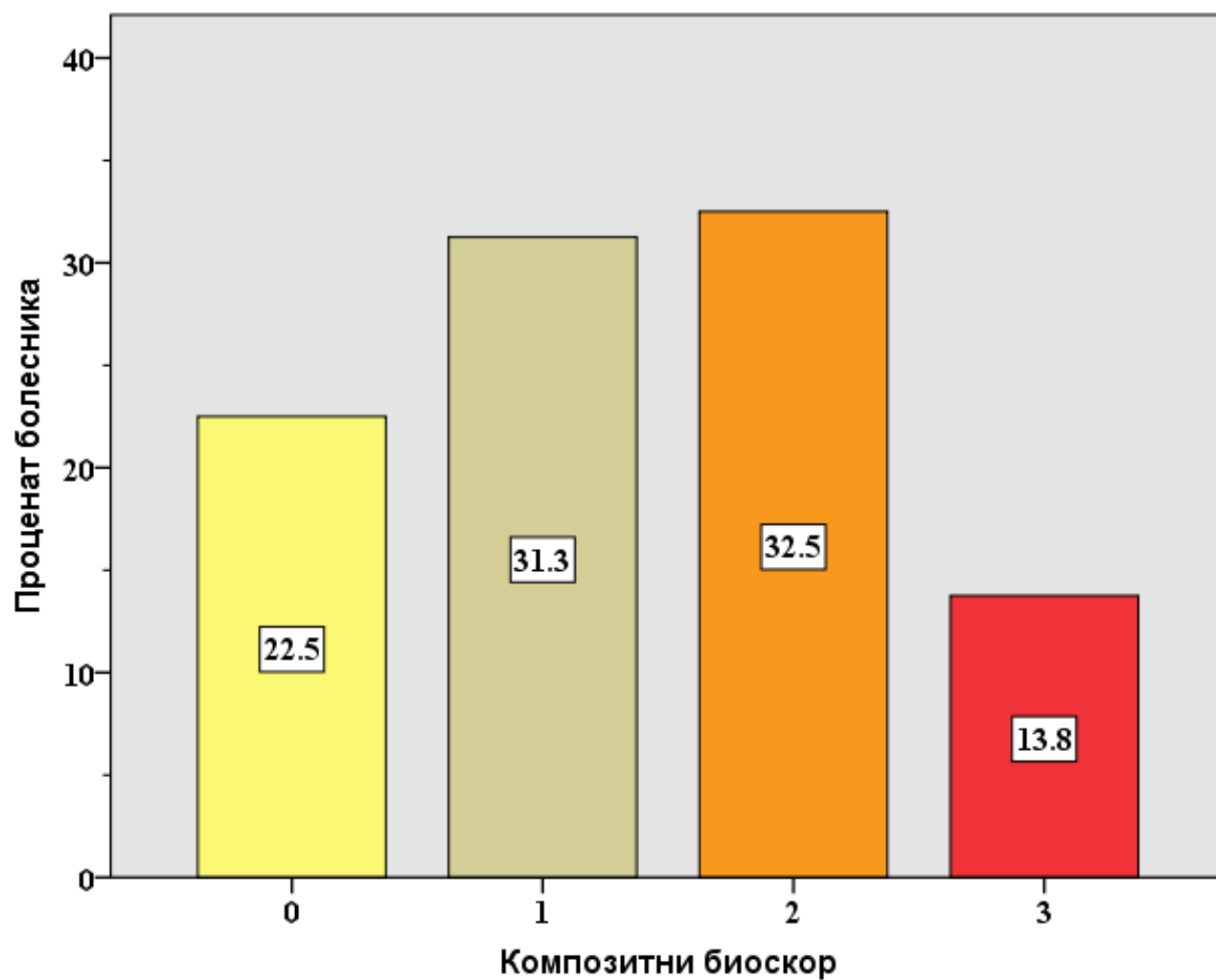
Табела 4.11.1. Клиничка тачност композитног биоскора у предикцији леталног исхода првог дана

Композитни биоскор	<i>AUC ROC</i>	вредност п	95% Интервал поверења		<i>Cut-off</i> вредност	Сензитивност (%)	Специфичност (%)	<i>Youden-ов</i> индекс
			Доња граница	Горња граница				
	0.732	0.001	0.621	0.842	1.00	82.8	50.0	0.328

Првог дана дана композитни биоскор је имао већу *AUC/ROC* вредност у поређењу са индивидуалним параметрима који га сачињавају.

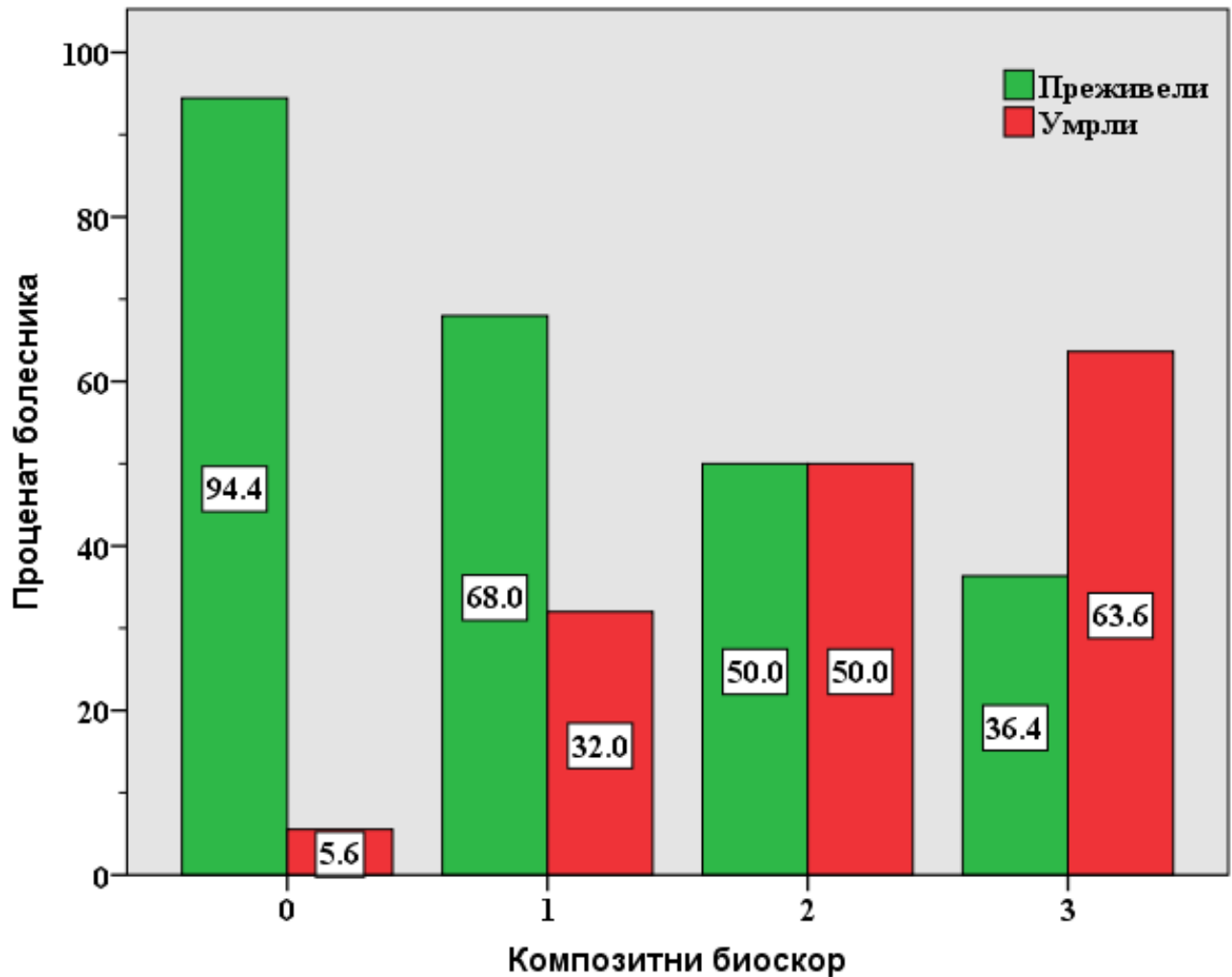
На графикону 4.11.1. приказана је дистрибуција пацијената према свакој вредности композитног биоскора у бодовима првог дана.

Графикон 4.11.1. Дистрибуција болесника према вредностима композитног биоскора првог дана



На графикону 4.11.2. приказан је проценат преживелих и умрлих болесника у односу на сваку појединачну вредност композитног биоскора у бодовима првог дана.

Графикон 4.11.2. Дистрибуција болесника према вредностима композитног биоскора првог дана у односу на исход



4.12. НЕЗАВИСНИ ПРОГНОСТИЧКИ ЗНАЧАЈ ПАРАМЕТАРА АКТИВАЦИОНОГ СТАТУСА НЕУТРОФИЛА И МОНОЦИТА У ПРЕДИКЦИЈИ ЛЕТАЛНОГ ИСХОДА

Повезаност испитиваних параметара активационог статуса неутрофила и моноцита са једне стране и леталног исхода са друге стране процењивана је униваријантном логистичком регресионом анализом. Однос шанси (*Odds ratio* – *OR*) са 95%-ним интервалом поверења (*Confidence Interval* – *CI*) је израчунат за сваки параметар. Даљи мултиваријантни логистички регресиони модел је коришћен да се утврде потенцијални независни предиктори леталног исхода, без могућих других утицаја, у сваком временском интервалу.

На табели 4.12.1. приказана је униваријантна и мултиваријантна логистичка регресиона анализа параметара активационог статуса неутрофила и моноцита у предикцији леталног исхода првог дана. Униваријантна логистичка регресиона

анализа показала је статистичку значајност за ИДН, мХЛА-ДР % и мПД-Л1 W/m^2 . Ова анализа показује да болесник са вредностима ИДН мањим од 2.398 има 5.556 пута већу шансу да умре; болесник са вредностима мХЛА-ДР % мањим од 13.65 има 3.683 пута већу шансу да умре, а болесника са вредностима мПД-Л1 W/m^2 већим од 1.55 има 2.812 пута већу шансу да умре. Једини независни предиктор леталног исхода утврђен мултиваријантном логистичком регресионом анализом првог дана је ИДН. Друга два параметра су изгубила статистичку значајност у мултиваријантној регресионој анализи, тако да нису били независни предиктори леталног исхода у овом временском интервалу.

Табела 4.12.1. Униваријантна и мултиваријантна логистичка регресиона анализа параметара активационог статуса неутрофила и моноцита као предиктора леталног исхода првог дана

параметар	OR	униваријантна логистичка регресиона анализа			OR	мултиваријантна логистичка регресиона анализа		
		95% CI		п вредност		95% CI		п вредност
ИДН	5.556	1.690	8.264	0.005	4.052	1.157	4.183	0.029
мХЛА-ДР %	3.683	1.426	9.515	0.007	2.025	0.702	5.840	0.192
мПД-Л1 W/m^2	2.812	1.126	7.024	0.027	2.318	0.849	6.328	0.101

4.13. ВРЕМЕ ПРЕЖИВЉАВАЊА У ОДНОСУ НА ВРЕДНОСТИ ИДН, мХЛА-ДР% И мПД-Л1 W/m^2 ПРВОГ ДАНА

Време преживљавања у односу на *cut-off* вредности ИДН, мХЛА-ДР% и мПД-Л1 W/m^2 првог дана анализирано је тестом *Mantel-Cox log rank* а вероватноћа леталног исхода у односу на *cut-off* вредности ИДН, мХЛА-ДР% И мПД-Л1 W/m^2 анализирана је *Kaplan-Meier*-овом кривом преживљавања.

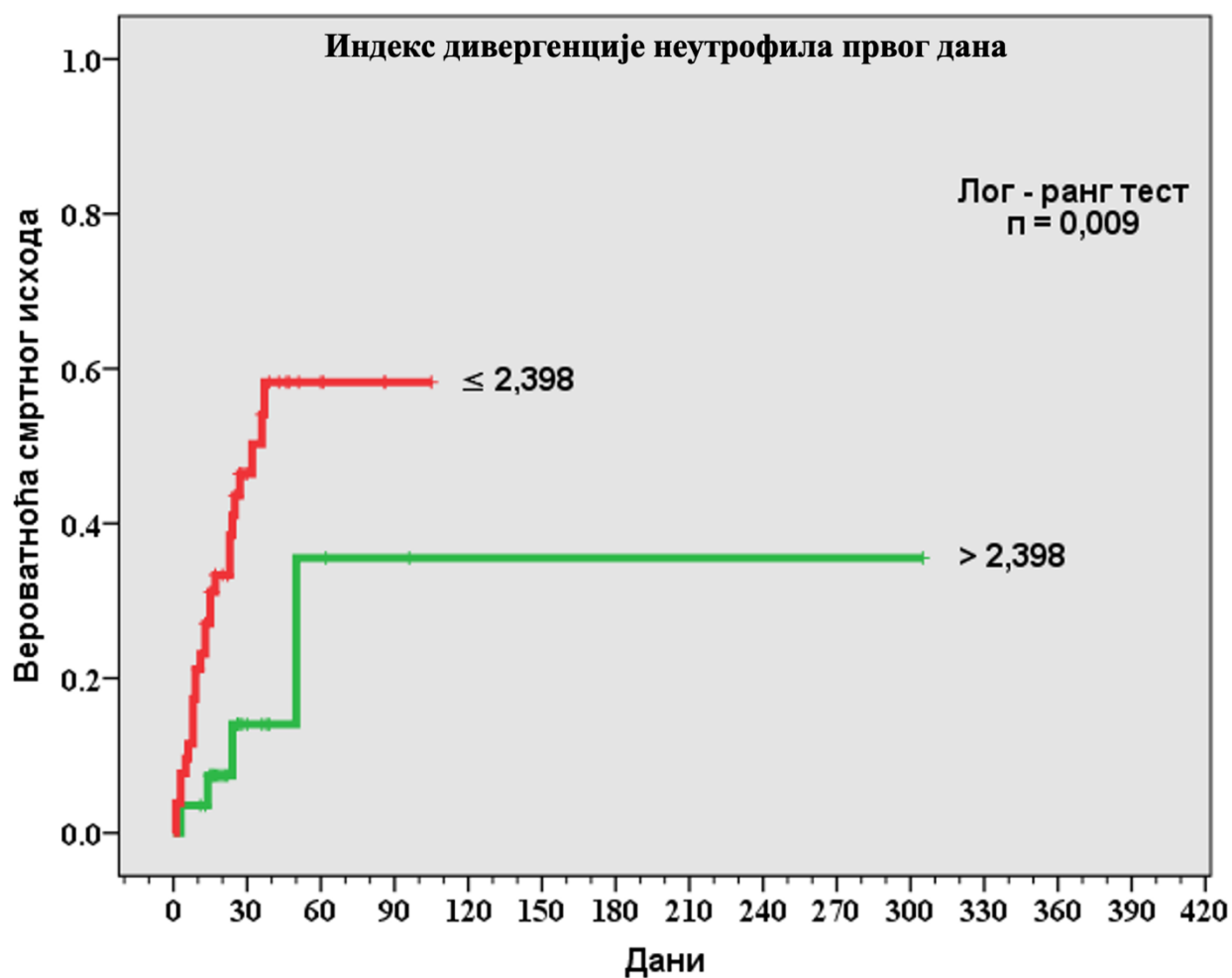
Анализа медијана преживљавања у данима, у односу на *cut-off* вредности ИДН, мХЛА-ДР% и мПД-Л1 W/m^2 , показала је да је у испитиваној популацији критично оболелих са секундарном сепсом критичан био педесети дан због тога што је тог дана процењени морталитет био 50%.

Log rank поређења између парова група утврдила су да постоји статистички значајна до високо значајна разлика у односу на *cut-off* вредности ИДН, мХЛА-ДР% и мПД-Л1 W/m^2 у времену преживљавања (табела 4.13.1. и графикони 4.13.1., 4.13.2 и 4.13.3).

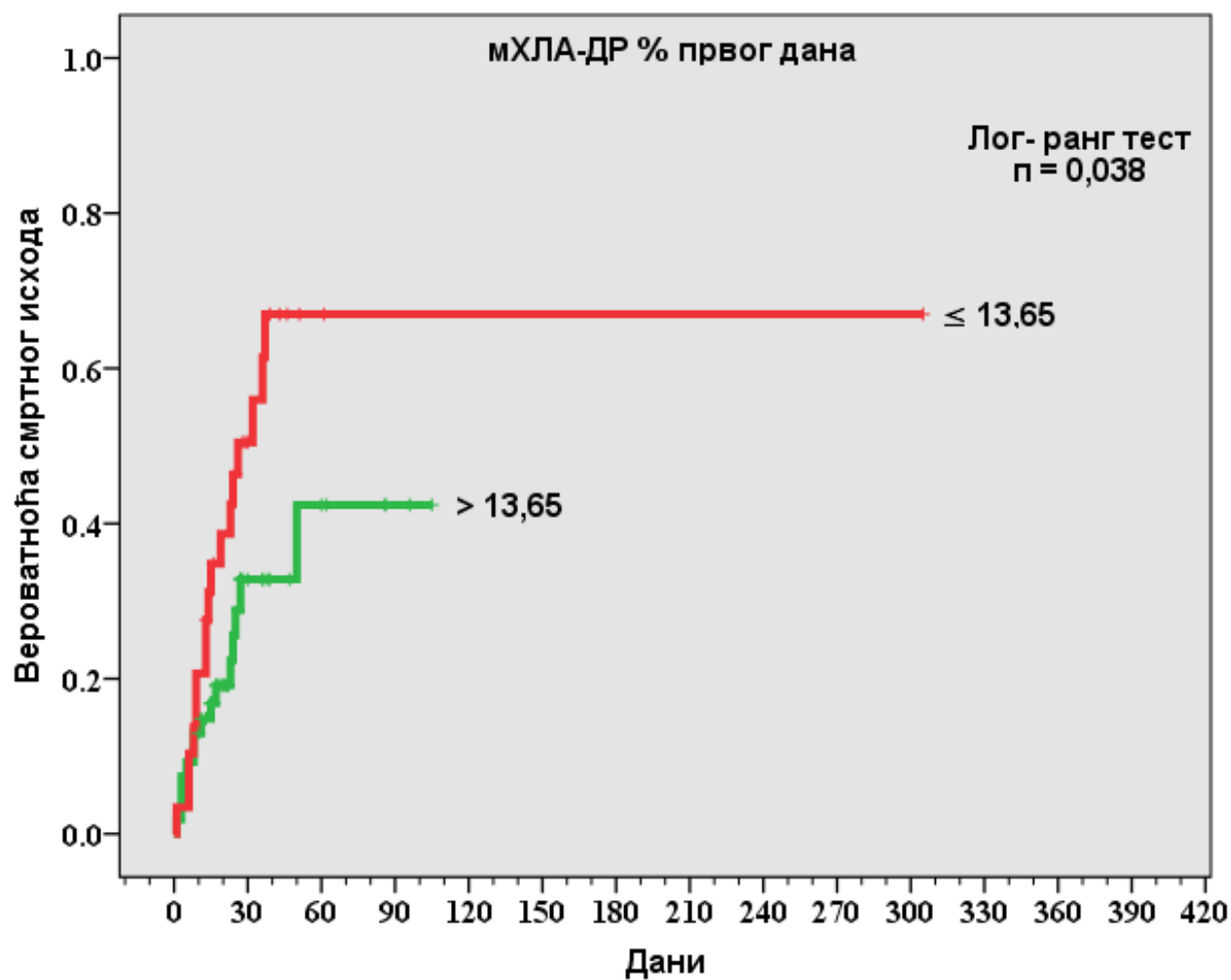
Табела 4.13.1. *Log rank* поређења времена преживљавања у односу на вредности ИДН, мХЛА-ДР% и мПД-Л1 W/m^2 првог дана

<i>Mantel Cox Log Rank</i>	параметар	<i>Chi-Square</i>	п вредност
	ИДН	6.849	0.009
	мХЛА-ДР%	4.320	0.038
	мПД-Л1 W/m^2	3.012	0.040

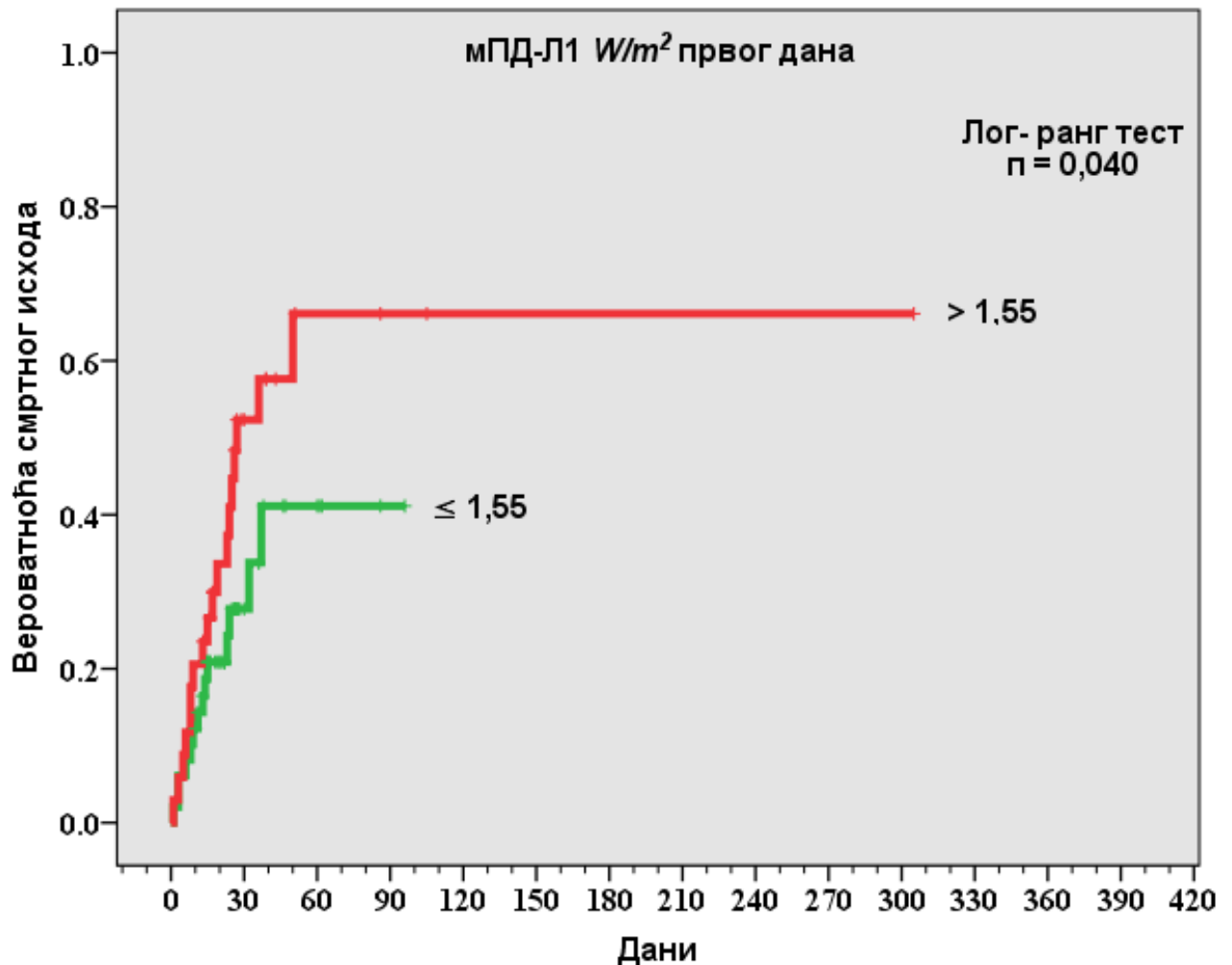
Графикон 4.13.1. *Kaplan-Meier*-ова крива преживљавања за хоспитални морталите у односу на вредности ИДН првог дана



Графикон 4.13.2. *Kaplan-Meier*-ова крива преживљавања за хоспитални морталитет у односу на вредности мХЛА-ДР % првог дана



Графикон 4.13.3. *Kaplan-Meier*-ова крива преживљавања за хоспитални морталитет у односу на вредности мПД-Л1 W/m^2 првог дана



4.14. ПОВЕЗАНОСТ ПАРАМЕТАРА АКТИВАЦИОНОГ СТАТУСА НЕУТРОФИЛА И МОНОЦИТА СА ВРСТОМ БАКТЕРИЈСКОГ ПРОУЗРОКОВАЧА

Параметри активационог статуса неутрофила и моноцита нису били статистички значајно повезани са врстом бактеријског проузроковача ни првог ни петог дана мерења.

4.15. КОНТРОЛНА ГРУПА ЗДРАВИХ ДОБРОВОЉАЦА

Односи имунокомпетентних ћелија и параметри активационог статуса неутрофила и моноцита анализирани су у групи од 22 здрава добровољаца, чије се демографске карактеристике нису разликовале од групе болесника са секундарном сепсом.

4.15.1. МЕЋУСОБНИ ОДНОСИ НЕУТРОФИЛА, МОНОЦИТА, ТРОМБОЦИТА И ЛИМФОЦИТА У КОНТРОЛНОЈ ГРУПИ ЗДРАВИХ ДОБРОВОЉАЦА

Средње вредности, стандардне девијације, медијане, распони између минималне и максималне вредности свих ћелијских односа у контролној групи здравих добровољаца приказане су на табели 4.15.1.1.

Параметар	МПВ/Тр	НЛ	МЛ	ТЛ
Средња вредност	3.85	1.97	0.21	129.09
Стандардна девијација	1.52	1.00	0.11	35.62
Минимална вредност	2.39	0.88	0.10	65.99
Максимална вредност	9.08	4.89	0.49	230.28
Медијана	3.28	1.57	0.17	122.32

Табела 4.15.1.1. Вредности МПВ/Тр, НЛ, МЛ и ТЛ у контролној групи здравих добровољаца

Вредности МПВ/Тр, НЛ, МЛ и ТЛ у контролној групи здравих добровољаца поређене су са вредностима ових параметара у групи болесника са секундарном сепсом првог дана. Резултати те статистичке анализе приказани су на табели 4.15.1.2.

Табела 4.15.1.2. Поређење вредности МПВ/Тр, НЛ, МЛ и ТЛ између контролне групе здравих добровољаца и групе болесника са секундарном сепсом првог дана

Параметар	МПВ/Тр	НЛ	МЛ	ТЛ
<i>Mann-Whitney U z</i>	-2.522	-7.003	-5.881	-4.127
вредност <i>p</i>	0.035	0.000	0.000	0.000

4.15.2. ПАРАМЕТРИ АКТИВАЦИОНОГ СТАТУСА НЕУТРОФИЛА У КОНТРОЛНОЈ ГРУПИ ЗДРАВИХ ДОБРОВОЉАЦА

Средње вредности, стандардне девијације, медијане, распони између минималне и максималне вредности параметара активационог статуса неутрофила у контролној групи здравих добровољаца приказане су на табели 4.15.2.1.

Табела 4.15.2.1. Вредности нЦД64, нЦД14, нПД-Л1 и ИДН у контролној групи здравих добровољаца

НЕУТРОФИЛИ	ЦД64 %	ЦД64 W/m^2	ЦД14 %	ЦД14 W/m^2	ПД- Л1 %	ПД- Л1 W/m^2	ИДН
Средња вредност	0.05	1.98	0.59	4.60	0.65	7.16	5.95
Стандардна девијација	0.04	3.06	0.55	2.23	0.92	3.01	5.74
Минимална вредност	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.19
Максимална вредност	0.10	14.00	1.60	8.80	4.20	13.80	19.00
Медијана	0.04	1.50	0.35	5.10	0.30	7.85	4.00

Вредности нЦД64, нЦД14, нПД-Л1 и ИДН у контролној групи здравих добровољаца поређене су са вредностима ових параметара у групи болесника са секундарном сепсом првог дана. Резултати те статистичке анализе приказани су на табели 4.15.2.2.

Табела 4.15.2.2. Поређење вредности нЦД64, нЦД14, нПД-Л1 и ИДН између контролне групе здравих добровољаца и групе болесника са секундарном сепсом првог дана

НЕУТРОФИЛИ	ЦД64 %	ЦД64 W/m^2	ЦД14 %	ЦД14 W/m^2	ПД- Л1 %	ПД-Л1 W/m^2	ИДН
<i>Mann-Whitney</i> <i>U z</i>	-5.749	- 0.044	- 2.427	- 5.670	- 0.986	-5.601	- 2.718
вредност π	0.000	0.965	0.015	0.000	0.324	0.000	0.007

4.15.3. ПАРАМЕТРИ АКТИВАЦИОНОГ СТАТУСА МОНОЦИТА У КОНТРОЛНОЈ ГРУПИ ЗДРАВИХ ДОБРОВОЉАЦА

Средње вредности, стандардне девијације, медијане, распони између минималне и максималне вредности параметара активационог статуса моноцита у контролној групи здравих добровољаца приказане су на табели 4.15.3.1.

Табела 4.15.3.1. Вредности мХЛА-ДР, мЦД14 и мПД-Л1у контролној групи здравих добровољаца

МОНОЦИТИ	ХЛА-ДР %	ХЛА-ДР W/m^2	ЦД14 %	ЦД14 W/m^2	ПД-Л1 %	ПД-Л1 W/m^2
Средња вредност	99.63	7.59	87.62	0.65	0.91	1.56
Стандардна девијација	0.72	1.69	13.07	0.09	1.01	2.21
Минимална вредност	97.00	4.16	45.00	0.50	0.00	0.00
Максимална вредност	100.00	10.50	100.00	0.80	2.80	9.90
Медијана	100.00	7.55	90.60	0.70	0.60	1.25

Вредности мХЛА-ДР, мЦД14 и мПД-Л1 у контролној групи здравих добровољаца поређене су са вредностима ових параметара у групи болесника са секундарном сепсом првог дана. Резултати те статистичке анализе приказани су на табели 4.15.3.2.

Табела 4.15.3.2. Поређење мХЛА-ДР, мЦД14 и мПД-Л1 вредности између контролне групе здравих добровољаца и групе болесника са секундарном сепсом првог дана.

МОНОЦИТИ	ХЛА-ДР %	ХЛА-ДР W/m^2	ЦД14 %	ЦД14 W/m^2	ПД-Л1 %	ПД-Л1 W/m^2
<i>Mann-Whitney U</i> <i>z</i>	-7.175	-3.398	- 2.548	- 3.618	-0.266	- 0.459
вредност π	0.000	0.001	0.011	0.000	0.790	0.646

5. ДИСКУСИЈА

Сепса је у фокусу истраживача и клиничара јер предстаља велики здравствени проблем, са око 50 милиона случајева годишње широм света и око 11 милиона смртних случајева повезаних са сепсом. Тиме сепса постаје узрок смрти у 20 % свих смртних случајева у свету. И поред значајног напретка у дијагностици и лечењу, ово животно угрожавајуће стање манифестовано органском дисфункцијом чини петину свих смртних случајева. Нова дефиниција сепсе ставља акценат на имуноинфламаторну каскаду сепсе као кључни моменат. Због тога огроман значај има истраживање имунског одговора код критично оболелих са сепсом, као и параметара инфламације. Веома је важно благовремено идентификовати пацијенте под високим ризиком од смртог исхода, како би се мере интензивног лечења правовремено примениле; то би могло помоћи да се избегне настанак органске дисфункције чиме би се смањио морталитет. Истраживања су током година била фокусирана на различите потенцијалне биомаркере сепсе у дијагностичке и прогностичке сврхе. Различите компоненте имуноинфламаторне каскаде се испитују у том смислу. Појединачни имуноинфламаторни биомаркери, као и њихове комбинације, могу пружити битне информације ако се утврди њихова значајна предиктивна вредност. Због изражене хетерогености критично оболелих са секундарном сепсом, значајна су испитивања улоге имунских ћелија у патогенези овог синдрома као и улоге инфламаторних биомаркера у предикцији морталитета.

5.1. ПАРАМЕТРИ ИНФЛАМАТОРНОГ ОДГОВОРА (ПРЕСЕПСИН, ПРОКАЛЦИТОНИН, Ц-РЕАКТИВНИ ПРОТЕИН, МПВ) И ВРЕДНОСТИ ЛАКТАТА КАО ПРЕДИКТОРИ ИСХОДА

Интензивна терапија критично оболелих, која обухвата емпиријску примену антибиотика и високо софистицирану подршку функцији органа, је комплексна а у неким случајевима није ефикасна. Због тога је важно идентификовати пацијенте под високим ризиком од смртог исхода. Појединачни биомаркери, и/или њихове различите комбинације, могу обезбедити корисну информацију о прогнози исхода код

одраслих критично оболелих са сепсом. Дакле, предикција mortalитета је важан фактор у стратификацији пацијената.

У нашем истраживању, једино су нивои пресепсина били статистички високо значајно већи код умрлих, у сва три временска интервала (у моменту постављања дијагнозе сепсе/септичког шока, трећег и петог дана). По предиктивној вредности, на другом месту су били нивои МПВ; били су статистички значајно већи код умрлих у два од три временска интервала: трећег и петог дана. Трећег дана, нивои серумских лактата били су статистички значајно већи код умрлих. Петог дана, вредности Ц-реактивног протеина и број леукоцита су били статистички значајно већи код умрлих.

Утврђена је статистички значајна позитивна корелација између пресепсина и прокалцитонина у два временска интервала, првог и трећег дана, код умрлих. Ипак, ни вредности прокалцитонина, као ни број тромбоцита, нису се значајно разликовали између преживелих и умрлих ни у једном од три временска интервала мерења.

Клиничка тачност, односно прецизност, параметара у предикцији смртног исхода утврђивана је у свим временским интервалима. Првог дана, осим вредности три скорa (*SAPS II*, *APACHE II*, *SOFA*), само је пресепсин био статистички значајан предиктор смртног исхода. Вредности сва три скорa, као и пресепсина, веће од *cut-off* вредности су умерено добри предиктори смртног исхода. Трећег дана, осим *SAPS II* и *SOFA* скорa, пресепсин, МПВ и лактати су били статистички значајни предиктори исхода. Петог дана, статистички значајни предиктори исхода, осим *SAPS II* и *SOFA* скорa, били су пресепсин, МПВ Ц-реактивни протеин и број леукоцита. Вредности оба скорa, као и пресепсина, МПВ, Ц-реактивног протеина и броја леукоцита веће од *cut-off* вредности су веома добри предиктори смртног исхода. Направљена је комбинација пресепсина, МПВ и лактата у један композитни биоскор, са вредностима измереним трећег дана. То је учињено да би се утврдило да ли би се тиме повећала њихова предиктивна вредност. Трећег дана, композитни биоскор имао је највећу вредност *AUC/ROC* од 0.82, као и најбољу комбинацију сензитивности и специфичности, што је уврђено високим *Youden*-овим индексом (већи од 0.5), у поређењу са индивидуалним скоровима и параметрима. Тек петог дана, *SAPS II* скор и пресепсин су достигли предиктивну вредност композитног биоскорa. Треба истаћи да се то десило пуна два дана касније, што је дугачак временски период када су у питању критично оболели са сепсом.

Независни прогностички значај параметара у предикцији смртог исхода процењиван је униваријантном логистичком регресионом анализом. У следећем кораку, направљен је мултиваријантни логистички регресиони модел да би се утврдили независни предиктори смртог исхода, без могућег утицаја других фактора, у свим временским интервалима. Само је пресепсин био независни предиктор смртог исхода првог дана, а МПВ трећег дана, што је утврђено мултиваријантном логистичком регресионом анализом.

У нашој установи се преко 10 година спроводе истраживања предиктивне вредности различитих параметара код критично оболелих са сепсом (147). Очито је, према нашем истраживању, да је најбољи избор предиктивног биомаркера у овој популацији пацијената био пресепсин. Тај имуно-биомаркер има комплексну биолошку улогу. Осим његових проинфламаторних својстава, треба истаћи да ресептори за солубилни ЦД14 могу превенирати ослобађање цитокина и олакшати трансфер ендотоксина до липоротеина; оба та дејства су анти-инфламаторна захваљујући конкуренцији са мембрански везаним формама за слободни лиганд (148).

Пресепсин је привукао значајну пажњу током последњих пет година; примарно због доступности *point-of-care Mitsubishi Pathfast* имуноанализатора, са клинички прихватљивим временом добијања резултата, за мање од 20 минута. То је важно и за дијагностичке и за терапијске клиничке одлуке. Кључно мултицентрично истраживање пресепсина као биомаркера код критично оболелих септичних пацијената је АЛБИОС (*Albumin Italian Outcome Sepsis - ALBIOS*) студија (149). То истраживање је обухватило 997 критично оболелих септичних пацијената, пресепсин је мерен у три временска интервала: првог, другог и седмог дана након пријема. Тај временски след је био незнатно другачији од нашег. Веће вредности пресепсина првог дана су биле повезане са смртним исходом, што је у складу са нашим резултатима. За разлику од 90-дневне стопе морталитета у АЛБИОС студији, наша мера исхода је био хоспитални морталитет, што је свеобухватније и много временски захтевније. Нивои пресепсина у нашој студији (подељени у терциле) су били компарабилни са нивоима овог биомаркера у АЛБИОС студији. Такође, концентрација пресепсина првог дана је била независни предиктор смртог исхода по мултиваријантној логистичкој регресионој анализи у АЛБИОС студији, до истог резултата смо дошли и у нашем истраживању. У АЛБИОС студији, аутори су додали клинички модел (који је

обухватио све значајне факторе ризика за морталитет) концентрацији пресепсина првог дана, да би побољшали прогностичку тачност (*AUC/ROC*). Тај приступ је сличан нашем композитном биоскору (пресепсин, МПВ, лактати), који је побољшао вредност *AUC/ROC* на 0.82, али трећег дана, у поређењу са самим пресепсином првог дана, који је у нашем истраживању имао вредност *AUC/ROC* од 0.67. Интересантно је да истраживачи, који су спровели АЛБИОС студију, нису обајвили вредност *AUC/ROC* за сам пресепсин, већ само за комбинацију пресепсина и клиничког модела или за сам клинички модел. У тој студији, вредност *AUC/ROC* за пресепсин и клинички модел је била 0.80, што је практично исто као за композитни биоскор у нашој студији. Истраживачи у АЛБИОС студији то су постигли раније, првог дана, у односу на наше истраживање у коме је то постигнуто трећег дана. Међутим, по том питању, две студије нису компарабилне због тога што су у АЛБИОС студији истраживачи користили девет клиничких компоненти за клинички модел који су додали пресепсину. Већина од тих девет компоненти обухватала је дужину хоспитализације, дужину трајања инфекције, време протекло до промене једног аспекта терапије у други и тд; то значи да су се подаци могли добити тек након знатно дужег временског периода и ретроспективно. Насупрот томе, ми смо пресепсину додали само два лако доступна лабораторијска параметра, МПВ и лактате, у наш композитни биоскор.

Brodská и сарадници спровели су компарабилно истраживање дијагностичких и прогностичких вредности пресепсина у односу на традиционалне биомаркере код критично оболелих са сепсом (n=30) и СИРС-ом након кардиохируршке интервенције (n=30) (150). Између осталог, тестирали су хипотезу да се пресепсин, као нови биомаркер, може показати бољим од традиционалних биомаркера у предикцији 28-дневног морталитета. Слично нашој студији, ови аутори су анализирали прокалцитонин, Ц-реактивни протеин и лактате у том смислу. Насупрот нашим резултатима, у њиховој студији сви истраживани биомаркери су били статистички значајно повезани са морталитетом првог дана, са компарабилним вредностима *AUC/ROC*. У нашем истраживању, само је пресепсин показао статистички значајну способност дискриминације према исходу првог дана мерења. Такође, насупрот нашим резултатима, аутори наведене студије су утврдили мултиплом регресионом анализом да су Ц-реактивни протеин и лактати независно повезани са морталитетом. У нашем истраживању, независни предиктори смртног исхода су били пресепсин

првог дана мерења и МПВ трећег дана мерења. Лактати су униваријантном логистичком регресионом анализом показали статистичку значајност у предикцији mortalитета петог дана; међутим, статистичка значајност се изгубила током мултиваријантне логистичке регресионе анализе.

Пресепсин је релативно нови биомаркер за дијагнозу сепсе, али његова прогностичка вредност, донедавно, није свеобухватно истраживана. *Yang* и сарадници спровели су систематски преглед и мета-анализу прогностичке вредности пресепсина код одраслих пацијената са сепсом; дошли су до закључка да нивои пресепсина, првог дана мерења, имају прогностичку вредност у предикцији mortalитета без обзира на тежину сепсе. Међутим, нагласили су да су потребна даља истраживања да би се добили подаци за различите субпопулације пацијената са сепсом као хетерогеним синдромом (151). У складу са нашим резултатима су су они до којих су дошли *Behnes* и сарадници, који су процењивали прогностичку вредност пресепсина код 116 критично оболелих пацијената са сепсом (152). Они су утврдили да су нивои пресепсина мерени првог, трећег и осмог дана показали статистички значајну прогностичку вредност за 30-дневни и 6-месечни mortalитет од свих узрока (распон вредности *AUC/ROC* за пресепсин: од 0.64 до 0.71, $p < 0.02$). Такође, баш као и у нашем истраживању, у сва три временска интервала, нивои прокалцитонина и Ц-реактивног протеина нису били статистички значајни предиктори исхода. Ми смо имали само један изузетак, Ц-реактивни протеин је имао вредност *AUC/ROC* од 0.64 петог дана мерења са граничном статистичком значајношћу ($p = 0.04$). Сличну, мању студију спровео је *El-Shafie* са сарадницима (153). Истраживањем су обухватили 31 пацијента, мерили су пресепсин и Ц-реактивни протеин на првог, другог и четвртог дана. Аутори су утврдили да су све вредности пресепсина биле статистички значајно веће код умрлих, док се ниједна вредност Ц-реактивног протеина није статистички значајно разликовала између преживелих и умрлих. Такође, урађена је анализа тачности пресепсина као предиктора исхода, и вредности *AUC/ROC* које су они добили су нешто веће од наших: 0.75, 0.80 и 0.83 по терминима мерења. Недавно је објављена студија у којој је извршено поређење пресепсина, прокалцитонина и Ц-реактивног протеина, као предиктора исхода код пацијената са сепсом (154). Истраживањем је обухвћено 55 пацијената, а пресепсин, прокалцитонин и Ц-реактивни протеин мерени су на пријему, након 24 и 72 сата. Као и у нашем истраживању, примарна мера исхода је био

хоспитални морталитет. Аутори су утврдили да, насупрот нашем истраживању, ниједан од испитиваних биомаркера (укључујући и пресепсин, који је био добар предиктор исхода на пријему у нашој студији) није, на пријему, показао предиктивну способност везану за исход. Пресепсин и Ц-реактивни протеин су, у њиховој студији, показали добру способност дискриминације након 24 и 72 сата, док је прокалцитонин ту способност достигао након 72 сата. То је делимично у складу са нашим резултатима да је пресепсин добар предиктор морталитета трећег дана мерења; ипак, насупрот нашим резултатима су они који су добијени за Ц-реактивни протеин и прокалцитонин. Ми нисмо утврдили било какву предиктивну способност та два биомаркера трећег дана мерења.

Идеја комбиновања биомаркера у циљу побољшања предиктивне способности добија моментум. Интересантан приступ том проблему показао је *Kim* са сарадницима (155). У ретроспективном истраживању, ова група аутора се одлучила да мери неколико биомаркера (укључујући пресепсин и прокалцитонин) у узорцима крви 157 септичних пацијената; мера исхода је био 30-дневни морталитет. У складу са нашим резултатима, њихови подаци су показали да прокалцитонин није био предиктор 30-дневног морталитета и да је вредност *AUC/ROC* за пресепсин била 0.68. Њихов мулти-маркер панел имао је вредност *AUC/ROC* од 0.77, а СОФА скор вредност *AUC/ROC* од 0.61. У нашем истраживању, вредност *AUC/ROC* за композитни биоскор је била већа, износила је 0.82. У наративном прегледном чланку о новим биомаркерима сепсе, поново је наглашена чињеница да је сепса, као хетерогени комплексни синдром, још увек недовољно разјашњена и да, у литератури везаној за многе традиционалне и нове биомаркере сепсе, до сада постоје конфликтни резултати (156). Дакле, перформансе и валидност тих биомаркера треба екстензивно истраживати. Пресепсин и прокалцитонин се често истражују у смислу способности да се на основу њих разликују синдроми системског инфламаторног одговора бактеријског порекла од небактеријских, што би указало на корист њихове примене у раној детекцији инфекције (157-160). У једној од најновијих студија, аутори су истраживањем обухватили 31 пацијента, сви су били подвргнути хитној абдоминалној хируршкој интервенцији, имали су абдоминалну инфекцију. Ова популација пацијената је компарабилна са нашим пацијентима са перитонитисом и панкреатитисом. Истраживани су преоперативни нивои пресепсина, Ц-реактивног протеина и

прокалцитонина, као и њихова корелација са клиничким током и 90-дневним морталитетом (161). Такође, као и у нашем истраживању, спроведен је мулти-маркер приступ, што је, у суштини, наш композитни биоскор. Аутори су показали да је пресепсин имао највећу предиктивну вредност (вредност AUC/ROC од 0.86) за морталитет, на супрот претходно установљеним, традиционалним биомаркерима као што је прокалцитонин; то је у складу са нашим резултатима. Али, на супрот нашим резултатима, њихов мулти-макер приступ (који је обухватио пресепсин, прокалцитонин и ИЛ-6) није додатно побољшао предиктивну вредност у односу на сам пресепсин. Аутори су истакли веома интересантну чињеницу да, упркос томе што пресепсин има боље перформансе од прокалцитонина, управо је прокалцитонин одобрен од америчке Агенције за храну и лекове (*Food and Drug Administration - FDA*) за коришћење у сврху предикције као биомаркер сепсе.

Око трећину наше популације пацијената чинила је група трауматизованих критично оболелих, код којих се развила секундарна сепса. У недавно објављеној систематској анализи, показани су конфликтни резултати различитих истраживања прогностичке вредности прокалцитонина у популацији трауматизованих критично оболелих: од шест студија прокалцитонина као предиктора исхода, у четири су нађени статистички значајно већи нивои овог биомаркера код умрлих, што је супротно нашим резултатима; две студије су показале да нема повезаности између нивоа прокалцитонина и смртог исхода, што је у складу са нашим резултатима (162).

У нашој студији, нивои Ц-реактивног протеина су били статистички значајно различити између преживелих и умрлих само петог дана, што је, са клиничке тачке гледишта прилично касно. Тако је овај биомаркер, у нашој популацији пацијената, био касни предиктор исхода (вредност AUC/ROC од 0.64). Првог и трећег дана није било статистички значајне разлике у нивоима Ц-реактивног протеина између преживелих и умрлих, што је у складу са резултатима ранијег истраживања спроведеног у нашој установи (77). У том истраживању вредност AUC/ROC за овај биомаркер била је <0.55 , тако да Ц-реактивни протеин није био успешан предиктор смртог исхода у сличној популацији пацијената.

Наш композитни биоскор показао је статистички високо значајну снагу предикције исхода. Осим пресепсина, обухватио је и вредности МПВ и лактата. Вредности лактата се рутински користе за процену циркулаторне функције и

перфузије ткива. Сматра се да су повећани нивои лактата повезани са циркулаторном дисфункцијом и поремећеном перфузијом ткива. Али, тај однос није тако једноставан и јасан, па резултате треба тумачити веома опрезно. Перзистентна хиперлактатемија може бити последица смањеног клиренса а не повећане продукције. Такође, када се код пацијената као вазоактивна потпора примењује адреналин, продукција лактата може бити повећана у присуству адекватне оксигенације ткива. Лактати могу бити метаболички субстрат, могу бити повећани код дисфункције јетре, и коначно, могу перзистирати са или без хипоерфузије ткива (44). У нашем истраживању, трећег дана нивои лактата су били статистички значајно већи код умрлих; у том временском интервалу су се показали статистички значајним предиктором исхода. Нивои лактата већи од *cut-off* вредности су били добри предиктори смртог исхода, вредност *AUC/ROC* је била 0.64. Ти наши резултати су у складу са резултатима других сличних студија (163, 164). Иако смо израчунали снагу студије и испоштовали израчунату величину узорка, око две трећине критично оболелих пацијената са секундарном сепсом морало је бити искључено из истраживања примарно због малигних болести. Зато је неопходно веће истраживање за потврду наших резултата.

Сепса је и даље водећи узрок смрти код хоспитализованих пацијената; широм света има скоро 50 милиона пацијената и скоро 11 милиона смртних случајева сваке године. Упркос исцрпним истраживањима, још увек нема специфичног биомаркера сепсе. И истраживачи и клиничари раде на развијању алгоритама за рану детекцију сепсе да би се побољшало преживљавање. Главни проблем за рану дијагнозу сепсе и рану прогнозу исхода сепсе је веома изражена хетерогеност и значајна варијабилност у овој популацији пацијената. Недавно је објављена интересантна студија фокусирана на рану предикцију сепсе на основу клиничких података. Аутори су закључили да различити компјутеризовани приступи могу бити коришћени као предиктори настанка сепсе неколико сати пре клиничког препознавања; међутим, генерализовање овог поступка, тј. његова примена у различитим болничким системима је веома компликована и представља велики изазов (165). Тренутно, више од 175 биомаркера сепсе се истражује, већина њих су инфламаторни протеини (38).

Група еминентних аутора из ове области, у својој најновијој анализи, наводи да су пронашли укупно 5367 нових истраживања објављених у периоду протеклом од њихове претходне анализе биомаркера сепсе. Идентификовано је 258 биомаркера, од

којих је 80 нових у поређењу са претходном листом. Већина биомаркера евалуирана је у мање од 5 истраживања, а 81 биомаркер (31%) процењиван је у само једном истраживању. Осим истраживања Ц-реактивног протеина или прокалцитонина, само 26 биомаркера је процењивано у клиничким студијама са више од 300 пацијената. Ова најновија анализа је показала да је 40 биомаркера поређено са прокалцитонином и/или Ц-реактивним протеином у дијагностичке сврхе; 9 биомаркера имало је бољу вредност у дијагнози сепсе него један од ова два или чак бољу дијагностичку вредност од оба (166).

Наше истраживање је показало да је композитни биоскор (пресепсин, МПВ, лактати) супериорнији у односу на рутинске биомаркере као што су прокалцитонин и Ц-реактивни протеин, као и у односу на традиционалне системе скорирања (*APACHE II*, *SAPS II*, *SOFA*) у предикцији морталитета код одраслих критично оболелих пацијената са секундарном сепсом. Осим тога, независни предиктори смртог исхода су такође и компоненте композитног биоскора: пресепсин првог дана и МПВ трећег дана. То је клинички релевантно јер је довољно рано да се идентификују пацијенти под високим ризиком, а у сврху побољшања преживљавања.

5.2. ПОВЕЗАНОСТ МЕЂУСОБНИХ ОДНОСА НЕУТРОФИЛА, МОНОЦИТА, ТРОМБОЦИТА И ЛИМФОЦИТА (МПВ/ТР, НЛ, МЛ, ТЛ) СА ВРСТОМ БАКТЕРИЈСКОГ ПРОУЗРОКОВАЧА, ОСНОВНИМ ОБОЉЕЊЕМ КОЈЕ ЈЕ ДОВЕЛО ДО СЕКУНДАРНЕ СЕПСЕ И ИСХОДОМ

Један од циљева наше проспективне обсервационе студије је био фокусиран на прогностичку вредност четири различита односа ћелија (МПВ/Тр, НЛ, МЛ, ТЛ) у односу на смртни исход, врсту бактеријског проузроковача и основно обољење које је довело до секундарне сепсе. Ове параметре смо одабрали због њихове доступности у рутинској клиничкој пракси.

Лабораторијске карактеристике пацијената према исходу показале су да су вредности МПВ/Тр и НЛ првог дана биле статистички значајно веће код умрлих. Трећег и петог дана тај тренд се наставио само са НЛ, чије су вредности биле

статистички значајно веће код умрлих у свим терминима мерења. Вредности МЛ и ТЛ нису се статистички значајно разликовале између умрлих и преживелих.

Што се тиче врсте бактеријског проузроковача, у групи пацијената са Грам-позитивном хемокултуром, утврдили смо статистички значајно ниже вредности МПВ/Тр у поређењу са пацијентима код којих је хемокултура била Грам-негативна или полимикробна. Пацијенти са полимикробном хемокултуром имали су статистички значајно веће вредности МПВ/Тр у поређењу са пацијентима код којих је хемокултура била негативна. Даље, пацијенти са Грам-позитивном хемокултуром имали су статистички значајно ниже вредности МЛ и ТЛ у поређењу са онима са Грам-позитивном, полимикробном и негативном хемокултуром. Такође, пацијенти са полимикробном хемокултуром имали су статистички значајно ниже вредности МЛ и ТЛ у поређењу са пацијентима код којих је хемокултура била негативна. Генерално гледано, пацијенти са Грам-позитивном хемокултуром имали су статистички значајно ниже вредности МПВ/Тр, МЛ и ТЛ. Вредности НЛ нису се значајно разликовале међу пацијентима са различитим хемокултурама.

Када је у питању основно обољење које је довело до секундарне сепсе, утврдили смо да код НЛ и МЛ постоји статистичка општа значајност разлике између три групе. Додатном статистичком анализом дошли смо до тога да су вредности МЛ биле статистички значајно ниже код пацијената са перитонитисом у односу на оне са панкреатитисом и траумом који су се компликовали секундарном сепсом. Такође, вредности НЛ су биле статистички значајно веће код пацијената са панкреатитисом као основним обољењем које је довело до секундарне сепсе у поређењу са друге две групе. Вредности МПВ/Тр и ТЛ нису се статистички значајно разликовале између пацијената са различитим основним обољењем које се компликовало секундарном сепсом.

Неутрофили представљају прву целуларну линију одбране од инфекције, ове ћелије су есенцијалне у урођеном имунском одговору. Лимфоцити су укључени у стечени имунски одговор. Иmunски одговор на различите инсулте често има специфичне карактеристике: повећање броја неутрофила и смањење броја лимфоцита. Код перзистентне инфекције, производи се велика количина неутрофила са одложеном апоптозом. Апоптоза неутрофила је у сепси корисна, насупротив лимфоцитима. У истраживању које су спровели *Liu* и сарадници (167), вредности НЛ

су биле статистички значајно веће код умрлих, што је у складу са нашим резултатима. За разлику од нашег истраживања, ови аутори су као меру исхода узели 28-дневни морталитет, а ми хоспитални морталитет што сматрамо бољим избором. Свакако, избор мере исхода утиче на резултате. Повезаност вредности НЛ и морталитета у кохорти критично оболелих истраживана је од стране *Saliccioli* и сарадника (168). Аутори су утврдили, као и ми, да она постоји. Резултати студије фокусиране на НЛ код критично оболелих са панкреатитисом (169) су показали да овај параметар може да се користи за процену тежине панкреатитиса; у нашем истраживању вредности НЛ су биле највеће код пацијената са панкреатитисом као основним обољењем које је довело до секундарне сепсе. Насупрот нашим резултатима, студија *Riche* и сарадника је показала да је вредност НЛ била мања код умрлих од септичког шока (170). Генерално, НЛ има добру предиктивну вредност у односу на исход, углавном већу од традиционалних биомаркера инфекције, не само у сепси него и у другим инфективним стањима (171).

Моноцити, поред тога што су есенцијална компонента урођеног имунског одговора, представљају везу са стеченим имунитетом преко презентације антигена лимфоцитима. У литератури су подаци о МЛ у инфекцији веома оскудни. У једном истраживању, аутори су показали да су највеће вредности МЛ имали пацијенти са потврђеном бактеријском инфекцијом а да су ниже вредности МЛ утврђене код пацијената са клинички дијагностикованом инфекцијом која није доказана микробиолошки (172). У нашем истраживању, дошли смо до супротних резултата: пацијенти са негативном хемокултуром имали су статистички значајно веће вредности МЛ. Варијабилност МЛ је показана у студији која се фокусирала на овај параметар код пацијената са активном туберкулозом (173). Показало се да су пацијенти са активном туберкулозом имали веће или мање вредности МЛ у поређењу са контролама и да су вредности МЛ у екстремним перцентилима биле сигнификантни предиктори активне туберкулозе (<9% или >25%).

Параметар МЛ је процењиван као предиктор преживљавања код пацијената са различитим малигним болестима (174). У једном истраживању, аутори су закључили да је МЛ предиктор преживљавања и агресивности карцинома ендометријума (175). Имајући у виду да постоји повезаност између инфламације и карцинома, као и да је хронична инфламација важна у процесу малигне трансформације и метастазирања, ми

смо се одлучили да истражимо повезаност МЛ и смртог исхода у нашој популацији критично оболелих са секундарном сепсом. Наши резултати су показали да нема статистички значајне разлике у вредностима МЛ између умрлих и преживелих.

Системска инфламација је интегрални део прогресије критичне болести и повезана је са сепсом, што повећава ризик од смртог исхода. Повезаност ТЛ и смртог исхода код критично оболелих са акутним оштећењем бубрега процењивали су *Zheng* и сарадници (176). Они су показали да постоји однос између ТЛ и mortalитета (и 30-дневног и 90-дневног) у облику латиничног слова У (*U*): најнижи ризик је био са вредностима ТЛ од 90 до 311, што значи да су и ниске и високе вредности ТЛ биле повезане са повећаним mortalитетом. Ово је у супротности са нашим резултатима, који су показали да нема статистички значајне разлике у вредности ТЛ између умрлих и преживелих.

У нашем истраживању, највеће вредности ТЛ су имали пацијенти са негативном хемокултуром и то је било статистички значајно. У складу са нашим резултатима су и они до којих је дошао *Bekdas* са сарадником (177). Ови аутори су на педијатријској популацији процењивали дијагностичку вредност ТЛ везану за акутни компликовани апендицитис (дефинисан као присуство флегмоне, абсцеса или перфорације). Ово је популација различита од наше, али је у питању тешка инфекција. У њиховом истраживању, ТЛ је био повезан са компликацијама инфекције. ТЛ, као нови биомаркер, истражује се у различитим клиничким стањима (178, 179).

У сепси је присутна дисфункција хемостазе, а тромбоцити играју важну улогу и у хемостази и у имуноинфламаторном одговору на различите инсулте. Број тромбоцита је обрнуто пропорционалан вредности МПВ. Секреторне грануле у овим ћелијама корелирају са ћелијском реактивношћу у регулацији хемостазе. Тромбоцити са већим МПВ могу имати више гранула и већу површину, а то је повезано са њиховом активацијом. Такође, тромбоцити експримирају ТЛР на својој површини, тако да препознају различите молекулске шаблоне микроорганизама. Сви наведени фактори доводе до активације тромбоцита. МПВ/Тр се, у новије време, истражује као биомаркер. У једној студији, МПВ/Тр је истраживан као обећавајући предиктор mortalитета код критично оболелих са сепсом (180). Студија је обухватила 120 пацијената са сепсом а клинички исход је био 28-дневни mortalитет. Аутори су утврдили да је већа вредност МПВ/Тр, нарочито > 3.71 на пријему, била значајан

предиктор 28-дневног морталитета. Вредности МПВ и Тр саме по себи нису биле предиктори морталитета али њихов однос јесте. И наше истраживање је показало да су вредности МПВ/Тр статистички значајно веће код умрлих.

Имуноинфламаторни одговор код критично оболелих са сепсом је веома комплексан, са фундаменталним разликама између имуноског одговора домаћина на Грам-позитивне бактерије у поређењу са одговором на Грам-негативне бактерије (181-190). У истраживању спроведеном у нашој установи, утврдили смо значајне разлике у цитокинском профилу између тешке Грам-позитивне и Грам-негативне абдоминалне сепсе (191). И наше недавно објављено истраживање на сличној популацији пацијената показује различито понашање супресорских ћелија мијелоидног порекла у односу на Грам-позитивну односно Грам-негативну секундарну сепсу (192). Односи ћелија, које смо сада испитивали, су нам битни јер су у питању имунокомпетентне ћелије које испољавају различито понашање у односу на различито бактеријско окружење. Због тога смо желели и у овом истраживању да проценимо могуће разлике односа ћелија као параметра према различитим хемокултурама код пацијената са документованом бактеријемом. Утврдили смо да су пацијенти са Грам-позитивном хемокултуром имали статистички значајно ниже вредности МПВ/Тр у поређењу са пацијентима код којих је хемокултура била Грам-негативна или полимикробна. Такође, пацијенти са полимикробном хемокултуром имали су статистички значајно веће вредности МПВ/Тр у поређењу са пацијентима код којих је хемокултура била негативна.

Пацијенти са Грам-негативном, полимикробном или негативном хемокултуром имали су статистички значајно веће вредности и МЛ и ТЛ у поређењу са пацијентима код којих је хемокултура била Грам-позитивна. Такође, пацијенти са полимикробном хемокултуром имали су статистички значајно ниже вредности МЛ и ТЛ у односу на пацијенте код којих је хемокултура била негативна. Генерално, највеће вредности МЛ и ТЛ имали су пацијенти са негативном хемокултуром а најмање вредности пацијенти са Грам-позитивном хемокултуром. Вредности НЛ нису се значајно разликовале између пацијената са различитим хемокултурама.

Изненађујућа је чињеница да смо, у нама доступној литератури, нашли само једно истраживање фокусирано на МПВ у односу на природу инфекције код одраслих са сепсом (193). Аутори су утврдили да су вредности МПВ првог и другог дана мерења

биле значајно ниже код пацијената са Грам-позитивним бактеријама у поређењу са пацијентима инфицираним другим микроорганизмима. Осим неколико студија које су евалуирале специфичне одговоре тромбоцита и МПВ на различите типове микроорганизама код септичних неонатуса веома мале тежине на рођењу, нисмо нашли било коју другу студију код адултне популације са сепсом.

Колико нам је познато, наша студија је прва у којој се истраживао однос МПВ/Тр, НЛ, МЛ и ТЛ са врстом бактеријског проузроковача у адултној популацији критично оболелих са сепсом. Сматрамо да то може бити клинички корисно у иницијацији адекватне антибиотске терапије. Према важећим смерницама, антибиотици широког спектра дејства се примењују што је раније могуће. Међутим, у око 50% случајева не може се идентификовати бактеријски проузроковач, па је теже одабрати адекватан антибиотик, што може имати веома штетне ефекте на преживљавање критично оболелих са сепсом.

Треба имати у виду да су клинички најважнији резултати везани за наведене параметре добијени првог дана, и да су у овој дискусији коришћене референце везане за први дан мерења код популације критично оболелих са секундарном сепсом.

5.3. ПОВЕЗАНОСТ ПАРАМЕТАРА АКТИВАЦИОНОГ СТАТУСА НЕУТРОФИЛА И МОНОЦИТА СА ВРСТОМ БАКТЕРИЈСКОГ ПРОУЗРОКОВАЧА, ОСНОВНИМ ОБОЉЕЊЕМ КОЈЕ ЈЕ ДОВЕЛО ДО СЕКУНДАРНЕ СЕПСЕ И ИСХОДОМ

Истраживањем смо обухватили следеће параметре активационог статуса неутрофила и моноцита: нЦД64, нЦД14, нПД-Л1, ИДН (за неутрофиле), мХЛА-ДР, мЦД14, мПД-Л1 и мЦД64 (за моноците) и то у два термина: првог и петог дана.

Што се тиче поређења према основном обољењу које је довело до сепсе, првог дана мерења, утврђена је значајна до високо значајна разлика у вредностима свих параметара активације неутрофила. Вредности нЦД14 W/m^2 су биле статистички значајно веће у групи са панкреатитисом у односу на перитонитис, док су вредности нПД-Л1% и ИДН биле статистички значајно веће у групи са перитонитисом у односу на панкреатитис. Када су поређене групе са перитонитисом и траумом, као основним обољењима која су довела до секундарне сепсе, утврђено је да постоји статистички

високо значајна разлика у вредностима мЦД64%, нПД-Л1 и ИДН: наведени параметри су имали веће вредности код пацијената са перитонитисом.

Петог дана, од свих параметара активације неутрофила, статистички значајне и високо значајне разлике су утврђене само у вредностима нПД-Л1 W/m^2 . Вредности овог параметра активације неутрофила биле су статистички значајно веће у групи пацијената са перитонитисом у односу на групу са панкреатитисом; такође, вредности овог параметра су биле статистички високо значајно мање у групи са панкреатитисом у односу на групу са траумом. Експресија овог параметра на неутрофилима била је најнижа у групи пацијената са панкреатитисом.

По истом принципу поделе пацијената у три групе према основном обољењу које је довело до секундарне сепсе (перитонитис, панкреатитис, траума) истраживали смо параметре активације моноцита: мХЛА-ДР%, мЦД14%, мЦД14 W/m^2 , мПД-Л1% и мЦД64%. Код свих је постојала статистички значајна до високо значајна разлика у вредностима између три групе првог дана мерења. Вредности мХЛА-ДР% биле су статистички високо значајно веће у групи са перитонитисом у односу на групу са панкреатитисом. Такође, утврђена је статистички значајно већа вредност мХЛА-ДР% у групи са траумом у односу на групу са панкреатитисом. Експресија овог параметра на моноцитима била је најнижа у групи пацијената са панкреатитисом. Вредности мЦД14% су биле статистички високо значајно веће у групи пацијената са панкреатитисом у односу на групу са перитонитисом. Такође, утврђена је статистички значајно већа вредност овог параметра у групи са панкреатитисом у односу на групу са траумом. Експресија овог параметра на моноцитима била је највиша у групи пацијената са панкреатитисом. Вредности мЦД14 W/m^2 су биле статистички високо значајно веће у групи пацијената са панкреатитисом у односу на групу са траумом. Вредности мПД-Л1% су биле статистички значајно веће у групи пацијената са перитонитисом у односу на групу са панкреатитисом. Такође, утврђена је статистички високо значајно већа вредност овог параметра у групи са перитонитисом у односу на групу са траумом. Експресија овог параметра на моноцитима била је највиша у групи пацијената са перитонитисом. Вредности мЦД-64% су биле статистички значајно веће у групи пацијената са панкреатитисом у односу на групу са перитонитисом. Такође, утврђена је статистички значајно већа вредност овог параметра у групи са траумом у

односу на групу са перитонитисом. Експресија овог параметра на моноцитима била је најнижа у групи пацијената са перитонитисом.

Петог дана, од свих параметара активације моноцита, статистички високо значајне разлике су утврђене само у вредностима мЦД14 W/m^2 . Вредности овог параметра активације моноцита биле су статистички високо значајно веће у групи пацијената са панкреатитисом у односу на групу са перитонитисом; такође, вредности овог параметра су биле статистички високо значајно веће у групи са панкреатитисом у односу на групу са траумом. Експресија овог параметра на моноцитима била је највиша у групи пацијената са панкреатитисом.

У нашем истраживању, нији утврђена повезаност ниједног параметра активације неутрофила и моноцита са врстом бактеријског проузроковача. Иначе се врло мало истраживања бавило овим проблемом. У једној студији, *Cajander* и сарадници су се фокусирали на динамику експресије мХЛА-ДР у односу на бактеријског проузроковача (194). Динамика експресије мХЛА-ДР високо значајно се разликовала између различитих етиолошких група. Код групе пацијената са *S. pneumoniae* и *S. aureus* у циркулацији, иницијално је експресија мХЛА-ДР била ниска. Код пацијената са *S. aureus*, враћање овог параметра на нормалне вредности је био одложен, а код умрлих из те групе, експресија мХЛА-ДР се скоро потпуно изгубила. Подручје асоцијације параметара активације имунокомпетентних ћелија са основним обољењем које је довело до секундарне сепсе, као и са врстом бактеријског проузроковача, је дефинитивно неистражено. У нама доступној литератури, нашли смо само једну студију објављену пре неколико месеци, која се фокусира на експресију мХЛА-ДР код пацијената у септичком шоку у погледу места инфекције, различитих бактеријских проузроковача и исхода (195). Наши резултати су делимично у складу са резултатима из овог истраживања. Ни ти аутори нису нашли разлике у експресији мХЛА-ДР између пацијената са Грам-позитивном у односу на пацијенте са Грам-негативном сепсом. Међутим, за разлику од њихових резултата везаних за место инфекције (абдоминална, респираторна, уринарна) које није имало утицаја на експресију мХЛА-ДР, ми смо утврдили статистички значајне разлике између параметра активације и неутрофила и моноцита између различитих основних обољења који су довели до сепсе. Треба имати у виду да је подела по месту инфекције различита од поделе коју смо ми користили. На пример, и перитонитис и панкреатитис су

абдоминалне инфекције, па ипак између њих постоје велике разлике. Могуће је да наша подела има предности. У нашем истраживању, постојала је статистички значајна до високо значајна разлика у експресији мХЛА-ДР између пацијената са перитонитисом, панкреатитисом и траумом компликованих секундарном сепсом. Експресија овог параметра на моноцитима била је најнижа у групи пацијената са панкреатитисом.

Све наведене параметре активације неутрофила и моноцита смо истраживали према исходу, при томе је мера исхода била најбоља, болнички морталитет. Када су у питању параметри активације неутрофила првог дана мерења, утврђено је да постоји статистички високо значајна разлика само код ИДН, чије су вредности биле веће код преживелих. Ниједан од мерених параметара петог дана није показао повезаност са исходом, дакле није било статистички значајне разлике у експресији параметара активације неутрофила између преживелих и умрлих.

Што се тиче повезаности параметара активације моноцита првог дана мерења, утврђено је да постоји статистички високо значајна разлика код мХЛА-ДР%, а статистички значајна разлика код мПД-Л1 W/m^2 између преживелих и умрлих. Вредности мХЛА-ДР% су веће код преживелих, а вредности мПД-Л1 W/m^2 код умрлих. Петог дана мерења, утврђена статистички значајна разлика само код вредности мПД-Л1%, које су биле веће код умрлих.

У већ наведеној студији (195), очекивно резултати мХЛА-ДР везани за исход су у складу са нашим, преживели су имали статистички високо значајно већу експресију овог параметра активације моноцита. У тој студији, истраживачи су пратили кинетику експресије мХЛА-ДР као и ми. Термини мерења су били незнатно различити: у нашем истраживању први и пети дан, у њиховом 1-2, 3-4 и 6-8 дан. У та три временска интервала мерења утврдили су да је код преживелих дошло до пораста експресије мХЛА-ДР, што је било статистички високо значајно. Што се умрлих тиче, дошло је до статистички значајног пада експресије мХЛА-ДР између првог и другог временског интервала; између другог и трећег временског интервала дошло је до благог пораста експресије који није достигао статистичку значајност. У нашем истраживању, праћена је кинетика свих испитиваних параметара између два термина, посебно у групи преживелих, посебно у групи умрлих. Код неких је постојала

статистички значајна разлика, али не и код мХЛА-ДР, ни код преживелих ни код умрлих.

У нашем истраживању, пратили смо и проценат ћелија са експресијом одређеног параметра активације, као и интензитет флуоресценције. Исти приступ имали су аутори истраживања мХЛА-ДР експресије код критично оболеле педијатријске популације са сепсом (196). У складу са нашим резултатима, и ти аутори су утврдили повезаност ниске мХЛА-ДР експресије и смртог исхода.

Експресију мХЛА-ДР као предиктора смртог исхода код пацијената у септичком шоку проучавали су *Monneret* и сарадници (197). Одабрали су два термина, 1-2 и 3-4 дан. Насупрот нашим резултатима, у првом термину нису нашли разлику између преживелих и умрлих, док у другом јесу. Вредност мХЛА-ДР из другог термина мерења је показала предиктивну *AUC/ROC* вредност од 0.76 (*cut-off* вредност 30%). Такође су утврдили мултиваријантном логистичком регресионом анализом да је овај параметар, у другом термину, независни предиктор смртог исхода. За разлику од тих резултата, у нашем истраживању постојала је статистички значајна предиктивна *AUC/ROC* вредност од 0.66 за мХЛА-ДР првог дана са нижом *cut-off* вредношћу од 13.65%. Ми смо, за разлику од *Monneret-a* и сарадника, користили Youden-ов индекс за објективну оптимизацију сензитивности и специфичности. Такође, у нашем истраживању мХЛА-ДР није био независни предиктор смртог исхода. Интересантно је да је иста група истраживача 16 година касније добила делимично супротне резултате (195). Интересантну студију која је процењивала имунски статус пацијената у моменту умирања од сепсе у поређењу са умрлим пацијентима који нису имали сепсу а били су можда мртви, спровели су *Boomer* и сарадници (198). Извршена је брза постмортем анализа ткива плућа и слезине обе групе умрлих. Имунохистохемијска анализа показала је значајну деплецију ХЛА-ДР на површини ћелија умрлих од сепсе. Аутори су закључили да су умрли од сепсе били у стању имуносупресије. *Wu* и сарадници су проучавали промену експресије мХЛА-ДР првог, трећег и седмог дана као предиктор 28-дневног морталитета у тешкој сепси код критично оболелих (199). Њихови резултати су у супротности са нашим, у нашој студији није било статистички значајне промене експресије мХЛА-ДР између термина мерења ни код преживелих ни код умрлих, а мера исхода нам је био хоспитални морталитет. Такође, у нашој студији експресија мХЛА-ДР првог дана је имала добру вредност у предикцији морталитета

(вредност AUC/ROC од 0.66), а у њиховој студији ниједно мерење у одабрана три термина није имало предиктвну вредност према исходу. Експресију ХЛА-ДР, као предиктора исхода критично оболелих са сепсом, проучавали су *Drewry* и сарадници (90). Истраживањем су обухватили 83 пацијента, а термини мерења су били 1-2, 3-4 и 6-8 дан; и у овом истраживању мера исхода је био 28-дневни морталитет. За разлику од нашег истраживања у којем је постојала статистички високо значајно већа експресија мХЛА-ДР код преживелих у односу на умрле већ првог дана, и у овом истраживању та разлика је достигнута тек 3-4 дана. У два истраживања, између осталог, извршено је поређење вредности мХЛА-ДР пацијената са сепсом и здравих добровољаца (200 - 202). У једној од њих, пацијенти су били трауматизовани са сепсом (200), а делом је таква била и наша популација. Резултати ових студија су у складу са нашим; показали смо да постоји статистички високо значајно нижа експресија мХЛА-ДР код септичних пацијената у односу на здраве добровољце. У складу са нашим резултатима да се експресија мХЛА-ДР не враћа на нормалне вредности ни петог дана, су резултати истраживања *Timmermans* и сарадника (203). У њиховом истраживању трауматизованих пацијената, а такав је био део наше популације пацијената, постојала је имуносупресија, са ниским вредностима мХЛА-ДР, и 10 дана након трауме. Иmunски одговор на трауму истраживан је у интересантној студији код које је примењен мултипараметарски приступ (38 маркера, укључујући и мХЛА-ДР) који смо и ми применили са мање доступних биомаркера (204). У складу са нашим резултатима, и ови истраживачи су утврдили смањену експресију мХЛА-ДР првог, трећег и петог дана након тешке трауме. Тиме се потврђује значај утврђивања имунског профила, односно цитометријска имунофенотипизација код критично оболелих са траумом и сепсом (205).

Да би се побољшала тачност предикције исхода, параметри се могу комбиновати. Ми смо креирали композитни биоскор од три параметра (мХЛА-ДР, мПД-Л1 W/m^2 , ИДН), чија је вредност AUC/ROC у предикцији леталног исхода већа од сваког параметра појединачно. Тај приступ су применили *Fang* и сарадници (206), за предикцију 28-дневног морталитета код пацијената са сепсом, и креирали су скор имунске дисфункције од неколико параметара, укључујући и мХЛА-ДР. У још једном новијем истраживању (207), аутори су показали да су умрли имали значајно ниже вредности мХЛА-ДР у популацији критично оболелих са сепсом, што је у складу са

нашим резултатима. У том истраживању, експресија мХЛА-ДР достигла је ниво независног предиктора морталитета, за разлику од наше студије. Моноцити су хетерогене ћелије које су груписане у три субпопулације. Истраживања су показала да се у све три субпопулације смањује експресија мХЛА-ДР под дејством ИЛ-10 (208). Многе студије су показале да смањена експресија мХЛА-ДР може бити предиктор развоја инфекције код критично оболелих (209, 210); на основу ње се може процењивати дугорочна сепсом индукована имуносупресија, на пример шест месеци након отпуста из болнице (211); за процену постоперативне имуносупресије и детекцију сепсе код хируршких пацијената (212-214).

Када је у питању експресија ЦД64, насупрот моноцитима код којих је експресија овог антигена конститутивна, неутрофили у стању мировања имају веома малу експресију ЦД64 на својој површини, приближно око 1000 молекула (215). Наше истраживање је показало да постоји статистички значајна до високо значајна разлика у експресији ЦД64 и на неутрофилима и на моноцитима у односу на основно обољење које је довело до секундарне сепсе. Што се експресије нЦД64% тиче, првог дана мерења утврђена је статистички високо значајно већа вредност у групи пацијената са перитонитисом у односу на групу са траумом. Када је у питању експресија мЦД64%, показало се да првог дана мерења постоји статистички значајно већа вредност у групи пацијената са панкреатитисом у односу на групу са перитонитисом; такође, статистички значајно веће вредности су евидентирани у групи са траумом у односу на групу са перитонитисом. Првог дана мерења, генерално гледано, вредности експресије мЦД64% су биле најниже у групи са перитонитисом. У нама доступној литератури, нисмо нашли ниједано истраживање на ову тему, што показује да је област потпуно неистражена и да треба истраживања у овом правцу и проширити и продубити.

Када смо истраживали повезаност експресије нЦД64% и мЦД64% са исходом, утврдили смо да она није постојала ни првог ни петог дана мерења. Једино су вредности мЦД64% биле статистички високо значајно веће првог дана у односу на пети дан код преживелих, а статистички значајно веће првог у односу на пети дан код умрлих. Што се тиче вредности експресије ЦД64, примарно на неутрофилима а и на моноцитима, у предикцији морталитета код критично оболелих са сепсом, у литератури резултати су потпуно контрадикторни. Постоје истраживања која су показала да је смртни исход повезан са повећаном експресијом ЦД64 (216-218, 77).

Такође, постоје истраживања која су дошла до потпуно супротних резултата; у популацији критично оболелих са сепсом аутори тих студија су утврдили повећану експресију нЦД64 и мЦД64 код преживелих (219-221).

У складу са нашим резултатима, да нема повезаности између експресије нЦД64 и мЦД64 и исхода, су и резултати две новије студије. *Daix* и сарадници (222) су имали једну од највећих популација са потврђеном сепсом, чинило ју је преко 780 пацијената. Ни на толиком узорку нЦД64 није био повезан са исходом. *Hanna* и сарадници (223) су, у још новијој студији, дошли до истих резултата, нема повезаности нЦД64, мЦД64 и мЦД14 са исходом код пацијената са сепсом.

Наше истраживање је показало да постоји статистички значајна до високо значајна разлика у експресији ЦД14 и на неутрофилима и на моноцитима у односу на основно обољење које је довело до секундарне сепсе. Што се експресије нЦД14 W/m^2 тиче, првог дана мерења утврђена је статистички значајно већа вредност у групи пацијената са панкреатитисом у односу на групу са перитонитисом; такође је у истом термину утврђена статистички значајно већа вредност у групи пацијената са панкреатитисом у односу на групу са траумом. Генерално гледано, првог дана мерења вредности експресије нЦД14 W/m^2 су биле највеће у групи са панкреатитисом; петог дана није било значајне разлике. Када је у питању експресија мЦД14%, тренд је био исти као код неутрофила. Показало се да и првог и петог дана мерења постоје статистички високо значајно веће вредности у групи пацијената са панкреатитисом у односу на групу са перитонитисом; такође, статистички високо значајно веће вредности су евидентирани у групи са панкреатитисом у односу на групу са траумом. У оба термина мерења, генерално гледано, вредности експресије мЦД14% су биле највеће у групи са панкреатитисом. Још једном се испоставило да, у нама доступној литератури, нисмо нашли ниједано истраживање на ову тему, што поново показује да је област потпуно неистражена и да треба истраживања у овом правцу и проширити и продубити.

Када смо истраживали повезаност експресије нЦД14 и мЦД14 са исходом, утврдили смо да она није постојала ни првог ни петог дана мерења. Вредности нЦД14 биле су статистички значајно веће петог дана у односу на први дан само код преживелих. Вредности мЦД14 су биле статистички значајно веће првог дана у односу на пети дан само код умрлих.

Значај ЦД14 у већ описаном имуноинфламаторном одговору на инфекцију је неспоран и предмет је истраживања последњих неколико декада, па све до данашњих дана (224, 225). У литератури постоје кондрадикторни подаци о повезаности експресије мембранског ЦД14 и исхода код пацијената са сепсом. У складу са нашим резултатима су они до којих су дошли *Hanna* и сарадници (223), као и *Danikas* са сарадницима (220): експресија овог антигена на моноцитима и неутрофилима није статистички значајно повезана са исходом. Насупрот нашим резултатима су они које је објавила *AAlto* са сарадницима (226). У њиховом истраживању, пацијенти у групи са најнижим терцилом мЦД14, дакле са најнижим вредностима мЦД14, су имали статистички високо значајно већу вероватноћу смртог исхода. И ови истраживачи су, као и ми, испитивали корелацију између мембрански везаног ЦД14 и солубилног ЦД14 (пресепсин). За разлику од њихових резултата који су показали да не постоји значајна корелација, нашим истраживањем је утврђено да постоји статистички високо значајна позитивна корелација између солубилног ЦД14 са једне стране и нЦД14 и мЦД14 са друге стране. Али, упркос статистичкој значајности, коефицијент корелације у оба случаја је био релативно низак (код нЦД14 $\rho=0.218$; код мЦД14 $\rho=0.246$), што указује на статистички високо значајну слабу позитивну корелацију. Разлике у резултатима тог и нашег истраживања могле би се, између осталог, објаснити и различитим популацијама пацијената са сепсом по тежини: у нашем истраживању су били критично, а у њиховом акутно оболели. У једном истраживању мембранских антигена на неутрофилима код пацијената са сепсом, аутори су показали да је експресија нЦД14 већа код пацијената са сепсом у односу на здраве контроле, а да је код пацијената у септичком шоку та експресија још већа (227). То је у супротности са нашим резултатима везаним за здраве добровољце; у поређењу са пацијентима они су имали статистички високо значајно већу експресију ЦД14 и на неутрофилима и на моноцитима.

Када је у питању експресија нПД-Л1% првог дана мерења, нашим истраживањем је утврђено да су вредности биле статистички значајно веће у групи пацијената са перитонитисом у односу на групу са панкреатитисом. Када су поређене групе са перитонитисом и траумом, као основним обољењима која су довела до секундарне сепсе, утврђено је да постоји статистички високо значајно већа вредност експресије нПД-Л1% код пацијената са перитонитисом. Петог дана, од свих

параметара активације неутрофила, статистички значајне и високо значајне разлике су утврђене само у вредностима $nPD-L1$ W/m^2 . Вредности овог параметра активације неутрофила биле су статистички значајно веће у групи пацијената са перитонитисом у односу на групу са панкреатитисом; такође, вредности овог параметра су биле статистички високо значајно веће у групи са траумом у односу на групу са панкреатитисом. Генерално гледано експресија овог параметра на неутрофилима била је најнижа у групи пацијената са панкреатитисом. Што се тиче експресије $PD-L1\%$ на моноцитима, утврђено је да су вредности $mPD-L1\%$ су биле статистички значајно веће у групи пацијената са перитонитисом у односу на групу са панкреатитисом. Такође, утврђена је статистички високо значајно већа вредност овог параметра у групи са перитонитисом у односу на групу са траумом. Генерално гледано, експресија $mPD-L1\%$ била је највећа у групи пацијената са перитонитисом првог дана мерења; петог дана разлика између група није била статистички значајна. Опет се испоставило да, у нама доступној литератури, нисмо нашли ниједано истраживање на ову тему, што поново показује да је област потпуно неистражена и да треба истраживања у овом правцу и проширити и продубити.

Што се тиче повезаности експресије $nPD-L1$ и исхода, није било статистички значајне разлике између преживелих и умрлих ни првог ни петог дана мерења.

Када је у питању повезаност експресија $mPD-L1$ и исхода, утврђено је да постоје статистички значајно веће вредности експресије $mPD-L1$ W/m^2 код умрлих првог дана мерења. Такође, утврђена статистички значајно већа вредност експресије $mPD-L1\%$ код умрлих петог дана мерења.

Када су, у нашем истраживању, поређене вредности $nPD-L1\%$ између првог и петог дана мерења, утврђено је да постоји статистички значајно већа вредност експресије $nPD-L1\%$ петог дана у групи умрлих; код преживелих није било статистички значајне разлике између два термина мерења. Као код неутрофила, и код моноцита се показало да су вредности $mPD-L1\%$ биле статистички значајно веће петог дана у групи умрлих, док код преживелих није било статистички значајне разлике у експресији овог параметра између два термина мерења.

У литератури смо нашли само два рада фокусирана на експресију $PD-L1\%$ на неутрофилима. У првом, *Wang* и сарадници су паралелно извели анималну студију на септичним мишевима и на пацијентима са тешком сепсом (228). На неутрофилима

септичних мишева експресија нПД-Л1% је била значајно повећана ($21.41 \pm 4.76\%$). Експресија се повећавала са прогресијом сепсе и миграцијом неутрофила из костне сржи у циркулацију и до перитонеума. Миграторни капацитет ПД-Л1⁺ неутрофила је био компромитован, па су аутори закључили да би се ПД-Л1⁺ неутрофили могли сматрати специјалном инхибиторном популацијом у имунопатогензи сепсе. И код пацијената са тешком сепсом детектована је повећана експресија нПД-Л1% (медијана 14.6%, распон 3.75% - 42.10%). Те вредности су значајно веће од наших (медијана 0.20%, распон 0.00% - 41.80%). Такође, за разлику од нашег истраживања које је показало да не постоје статистички значајне разлике у вредности нПД-Л1% између преживелих и умрлих ни првог ни петог дана, у том истраживању нПД-Л1% је био добар предиктор исхода (вредност *AUC/ROC* је била 0.74, највећа од свих испитиваних параметара). Треба имати у виду да је популација у том истраживању била дупло мања од наше. Експресија нПД-Л1% код контрола била занемарљиво мала, као и у нашем истраживању. Због ниске експресије овог биомаркера у нашој популацији пацијената, очекивано је да није било статистички значајне разлике између њих и контролне групе здравих добровољаца. Друга студија је из 2020. године идентификовала је две нове субпопулације незрелих и дисфункционалних неутрофила за које су аутори показали да су предиктивни потпис сепсе који се може користити у клиничкој пракси (229). ЦД123⁺ и/или ПД-Л1⁺ неутрофили су нове субпопулације незрелих неутрофила, које испољавају смањену активацију и фагоцитну функцију; специфичне су за сепсу и детектабилне су рутинском проточном цитометријом рано у крви пацијената са сепсом. Процент ПД-Л1⁺ неутрофила код пацијената са сепсом у ЈИТ ($9.25 \pm 27.02\%$) био је статистички високо значајно већи од процента код пацијената у ЈИТ након кардиоторакалне хируршке интервенције ($0.12 \pm 0.37\%$). Транскриптомска анализа периферне крви пацијената са сепсом (230) је показала да је експресија гена за ПД-Л1 међу прва 44 гена, повезаних са имунским одговором, који се различитио експримирају у односу на групу здравих добровољаца. Мишеви, код којих је ПД-1/ПД-Л1 осовина била инхибирана, су имали боље преживљавање у сепси (231).

И што се експресије ПД-Л1 на моноцитима тиче, мало је података у нама доступној литератури. Нашли смо само два релевантна рада. Првим проспективним, кохортним истраживањем аутори су обухватили 29 здравих добровољаца, 59 пацијената са сепсом и 76 пацијената са септичким шоком (232). У складу са нашим

результатима, и они су утврдили статистички значајно већу вредност мПД-Л1 код умрлих, чак се мултиваријантном логистичком регресионом анализом показало да је овај параметар био независни предиктор 28-дневног морталитета. Као и у нашој, тако је и у тој студији рађена *AUC/ROC* анализа мПД-Л1 као предиктора морталитета. У оба истраживања се показа статистичка значајност, вредност *AUC/ROC* је у нашем истраживању била нешто мања (0.61) од оне коју су ти аутори утврдили (0.68). Они су такође нагласили да ПД-Л1 игра главну улогу у комплексу ПД-1/ПД-Л1, док се ПД-1 сматра помоћним елементом ове осовине. У једном истраживању се показало да је повећана експресија мПД-Л1 независни предиктор ризика од инфективних компликација акутног панкреатитиса (233). На интересантну идеју дошли су аутори истраживања сатурације кисеоником као предиктивног биомаркера за експресију мПД-Л1 код пацијената са сепсом (234). Пацијенти са нижом сатурацијом ($SO_2 \leq 92\%$) су имали статистички високо значајно већу експресију мПД-Л1 од оних са вишом сатурацијом кисеоником на пријему у ЈИТ. Редукована имунска функција неутрофила и моноцита код пацијената у сепси корелира са повећаном експресијом ПД-Л1 (235, 236).

Током цитофлуориметријских анализа, код већине пацијената примећено је мање или веће раздвајање неутрофилне популације на *SS-FS* тачкастом дијаграму и померање ка вишим вредностима на *SS* детектору и нижим вредностима на *FS* детектору. Ову појаву означили смо као "дивергенција неутрофила" са резонем да се термин дивергенција истовремено може применити и на карактеристике расипања светлости као и на описано раздвајање неутрофилне популације и њихову дивергенцију на *SS-FS* тачкастом дијаграму. Ради прецизније статистичке обраде срачунат је индекс дивергенције неутрофла (ИДН) на раније описани начин.

Испитивање карактеристика расипне светлости ћелија периферне крви, њихових промена и динамике тих промена није новост. Још осамдесетих година XX века показано је да активација неутрофила под дејством хемотаксичних пептида доводи до промена у њиховој морфологији (237-239), што извесно доводи до промена у расипању светлости које је у директној зависности од морфолошких карактеристика ћелије. Сада већ давне 1985. године, *McNeil* и сарадници показали су да након активације неутрофила посредством пептида са хемотаксичним својствима (*N-formyl-leu-phenle-tyr-lys*) долази до промене у карактеристикама расипне светлости у

смислу повећања сигнала на бочном (*SS*) детектору и смањења сигнала на предњем (*FS*) детектору на *SS-FS* тачкастом дијаграму проточног цитофлуориметра. Описане промене они објашњавају морфолошким променама неутрофила у одговору на хемотаксичну стимулацију и то у дозно-зависном маниру (240). Промене у карактеристикама расипне светлости и померање гранулоцитне, потенцијално активираних, субпопулације на *SS-FS* тачкастом дијаграму у нашим анализама су у сагласности са променама описаним од стране *McNeil* и сарадника. У најновијој студији, *Hug* и сарадници такође детектују дозно-зависно повећање сигнала на бочном (*SS*) детектору након активације неутрофила фактором активације тромбоцита (*Platelet-activating factor- PAF*). Ипак, на супрот нашим налазима, у њиховој студији долази до повећања сигнала и на предњем (*FS*) детектору (241). Једна од битних разлика између две студије јесте да смо ми анализирали гранулоците периферне крви критично оболелих пацијената са доказаном сепсом док су *Hug* и сарадници користили модел липополисахаридом-индуковане инфламације у узорцима периферне крви здравих давалаца.

Када су у питању раније поменути хематолошки анализатори новије генерације, анализа расипне светлости неутрофила у оквиру *CPD* код пацијената са сепсом даје опречне резултате. Наиме, испитивањем клиничког значаја *CPD* на *Sysmex XN-9000* апарату, код септичних пацијената са или без оштећења јетре, *Buoro* је са сарадницима утврдила сигнификантно веће вредности бочног расипања светлости неутрофила (*NE-SSC*) код пацијената са септичким шоком у односу на пацијенте са сепсом али без шока као и у односу на контролну групу. Расипање светлости на предњем детектору (*NE-FSC*), у смислу сагледавања величине ћелија, није показало сигнификантне разлике између наведених група (242). *Murell* и сарадници такође детектују сигнификантно више вредности *NE-SSC* у групи пацијената са сепсом (N=30) у односу на контролну групу (N=38) на аутоматском анализатору *Sysmex XN* (243). Насупрот томе *Celik* и сарадници су, у студији која је обухватила 304 новорођенчади, од чега 206 у групи са сепсом (од тога 76 са доказаном сепсом и 130 са клиничким знацима сепсе) и 98 у контролној групи, утврдили значајно ниже вредности бочног расипања светлости неутрофила (*MNS, Mean neutrophil scatter*, апарат: *Coulter LH 780*) у групи са сепсом у односу на контролну групу. Ипак, иако без статистичке значајности, у групи пацијената са доказаном сепсом постојао је тренд

виших вредности *MNS* у односу на групу са клиничким знацима сепсе (244). Слично томе, *Chaves* и сарадници детектују сигнификантно ниже вредности *MNS* и сигнификантно више вредности волумена неутрофила (*MNV*, *Mean neutrophil volume*, апарат: *Coulter LH 780*) у групи адултних пацијената са доказаном сепсом (n=69) у односу на контролну групу (n=35) (245). На истом апарату (*Coulter LH 780*) *Arora* и сарадници такође утврђују сигнификантно ниже вредности *MNS* и више вредности *MNV* у пацијената са сепсом (n=134) у односу на контролну групу (n=100) што је све у супротности са променама расипне светлости неутрофила детектованим у нашој студији (246).

Евидентно је да постоје суштинске разлике у резултатима анализа расипне светлости неутрофила добијених на различитим аутоматским анализаторима (*Sysmex*, *Coulter*) у студијама које обрађују ако не исту, онда барем сродну патологију. Резултати добијени на *Sysmex* апарату углавном су у сагласности са резултатима наше студије док, насупрот томе, резултати добијени на *Coulter LH 780* аутоматском анализатору углавном приказују резултате потпуно супротне нашим налазима. Овако велика дискрепанца, са практично потпуно супротним налазима, свакако отвара питање колика је могућност компарације резултата са аутоматских анализатора и резултата добијених на проточном цитофлуориметру где, осим различитих конструкторских карактеристика, постоји и додатна изложеност субјективном фактору истраживача који предоминантно мануелно дефинише популације и регионе који се анализирају. Ипак, колико год били контрадикторни, резултати јасно указују на то да промене у карактеристикама расипне светлости неутрофила код септичних пацијената – постоје.

Познато је да код неутрофилних гранулоцита након активације долази до пораста у садржају гранула и вакуола, што резултира повећањем сигнала на бочном (*SS*) детектору. Такође, познато је и да током инфекција долази до периферне секвестрације циркулишућих неутрофила и следствене надокнаде циркулишуће популације незрелим гранулоцитима из костне сржи, који услед својих морфолошких карактеристика (штапићасто једро, нижи садржај гранула) показују мањи степен расипања светлости и ниже вредности сигнала на бочном (*SS*) детектору (247). Сходно свему наведеном, ми смо дивергирајућу субпопулацију гранулоцита (субпопулација са вишим вредностима на бочном и нижим вредностима на предњем детектору)

означили потенцијално активираним субпопулацијом. Имајући у виду да се циркулишући неутрофили континуирано надокнађују незрелим прекурсорима из костне сржи, запитали смо се да ли информација добијена сагледавањем укупног узорка популације гранулоцита, коју видимо у резултатима аутоматизованих апарата, насупрот цитофлуориметрији, која омогућава циљану селекцију популације од интереса, заправо пружа релевантне податке по питању унутрашње комплексности и величине гранулоцита? Или се унутар читаве гранулоцитне популације раздвајају две субпопулације (или више њих?) при чему свака субпопулација доприноси крајњем резултату анализе расипне светлости.

Са тим у вези, испратили смо дивергенцију гранулоцитне популације, детектовану на апарату за цитофлуориметрију, и срачунали индекс дивергенције неутрофила (ИДН) који репрезентује међусобни однос субпопулације са вишим *FS* и нижим *SS* сигнаlima и субпопулације са нижим *FS* и вишим *SS* сигнаlima на *SS-FS* тачкастом дијаграму, односно релативни однос између потенцијално неактивираних и активираних ћелија унутар укупне гранулоцитне популације, о чему ће бити речи у даљем току дискусије. Обзиром на то да је потенцијално активирана субпопулација у имениоцу индекса, повећање релативне заступљености ове субпопулације резултира смањењем вредности срачунатог индекса.

Између различитих налаза везаних за ИДН, у којима је утврђена статистичка значајност разлике, највећу пажњу свакако привлачи дискриминаторна способност овог индекса у раздвајању умрлих од преживелих пацијената (мера исхода је хоспитални морталитет) у узорку периферне крви узетом већ првог дана по испуњавању СЕПСИС 3 критеријума. Наиме, вредности ИДН у групи умрлих пацијената биле су статистички значајно ниже у односу на преживеле пацијенте указујући на значајно вишу процентуалну заступљеност активираних ћелија унутар гранулоцитне популације у периферној крви пацијената који ће преминути. Вредности ИДН укључили смо и у композитни биоскор (заједно са процентуалном заступљеношћу експресије ХЛА-ДР и интензитетом средње вредности флуоресценце експресије ПД-Л1 на моноцитима) који је, као композитни скор, показао још боље карактеристике предикторне способности за раздвајање умрлих и преживелих пацијената. Ипак, једини независни предиктор смртног исхода утврђен мултиваријантном логистичком регресионом анализом првог дана био је ИДН. Друга

два параметра изгубила су статистичку значајност у мултиваријантној регресионој анализи. Презентовани резултати недвосмислено указују на значај ИДН у смислу даљег сагледавања и анализе у циљу евентуалне предикције потенцијалног исхода критично оболелих са сепсом. Просечна дужина боравка пацијената у ЈИТ у нашој студији била је 17 дана док је просечни укупан боравак пацијената у хоспиталним условима био 30 дана.

У сепси је активирана је читава мрежа проинфламаторних и анти-инфламаторних цитокина, која може предиспонирати пацијенте са сепсом ка различитом исходу болести (248). Познато је, такође, да неутрофили могу бити подстакнути (*primed*) дејством других цитокина, попут ТНФ- α , на пример, да потентније реагују на ИЛ-8. Даље, бактеријски производи (попут *fMPL*), производи активације комплемента (нарочито *C5a*) и различити липидни медијатори (нпр. *PAF*) такође представљају потентне активаторе неутрофила. Имајући у виду да су у сепси многи цитокини и други описани производи симултано присутни, активација неутрофила је неизбежан процес.

Ми смо поставили хипотезу да ИДН рефлектује статус активације неутрофилне популације и да тај статус има значајну предикторну способност у погледу хоспиталног морталитета. Овде се отвара питање зашто се у акутној фази сепсе (први дан као термин мерења), активирани неутрофили значајно акумулирају у периферној циркулацији код пацијената са фаталним исходом болести, за разлику од оних који ће преживети интрахоспитални период?

Један од могућих одговора могао би се потражити у дисфункцији неутрофила индукованој сепсом. Наиме, процес миграције неутрофила дешава се у четири фазе, при чему свака од ових фаза може бити оштећена током сепсе: мобилизација из костне сржи, маргинација и "котрљање" дуж ендотела крвних судова, стабилна адхеренција и коначно трансмиграција из васкуларног корита у периферна ткива. Заједно са оштећењем миграторних карактеристика, у сепси долази и до поремећаја у антимикуробним функцијама неутрофила (236). Са друге стране, поставља се и питање односа концентрација ИЛ-8, као потентног неутрофилног хемотаксичног фактора, у циркулацији и ткивима. Да ли високе концентрације ИЛ-8, продуковане у сепси, стимулишу одлазак неутрофила у периферна ткива или напротив, циркулишуће количине овог хемокина заправо задржавају неутрофиле унутар васкуларног корита у

складу са дефиницијом кретања мобилних ћелија "према градијенту концентрације" одређеног хемокина? (249).

Питања има још, а потенцијалних одговора свакако још више, али како год формулисали питања и колико год дубоко заронили у ћелијско-молекуларна дешавања, са аспекта клиничке цитофлуориметрије, ИДН дефинисан у условима наше студије веома добро дискриминише пацијенте са различитим исходом болести у смислу хоспиталног морталитета.

Даљом анализом, у смислу динамике ИДН, утврђено је статистички високо значајно снижавање овог индекса петог дана мерења у односу на први дан код преживелих и, насупротив томе, статистички значајан пораст ИДН код умрлих. Могуће је оправдано размишљати да кретање ИДН можда рефлектује и другу фазу имунског дисбаланса у сепси, коју карактерише имуносупресија и поремећај у секрецији и про- и анти-инфламаторних цитокина (198).

У закључку овог сегмента анализе, недвосмислено је да код критично оболелих са сепсом долази до екстензивне активације неутрофила и до промена у њиховим карактеристикама расипања светлости. Индекс дивергенције неутрофила, изведен на основу наведених промена у расипању светлости, могао би бити добар показатељ односа неактивираних и активираних ћелија унутар неутрофилне популације у периферној крви у акутној фази сепсе и чак независни предиктор хоспиталног морталитета код критично оболелих са сепсом. Шта више, конверзија ИДН у смислу његовог пораста петог дана, код септичних пацијената са иницијално ниским ИДН, могла би указати на потенцијални развој имуносупресивног статуса код ове популације критично оболелих.

Резултати до којих смо дошли овим истраживањем указују на велики значај који би имао имуномониторинг промена индукованих сепсом, а у циљу индивидуализације терапије (250-253). Као и код клиничких карактеристика сепсе, тако и код имунског одговора који се развија код те популације критично оболелих постоји изражена хетерогеност. Због тога би познавање есенцијалних имунских карактеристика сваког појединачног пацијента могло олакшати примену адекватне терапије и побољшати преживљавање.

6. ЗАКЉУЧЦИ

1. Активациони статус неутрофила и моноцита корелира са основним обољењем које је довело до секундарне сепсе код критично оболелих
2. Од свих параметара активационог статуса неутрофила једини независни предиктор исхода је ИДН, његове ниске вредности првог дана мерења су повезане са смртним исходом
3. Од свих параметара активационог статуса моноцита, најбољи предиктори исхода су мХЛА-ДР првог дана мерења и мПД-Л1 и првог и петог дана мерења: ниске вредности мХЛА-ДР као и високе вредности мПД-Л1 су повезане са смртним исходом
4. Композитни биоскор креиран од три елемента (ИДН, мХЛА-ДР и мПД-Л1) је најбољи предиктор исхода првог дана мерења са AUC/ROC 0.73
5. Активациони статус неутрофила и моноцита не корелира са врстом бактеријског проузроковача (Грам-позитивне и Грам-негативне бактерије)
6. Међусобни односи неутрофила, моноцита, тромбоцита и лимфоцита првог дана мерења у крви критично оболелих са секундарном сепсом корелирају са основним обољењем, врстом бактеријског проузроковача и исходом
7. Од испитиваних параметара инфламаторног одговора, независни предиктори исхода су били пресепсин првог дана мерења и МПВ трећег дана мерења: њихове високе вредности су повезане са смртним исходом
8. Композитни биоскор креиран од три елемента (пресепсин, МПВ, лактати) је најбољи предиктор исхода трећег дана мерења са AUC/ROC 0.82

7. ЛИТЕРАТУРА

1. Hotchkiss RS, Karl IE. The pathophysiology and treatment of sepsis. *N Eng J Med* 2003; 348(2): 138-150.
2. Levy MM, Evans LE, Rhodes A. The Surviving Sepsis Campaign Bundle: 2018 update. *Intensive Care Med* 2018; 44(6):925-928.
3. Coopersmith CM, De Backer D, Deutschman CS, Ferrer R, Lat I, Machado FR, Martin GS, Martin-Loeches I, Nunnally ME, Antonelli M, Evans LE, Hellman J, Jog S, Kesecioglu J, Levy MM, Rhodes A. Surviving sepsis campaign: research priorities for sepsis and septic shock. *Intensive Care Med* 2018; 44(9):1400-1426.
4. Fleischmann-Struzek C, Mikolajetz A, Schwarzkopf D, Cohen J, Hartog CS, Pletz M, Gastmeier P, Reinhart K. Challenges in assessing the burden of sepsis and understanding the inequalities of sepsis outcomes between National Health Systems: secular trends in sepsis and infection incidence and mortality in Germany. *Intensive Care Med* 2018; 44(11):1826-1835.
5. Vincent JL, Lefrant JY, Kotfis K, Nanchal R, Martin-Loeches I, Wittebole X, Sakka SG, Pickkers P, Moreno R, Sakr Y; ICON and SOAP investigators; SOAP investigators. Comparison of European ICU patients in 2012 (ICON) versus 2002 (SOAP). *Intensive Care Med* 2018; 44(3):337-344.
6. Weng L, Zeng XY, Yin P, Wang LJ, Wang CY, Jiang W, Zhou MG, Du B; China Critical Care Clinical Trials Group (CCCCTG). Sepsis-related mortality in China: a descriptive analysis. *Intensive Care Med* 2018; 44(7):1071-1080.
7. Kerrigan SW, Martin-Loeches I. Public awareness of sepsis is still poor: we need to do more. *Intensive Care Med* 2018; 44(10):1771-1773.
8. Møller MH, Alhazzani W, Shankar-Hari M. Focus on sepsis. *Intensive Care Med* 2019; 45(10):1459-1461.
9. Berg D, Gerlach H. Recent advances in understanding and managing sepsis. *F1000Res* 2018; 7: F1000 Faculty Rev-1570.
10. Bone RC, Balk RA, Cerra FB, Dellinger RP, Fein AM, Knaus WA, Schein RM, Sibbald WJ. Definitions for sepsis and organ failure and guidelines for the use of innovative therapies in sepsis. The ACCP/SCCM Consensus Conference Committee. American College of Chest Physicians/Society of Critical Care Medicine. *Chest* 1992; 101(6):1644-55.

11. Levy MM, Fink MP, Marshall JC, Abraham E, Angus D, Cook D, Cohen J, Opal SM, Vincent JL, Ramsay G; SCCM/ESICM/ACCP/ATS/SIS. 2001 SCCM/ESICM/ACCP/ATS/SIS International Sepsis Definitions Conference. *Crit Care Med* 2003; 31(4):1250–1256.
12. Dellinger RP, Carlet JM, Masur H, Gerlach H, Calandra T, Cohen J, Gea-Banacloche J, Keh D, Marshall JC, Parker MM, Ramsay G, Zimmerman JL, Vincent JL, Levy MM. Surviving Sepsis Campaign guidelines for management of severe sepsis and septic shock. *Intensive Care Med* 2004; 30(4):536-555.
13. Dellinger RP, Levy MM, Carlet JM, Bion J, Parker MM, Jaeschke R, Reinhart K, Angus DC, Brun-Buisson C, Beale R, Calandra T, Dhainaut JF, Gerlach H, Harvey M, Marini JJ, Marshall J, Ranieri M, Ramsay G, Sevransky J, Thompson BT, Townsend S, Vender JS, Zimmerman JL, Vincent JL. Surviving Sepsis Campaign: international guidelines for management of severe sepsis and septic shock: 2008. *Intensive Care Med* 2008; 34(1):17-60. Erratum in: *Intensive Care Med* 2008; 34(4):783-5.
14. Dellinger RP, Levy MM, Rhodes A, Annane D, Gerlach H, Opal SM, Sevransky JE, Sprung CL, Douglas IS, Jaeschke R, Osborn TM, Nunnally ME, Townsend SR, Reinhart K, Kleinpell RM, Angus DC, Deutschman CS, Machado FR, Rubenfeld GD, Webb S, Beale RJ, Vincent JL, Moreno R; Surviving Sepsis Campaign Guidelines Committee including The Pediatric Subgroup. Surviving Sepsis Campaign: international guidelines for management of severe sepsis and septic shock, 2012. *Intensive Care Med* 2013; 39(2):165-228.
15. Rhodes A, Evans LE, Alhazzani W, Levy MM, Antonelli M, Ferrer R, Kumar A, Sevransky JE, Sprung CL, Nunnally ME, Rochwerg B, Rubenfeld GD, Angus DC, Annane D, Beale RJ, Bellingham GJ, Bernard GR, Chiche JD, Coopersmith C, De Backer DP, French CJ, Fujishima S, Gerlach H, Hidalgo JL, Hollenberg SM, Jones AE, Karnad DR, Kleinpell RM, Koh Y, Lisboa TC, Machado FR, Marini JJ, Marshall JC, Mazuski JE, McIntyre LA, McLean AS, Mehta S, Moreno RP, Myburgh J, Navalesi P, Nishida O, Osborn TM, Perner A, Plunkett CM, Ranieri M, Schorr CA, Seckel MA, Seymour CW, Shieh L, Shukri KA, Simpson SQ, Singer M, Thompson BT, Townsend SR, Van der Poll T, Vincent JL, Wiersinga WJ, Zimmerman JL, Dellinger RP. Surviving Sepsis Campaign: International Guidelines for Management of Sepsis and Septic Shock: 2016. *Crit Care Med* 2017; 45(3):486-552.

16. Singer M, Deutschman CS, Seymour CW, Shankar-Hari M, Annane D, Bauer M, Bellomo R, Bernard GR, Chiche JD, Cooper-Smith CM, Hotchkiss RS, Levy MM, Marshall JC, Martin GS, Opal SM, Rubenfeld GD, van der Poll T, Vincent JL, Angus DC. The Third International Consensus Definitions for Sepsis and Septic Shock (Sepsis-3). *JAMA* 2016; 315(8):801-810.
17. LaRosa SP. Sepsis: menu of new approaches replaces one therapy for all. *Cleve Clin J Med* 2002; 69(1):65–73.
18. Seymour CW, Liu VX, Iwashyna TJ, Brunkhorst FM, Rea TD, Scherag A, Rubenfeld G, Kahn JM, Shankar-Hari M, Singer M, Deutschman CS, Escobar GJ, Angus DC. Assessment of Clinical Criteria for Sepsis: For the Third International Consensus Definitions for Sepsis and Septic Shock (Sepsis-3). *JAMA* 2016; 315(8):762-74.
19. Rudd KE, Johnson SC, Agesa KM, Shackelford KA, Tsoi D, Kievlan DR, Colombara DV, Ikuta KS, Kissoon N, Finfer S, Fleischmann-Struzek C, Machado FR, Reinhart KK, Rowan K, Seymour CW, Watson RS, West TE, Marinho F, Hay SI, Lozano R, Lopez AD, Angus DC, Murray CJL, Naghavi M. Global, regional, and national sepsis incidence and mortality, 1990-2017: analysis for the Global Burden of Disease Study. *Lancet* 2020; 395(10219):200-211.
20. Kempker JA, Martin GS. A global accounting of sepsis. *Lancet* 2020; 395(10219):168-170.
21. Surbatovic M, Veljovic M, Jevdjic J, Popovic N, Djordjevic D, Radakovic S. Immunoinflammatory response in critically ill patients: severe sepsis and/or trauma. *Mediators Inflamm* 2013; 2013:362793
22. van der Poll T, van de Veerdonk FL, Scicluna BP, Netea MG. The immunopathology of sepsis and potential therapeutic targets. *Nat Rev Immunol* 2017;17(7):407-420.
23. Conway-Morris A, Wilson J, Shankar-Hari M. Immune Activation in Sepsis. *Crit Care Clin* 2018; 34(1):29-42.
24. Bae JS. Role of high mobility group box 1 in inflammatory disease: focus on sepsis. *Arch Pharm Res* 2012; 35(9):1511-23.
25. Asehnoune K, Villadangos J, Hotchkiss RS. Understanding host-pathogen interaction. *Intensive Care Med* 2016; 42(12):2084-2086.
26. Surbatovic M, Popovic N, Vojvodic D, Milosevic I, Acimovic G, Stojicic M, Veljovic M, Jevdjic J, Djordjevic D, Radakovic S. Cytokine profile in severe Gram-positive

- and Gram-negative abdominal sepsis. *Sci Rep* 2015; 5: 11355.
27. Liu T, Zhang L, Joo D, Sun SC. NF- κ B signaling in inflammation. *Signal Transduct Target Ther.* 2017; 2:17023.
 28. Schulte W, Bernhagen J, Bucala R. Cytokines in sepsis: potent immunoregulators and potential therapeutic targets - an updated view. *Mediators Inflamm.* 2013; 2013:165974.
 29. Hotchkiss RS, Monneret G, Payen D. Immunosuppression in sepsis: a novel understanding of the disorder and a new therapeutic approach. *Lancet Infect Dis* 2013; 13(3):260-268.
 30. Cavillon JM, Annane D. Compartmentalization of the inflammatory response in sepsis and SIRS. *J Endotoxin Res* 2006; 12(3):151-70.
 31. Rubio I, Osuchowski MF, Shankar-Hari M, Skirecki T, Winkler MS, Lachmann G, La Rosée P, Monneret G, Venet F, Bauer M, Brunkhorst FM, Kox M, Cavillon JM, Uhle F, Weigand MA, Flohé SB, Wiersinga WJ, Martin-Fernandez M, Almansa R, Martin-Loeches I, Torres A, Giamarellos-Bourboulis EJ, Girardis M, Cossarizza A, Netea MG, van der Poll T, Scherag A, Meisel C, Schefold JC, Bermejo-Martín JF. Current gaps in sepsis immunology: new opportunities for translational research. *Lancet Infect Dis* 2019; 19(12):e422-e436.
 32. Nedeva C, Menassa J, Puthalakath H. Sepsis: Inflammation Is a Necessary Evil. *Front Cell Dev Biol* 2019; 7:108.
 33. Madoiwa S. Recent advances in disseminated intravascular coagulation: endothelial cells and fibrinolysis in sepsis-induced DIC. *J Intensive Care* 2015; 3:8.
 34. Larsen FF, Petersen JA. Novel biomarkers for sepsis: A narrative review. *Eur J Intern Med* 2017; 45:46-50.
 35. Kim MH, Choi JH. An Update on Sepsis Biomarkers. *Infect Chemother* 2020; 52(1):1-18.
 36. Henriquez-Camacho C, Losa J. Biomarkers for sepsis. *Biomed Res Int* 2014; 2014:547818.
 37. Iskandar A, Susianti H, Anshory M, Di Somma S. Biomarkers Utility for Sepsis Patients Management. U: Biomarker – Indicator of abnormal physiological process. Ed. Ghousia Begum, IntechOpen 2018.

38. Grondman I, Pirvu A, Riza A, Ioana M, Netea MG. Biomarkers of inflammation and the etiology of sepsis. *Biochem Soc Trans* 2020; 48(1):1-14.
39. Ittermann T, Feig MA, Petersmann A, Radke D, Greinacher A, Völzke H, Thiele T. Mean platelet volume is more important than age for defining reference intervals of platelet counts. *PLoS One* 2019; 14(3):e0213658.
40. Oh GH, Chung SP, Park YS, Hong JH, Lee HS, Chung HS, You JS, Park JW, Park I. Mean Platelet Volume to Platelet Count Ratio as a Promising Predictor of Early Mortality in Severe Sepsis. *Shock* 2017; 47(3):323-330.
41. Levy B. Lactate and shock state: the metabolic view. *Curr Opin Crit Care* 2006; 12(4):315-21.
42. Brooks GA. The Science and Translation of Lactate Shuttle Theory. *Cell Metab* 2018; 27(4):757-785
43. Nolt B, Tu F, Wang X, Ha T, Winter R, Williams DL, Li C. Lactate and Immunosuppression in Sepsis. *Shock* 2018; 49(2):120-125.
44. Hernandez G, Bellomo R, Bakker J. The ten pitfalls of lactate clearance in sepsis. *Intensive Care Med* 2019; 45(1):82-85.
45. Kobayashi SD, DeLeo FR. Role of neutrophils in innate immunity: a systems biology-level approach. *Wiley Interdiscip Rev Syst Biol Med* 2009; 1(3):309-333.
46. Mócsai A. Diverse novel functions of neutrophils in immunity, inflammation, and beyond. *J Exp Med* 2013; 210(7):1283-1299.
47. Mutua V, Gershwin LJ. A Review of Neutrophil Extracellular Traps (NETs) in Disease: Potential Anti-NETs Therapeutics. *Clin Rev Allergy Immunol* 2020; Aug 1:1–18.
48. Brown KA, Brain SD, Pearson JD, Edgeworth JD, Lewis SM, Treacher DF. Neutrophils in development of multiple organ failure in sepsis. *Lancet* 2006; 368(9530):157-169.
49. Sônego F, Castanheira FV, Ferreira RG, Kanashiro A, Leite CA, Nascimento DC, Colón DF, Borges Vde F, Alves-Filho JC, Cunha FQ. Paradoxical Roles of the Neutrophil in Sepsis: Protective and Deleterious. *Front Immunol* 2016; 7:155.
50. Kolaczowska E, Kubes P. Neutrophil recruitment and function in health and inflammation. *Nat Rev Immunol* 2013; 13(3):159-175.
51. González-Amaro R, Sánchez-Madrid F. Cell adhesion molecules: selectins and

- integrins. *Crit Rev Immunol* 1999; 19(5-6):389-429.
52. Rosenbloom AJ, Pinsky MR, Napolitano C, Nguyen TS, Levann D, Pencosky N, Dorrance A, Ray BK, Whiteside T. Suppression of cytokine-mediated beta2-integrin activation on circulating neutrophils in critically ill patients. *J Leukoc Biol* 1999; 66(1):83-89.
53. Ibbotson GC, Doig C, Kaur J, Gill V, Ostrovsky L, Fairhead T, Kubes P. Functional alpha4-integrin: a newly identified pathway of neutrophil recruitment in critically ill septic patients. *Nat Med* 2001; 7(4):465-470.
54. Kumar V, Abbas A, Fausto N, et al: Robbins & Cotran pathologic basis of disease, ed 8, Philadelphia, 2009, Saunders.
55. Leliefeld PH, Wessels CM, Leenen LP, Koenderman L, Pillay J. The role of neutrophils in immune dysfunction during severe inflammation. *Crit Care* 2016; 20:73.
56. Nathan C. Neutrophils and immunity: challenges and opportunities. *Nat Rev Immunol* 2006; 6(3):173-182.
57. Rios-Santos F, Alves-Filho JC, Souto FO, Spiller F, Freitas A, Lotufo CM, Soares MB, Dos Santos RR, Teixeira MM, Cunha FQ. Down-regulation of CXCR2 on neutrophils in severe sepsis is mediated by inducible nitric oxide synthase-derived nitric oxide. *Am J Respir Crit Care Med* 2007; 175(5):490-497.
58. Nauseef WM. How human neutrophils kill and degrade microbes: an integrated view. *Immunol Rev* 2007; 219:88-102.
59. Santos SS, Brunialti MK, Rigato O, Machado FR, Silva E, Salomao R. Generation of nitric oxide and reactive oxygen species by neutrophils and monocytes from septic patients and association with outcomes. *Shock* 2012; 38(1):18-23.
60. Yipp BG, Petri B, Salina D, Jenne CN, Scott BN, Zbytnuik LD, Pittman K, Asaduzzaman M, Wu K, Meijndert HC, Malawista SE, de Boisleury Chevance A, Zhang K, Conly J, Kubes P. Infection-induced NETosis is a dynamic process involving neutrophil multitasking in vivo. *Nat Med* 2012; 18(9):1386-1393.
61. Gao X, Hao S, Yan H, Ding W, Li K, Li J. Neutrophil extracellular traps contribute to the intestine damage in endotoxemic rats. *J Surg Res* 2015; 195(1):211-218.
62. Le-Barillec K, Si-Tahar M, Balloy V, Chignard M. Proteolysis of monocyte CD14 by human leukocyte elastase inhibits lipopolysaccharide-mediated cell activation. *J Clin Invest* 1999; 103(7):1039-1046.

63. Kumar H, Kawai T, Akira S. Pathogen recognition by the innate immune system. *Int Rev Immunol* 2011; 30(1):16-34.
64. Mare TA, Treacher DF, Shankar-Hari M, Beale R, Lewis SM, Chambers DJ, Brown KA. The diagnostic and prognostic significance of monitoring blood levels of immature neutrophils in patients with systemic inflammation. *Crit Care* 2015; 19(1):57.
65. Cuenca AG, Delano MJ, Kelly-Scumpia KM, Moreno C, Scumpia PO, Laface DM, Heyworth PG, Efron PA, Moldawer LL. A paradoxical role for myeloid-derived suppressor cells in sepsis and trauma. *Mol Med* 2011; 17(3-4):281-292.
66. Udovicic I, Surbatovic M, Rondovic G, Stanojevic I, Zeba S, Djordjevic D, Peric A, Milosavljevic S, Stankovic N, Abazovic D, Vojvodic D. Do nature of bacteremia and origin of secondary sepsis in critically ill patients determine subset of myeloid-derived suppressor cells expansion? *Vojnosanit Pregl* 2020; 77(9):923-933.
67. Udovicic I, Surbatovic M, Rondovic G, Stanojevic I, Zeba S, Djordjevic D, Popadic A, Milosavljevic S, Stankovic N, Abazovic D, Vojvodic D. Myeloid-derived suppressor cells in secondary sepsis: is there association with lethal outcome? *Vojnosanit Pregl* 2020; 77(8): 773–783.
68. Cavaillon JM, Adib-Conquy M. Monocytes/macrophages and sepsis. *Crit Care Med* 2005; 33(12 Suppl):S506-9.
69. Guillemins M, Ginhoux F, Jakubzick C, Naik SH, Onai N, Schraml BU, Segura E, Tussiwand R, Yona S. Dendritic cells, monocytes and macrophages: a unified nomenclature based on ontogeny. *Nat Rev Immunol* 2014;14(8):571-8.
70. Kapellos TS, Bonaguro L, Gemünd I, Reusch N, Saglam A, Hinkley ER, Schultze JL. Human Monocyte Subsets and Phenotypes in Major Chronic Inflammatory Diseases. *Front Immunol* 2019; 10:2035.
71. Mukherjee R, Kanti Barman P, Kumar Thatoi P, Tripathy R, Kumar Das B, Ravindran B. Non-Classical monocytes display inflammatory features: Validation in Sepsis and Systemic Lupus Erythematosus. *Sci Rep* 2015; 5:13886.
72. Villani AC, Satija R, Reynolds G, Sarkizova S, Shekhar K, Fletcher J, Griesbeck M, Butler A, Zheng S, Lazo S, Jardine L, Dixon D, Stephenson E, Nilsson E, Grundberg I, McDonald D, Filby A, Li W, De Jager PL, Rozenblatt-Rosen O, Lane AA, Haniffa M, Regev A, Hacohen N. Single-cell RNA-seq reveals new types of human blood dendritic

- cells, monocytes, and progenitors. *Science* 2017; 356(6335):eaah4573.
73. Tak T, van Groenendael R, Pickkers P, Koenderman L. Monocyte Subsets Are Differentially Lost from the Circulation during Acute Inflammation Induced by Human Experimental Endotoxemia. *J Innate Immun* 2017; 9(5):464-474.
74. Shalova IN, Lim JY, Chittezhath M, Zinkernagel AS, Beasley F, Hernández-Jiménez E, Toledano V, Cubillos-Zapata C, Rapisarda A, Chen J, Duan K, Yang H, Poidinger M, Melillo G, Nizet V, Arnalich F, López-Collazo E, Biswas SK. Human monocytes undergo functional re-programming during sepsis mediated by hypoxia-inducible factor-1 α . *Immunity* 2015; 42(3):484-498.
75. Djordjevic D, Rondovic G, Surbatovic M, Stanojevic I, Udovicic I, Andjelic T, Zeba S, Milosavljevic S, Stankovic N, Abazovic D, Jevdjic J, Vojvodic D. Neutrophil-to-Lymphocyte Ratio, Monocyte-to-Lymphocyte Ratio, Platelet-to-Lymphocyte Ratio, and Mean Platelet Volume-to-Platelet Count Ratio as Biomarkers in Critically Ill and Injured Patients: Which Ratio to Choose to Predict Outcome and Nature of Bacteremia? *Mediators Inflamm*. 2018; 2018:3758068.
76. Akinrinmade OA, Chetty S, Daramola AK, Islam MU, Thepen T, Barth S. CD64: An Attractive Immunotherapeutic Target for M1-type Macrophage Mediated Chronic Inflammatory Diseases. *Biomedicines* 2017; 5(3):56.
77. Djordjevic D, Pejovic J, Surbatovic M, Jevdjic J, Radakovic S, Veljovic M, Peric A, Andjelic T, Popovic N. Prognostic Value and Daily Trend of Interleukin-6, Neutrophil CD64 Expression, C-Reactive Protein and Lipopolysaccharide-Binding Protein in Critically Ill Patients: Reliable Predictors of Outcome or Not? *J Med Biochem* 2015; 34(4):431-439.
78. Wang X, Li ZY, Zeng L, Zhang AQ, Pan W, Gu W, Jiang JX. Neutrophil CD64 expression as a diagnostic marker for sepsis in adult patients: a meta-analysis. *Crit Care* 2015; 19(1):245.
79. Hassan U, Ghonge T, Reddy B Jr, Patel M, Rappleye M, Taneja I, Tanna A, Healey R, Manusry N, Price Z, Jensen T, Berger J, Hasnain A, Flaughner E, Liu S, Davis B, Kumar J, White K, Bashir R. A point-of-care microfluidic biochip for quantification of CD64 expression from whole blood for sepsis stratification. *Nat Commun* 2017; 8:15949.
80. Jersmann HP. Time to abandon dogma: CD14 is expressed by non-myeloid lineage cells. *Immunol Cell Biol* 2005; 83(5):462-467

81. Kelley SL, Lukk T, Nair SK, Tapping RI. The crystal structure of human soluble CD14 reveals a bent solenoid with a hydrophobic amino-terminal pocket. *J Immunol* 2013; 190(3):1304-1311
82. Kim JI, Lee CJ, Jin MS, Lee CH, Paik SG, Lee H, Lee JO. Crystal structure of CD14 and its implications for lipopolysaccharide signaling. *J Biol Chem* 2005; 280(12): 11347-11351.
83. Kim SJ, Kim HM. Dynamic lipopolysaccharide transfer cascade to TLR4/MD2 complex via LBP and CD14. *BMB Rep* 2017; 50(2):55-57.
84. Surbatovic M, Grujic K, Cikota B, Jevtic M, Filipovic N, Romic P, Strelac N, Magic Z. Polymorphisms of genes encoding tumor necrosis factor-alpha, interleukin-10, cluster of differentiation-14 and interleukin-1ra in critically ill patients. *J Crit Care* 2010; 25(3): 542.e1-8.
85. Zasada M, Lenart M, Rutkowska-Zapala M, Stec M, Durlak W, Grudzień A, Krzeczowska A, Mól N, Pilch M, Siedlar M, Kwinta P. Analysis of PD-1 expression in the monocyte subsets from non-septic and septic preterm neonates. *PLoS One* 2017; 12(10):e0186819.
86. Patil NK, Guo Y, Luan L, Sherwood ER. Targeting Immune Cell Checkpoints during Sepsis. *Int J Mol Sci* 2017; 18(11):2413.
87. Wakeley ME, Gray CC, Monaghan SF, Heffernan DS, Ayala A. Check Point Inhibitors and Their Role in Immunosuppression in Sepsis. *Crit Care Clin* 2020; 36(1):69-88.
88. Wiczorek M, Abualrous ET, Sticht J, Álvaro-Benito M, Stolzenberg S, Noé F, Freund C. Major Histocompatibility Complex (MHC) Class I and MHC Class II Proteins: Conformational Plasticity in Antigen Presentation. *Front Immunol* 2017; 8:292.
89. Landelle C, Lepape A, Voirin N, Tognet E, Venet F, Bohé J, Vanhems P, Monneret G. Low monocyte human leukocyte antigen-DR is independently associated with nosocomial infections after septic shock. *Intensive Care Med* 2010; 36(11):1859-1866.
90. Drewry AM, Ablordeppey EA, Murray ET, Beiter ER, Walton AH, Hall MW, Hotchkiss RS. Comparison of monocyte human leukocyte antigen-DR expression and stimulated tumor necrosis factor alpha production as outcome predictors in severe sepsis: a prospective observational study. *Crit Care* 2016; 20(1):334.
91. Gouel-Chéron A, Allaouchiche B, Floccard B, Rimmelé T, Monneret G. Early daily mHLA-DR monitoring predicts forthcoming sepsis in severe trauma patients. *Intensive*

- Care Med 2015; 41(12):2229-2230.
92. Pfortmueller CA, Meisel C, Fux M, Schefold JC. Assessment of immune organ dysfunction in critical illness: utility of innate immune response markers. *Intensive Care Med Exp* 2017; 5(1):49.
93. Reinhart K, Bauer M, Riedemann NC, Hartog CS. New approaches to sepsis: molecular diagnostics and biomarkers. *Clin Microbiol Rev* 2012; 25(4):609-634.
94. Park BH, Kang YA, Park MS, Jung WJ, Lee SH, Lee SK, Kim SY, Kim SK, Chang J, Jung JY, Kim YS. Delta neutrophil index as an early marker of disease severity in critically ill patients with sepsis. *BMC Infect Dis* 2011;11:299.
95. Buoro S, Seghezzi M, Vavassori M, Dominoni P, Apassiti Esposito S, Manenti B, Mecca T, Marchesi G, Castellucci E, Azzarà G, Ottomano C, Lippi G. Clinical significance of cell population data (CPD) on Sysmex XN-9000 in septic patients with or without liver impairment. *Ann Transl Med* 2016; 4(21):418.
96. Horiguchi H, Loftus TJ, Hawkins RB, Raymond SL, Stortz JA, Hollen MK, Weiss BP, Miller ES, Bihorac A, Larson SD, Mohr AM, Brakenridge SC, Tsujimoto H, Ueno H, Moore FA, Moldawer LL, Efron PA; Sepsis and Critical Illness Research Center Investigators. Innate Immunity in the Persistent Inflammation, Immunosuppression, and Catabolism Syndrome and Its Implications for Therapy. *Front Immunol* 2018; 9:595.
97. DeMerle KM, Angus DC, Baillie JK, Brant E, Calfee CS, Carcillo J, Chang CH, Dickson R, Evans I, Gordon AC, Kennedy J, Knight JC, Lindsell CJ, Liu V, Marshall JC, Randolph AG, Scicluna BP, Shankar-Hari M, Shapiro NI, Sweeney TE, Talisa VB, Tang B, Thompson BT, Tsalik EL, van der Poll T, van Vught LA, Wong HR, Yende S, Zhao H, Seymour CW. Sepsis Subclasses: A Framework for Development and Interpretation. *Crit Care Med* 2021; Feb 15.
doi:10.1097/CCM.0000000000004842. Epub ahead of print.
98. Mehta P, McAuley DF, Brown M, Sanchez E, Tattersall RS, Manson JJ; HLH Across Speciality Collaboration, UK. COVID-19: consider cytokine storm syndromes and immunosuppression. *Lancet* 2020; 395(10229):1033-1034.
99. Huang C, Wang Y, Li X, Ren L, Zhao J, Hu Y, Zhang L, Fan G, Xu J, Gu X, Cheng Z, Yu T, Xia J, Wei Y, Wu W, Xie X, Yin W, Li H, Liu M, Xiao Y, Gao H, Guo L, Xie J, Wang G, Jiang R, Gao Z, Jin Q, Wang J, Cao B. Clinical features of patients

- infected with 2019 novel coronavirus in Wuhan, China. *Lancet* 2020; 395(10223):497-506.
100. Ruan Q, Yang K, Wang W, Jiang L, Song J. Clinical predictors of mortality due to COVID-19 based on an analysis of data of 150 patients from Wuhan, China. *Intensive Care Med* 2020; 46(5):846-848.
101. McGonagle D, Sharif K, O'Regan A, Bridgewood C. The Role of Cytokines including Interleukin-6 in COVID-19 induced Pneumonia and Macrophage Activation Syndrome-Like Disease. *Autoimmun Rev* 2020; 19(6):102537.
102. Ye Q, Wang B, Mao J. The pathogenesis and treatment of the 'Cytokine Storm' in COVID-19. *J Infect* 2020; 80(6):607-613.
103. Blanco-Melo D, Nilsson-Payant BE, Liu WC, Uhl S, Hoagland D, Møller R, Jordan TX, Oishi K, Panis M, Sachs D, Wang TT, Schwartz RE, Lim JK, Albrecht RA, tenOever BR. Imbalanced Host Response to SARS-CoV-2 Drives Development of COVID-19. *Cell* 2020; 181(5):1036-1045.e9.
104. Vardhana SA, Wolchok JD. The many faces of the anti-COVID immune response. *J Exp Med* 2020; 217(6):e20200678.
105. Hadjadj J, Yatim N, Barnabei L, Corneau A, Boussier J, Smith N, Péré H, Charbit B, Bondet V, Chenevier-Gobeaux C, Breillat P, Carlier N, Gauzit R, Morbieu C, Pène F, Marin N, Roche N, Szwebel TA, Merkling SH, Treluyer JM, Veyer D, Mouthon L, Blanc C, Tharaux PL, Rozenberg F, Fischer A, Duffy D, Rieux-Laucat F, Kernéis S, Terrier B. Impaired type I interferon activity and inflammatory responses in severe COVID-19 patients. *Science* 2020; 369(6504):718-724.
106. Kim JS, Lee JY, Yang JW, Lee KH, Effenberger M, Szpirt W, Kronbichler A, Shin JI. Immunopathogenesis and treatment of cytokine storm in COVID-19. *Theranostics* 2021; 11(1):316-329.
107. Cron RQ, Chatham WW. The Rheumatologist's Role in COVID-19. *J Rheumatol* 2020; 47(5):639-642.
108. Tay MZ, Poh CM, Rénia L, MacAry PA, Ng LFP. The trinity of COVID-19: immunity, inflammation and intervention. *Nat Rev Immunol* 2020; 20(6):363-374.
109. Zafer MM, El-Mahallawy HA, Ashour HM. Severe COVID-19 and Sepsis: Immune Pathogenesis and Laboratory Markers. *Microorganisms* 2021; 9(1):159.
110. Beltrán-García J, Osca-Verdegal R, Pallardó FV, Ferreres J, Rodríguez M, Mulet S,

- Ferrando-Sánchez C, Carbonell N, García-Giménez JL. Sepsis and Coronavirus Disease 2019: Common Features and Anti-Inflammatory Therapeutic Approaches. *Crit Care Med* 2020; 48(12):1841-1844.
111. Sinha P, Matthay MA, Calfee CS. Is a "Cytokine Storm" Relevant to COVID-19? *JAMA Intern Med* 2020; 180(9):1152-1154.
112. Famous KR, Delucchi K, Ware LB, Kangelaris KN, Liu KD, Thompson BT, Calfee CS; ARDS Network. Acute Respiratory Distress Syndrome Subphenotypes Respond Differently to Randomized Fluid Management Strategy. *Am J Respir Crit Care Med* 2017; 195(3):331-338.
113. Sinha P, Delucchi KL, Thompson BT, McAuley DF, Matthay MA, Calfee CS; NHLBI ARDS Network. Latent class analysis of ARDS subphenotypes: a secondary analysis of the statins for acutely injured lungs from sepsis (SAILS) study. *Intensive Care Med* 2018; 44(11):1859-1869.
114. Ackermann M, Verleden SE, Kuehnel M, Haverich A, Welte T, Laenger F, Vanstapel A, Werlein C, Stark H, Tzankov A, Li WW, Li VW, Mentzer SJ, Jonigk D. Pulmonary Vascular Endothelialitis, Thrombosis, and Angiogenesis in Covid-19. *N Engl J Med* 2020; 383(2):120-128.
115. Stone JH, Frigault MJ, Serling-Boyd NJ, Fernandes AD, Harvey L, Foulkes AS, Horick NK, Healy BC, Shah R, Bensaci AM, Woolley AE, Nikiforow S, Lin N, Sagar M, Schragger H, Huckins DS, Axelrod M, Pincus MD, Fleisher J, Sacks CA, Dougan M, North CM, Halvorsen YD, Thurber TK, Dagher Z, Scherer A, Wallwork RS, Kim AY, Schoenfeld S, Sen P, Neilan TG, Perugino CA, Unizony SH, Collier DS, Matza MA, Vinh JM, Bowman KA, Meyerowitz E, Zafar A, Drobni ZD, Bolster MB, Kohler M, D'Silva KM, Dau J, Lockwood MM, Cubbison C, Weber BN, Mansour MK; BACC Bay Tocilizumab Trial Investigators. Efficacy of Tocilizumab in Patients Hospitalized with Covid-19. *N Engl J Med* 2020; 383(24):2333-2344.
116. Noroozi R, Branicki W, Pyrc K, Łabaj PP, Pospiech E, Taheri M, Ghafouri-Fard S. Altered cytokine levels and immune responses in patients with SARS-CoV-2 infection and related conditions. *Cytokine* 2020; 133:155143.
117. Kox M, Waalders NJB, Kooistra EJ, Gerretsen J, Pickkers P. Cytokine Levels in Critically Ill Patients With COVID-19 and Other Conditions. *JAMA* 2020; 324(15):1565–7.

118. Kox M, Frenzel T, Schouten J, van de Veerdonk FL, Koenen HJPM, Pickkers P; , on behalf of the RCI-COVID-19 study group. COVID-19 patients exhibit less pronounced immune suppression compared with bacterial septic shock patients. *Crit Care* 2020; 24(1):263.
119. Leijte GP, Rimmelé T, Kox M, Bruse N, Monard C, Gossez M, Monneret G, Pickkers P, Venet F. Monocytic HLA-DR expression kinetics in septic shock patients with different pathogens, sites of infection and adverse outcomes. *Crit Care* 2020; 24(1): 110.
120. McGonagle D, Ramanan AV, Bridgewood C. Immune cartography of macrophage activation syndrome in the COVID-19 era. *Nat Rev Rheumatol* 2021;17(3):145-157.
121. Schulte-Schrepping J, Reusch N, Paclik D, Baßler K, Schlickeiser S, Zhang B, Krämer B, Krammer T, Brumhard S, Bonaguro L, De Domenico E, Wendisch D, Grasshoff M, Kapellos TS, Beckstette M, Pecht T, Saglam A, Dietrich O, Mei HE, Schulz AR, Conrad C, Kunkel D, Vafadarnejad E, Xu CJ, Horne A, Herbert M, Drews A, Thibeault C, Pfeiffer M, Hippenstiel S, Hocke A, Müller-Redetzky H, Heim KM, Machleidt F, Uhrig A, Bosquillon de Jarce L, Jürgens L, Stegemann M, Glösenkamp CR, Volk HD, Goffinet C, Landthaler M, Wyler E, Georg P, Schneider M, Dang-Heine C, Neuwinger N, Kappert K, Tauber R, Corman V, Raabe J, Kaiser KM, Vinh MT, Rieke G, Meisel C, Ulas T, Becker M, Geffers R, Witzernath M, Drost C, Suttorp N, von Kalle C, Kurth F, Händler K, Schultze JL, Aschenbrenner AC, Li Y, Nattermann J, Sawitzki B, Saliba AE, Sander LE; Deutsche COVID-19 OMICS Initiative (DeCOI). Severe COVID-19 Is Marked by a Dysregulated Myeloid Cell Compartment. *Cell* 2020; 182(6):1419-1440.e23.
122. Wang D, Hu B, Hu C, Zhu F, Liu X, Zhang J, Wang B, Xiang H, Cheng Z, Xiong Y, Zhao Y, Li Y, Wang X, Peng Z. Clinical Characteristics of 138 Hospitalized Patients With 2019 Novel Coronavirus-Infected Pneumonia in Wuhan, China. *JAMA* 2020; 323(11):1061-1069.
123. Middleton EA, He XY, Denorme F, Campbell RA, Ng D, Salvatore SP, Mostyka M, Baxter-Stoltzfus A, Borczuk AC, Loda M, Cody MJ, Manne BK, Portier I, Harris ES, Petrey AC, Beswick EJ, Caulin AF, Iovino A, Abegglen LM, Weyrich AS, Rondina MT, Egeblad M, Schiffman JD, Yost CC. Neutrophil extracellular traps contribute to immunothrombosis in COVID-19 acute respiratory distress syndrome. *Blood* 2020;

- 136(10):1169-1179.
124. Tomar B, Anders HJ, Desai J, Mulay SR. Neutrophils and Neutrophil Extracellular Traps Drive Necroinflammation in COVID-19. *Cells* 2020; 9(6):1383.
125. Zhou Z, Ren L, Zhang L, Zhong J, Xiao Y, Jia Z, Guo L, Yang J, Wang C, Jiang S, Yang D, Zhang G, Li H, Chen F, Xu Y, Chen M, Gao Z, Yang J, Dong J, Liu B, Zhang X, Wang W, He K, Jin Q, Li M, Wang J. Heightened Innate Immune Responses in the Respiratory Tract of COVID-19 Patients. *Cell Host Microbe* 2020; 27(6):883-890.e2.
126. Xiong Y, Liu Y, Cao L, Wang D, Guo M, Jiang A, Guo D, Hu W, Yang J, Tang Z, Wu H, Lin Y, Zhang M, Zhang Q, Shi M, Liu Y, Zhou Y, Lan K, Chen Y. Transcriptomic characteristics of bronchoalveolar lavage fluid and peripheral blood mononuclear cells in COVID-19 patients. *Emerg Microbes Infect* 2020; (1):761-770.
127. Conti P, Ronconi G, Caraffa A, Gallenga CE, Ross R, Frydas I, Kritas SK. Induction of pro-inflammatory cytokines (IL-1 and IL-6) and lung inflammation by Coronavirus-19 (COVI-19 or SARS-CoV-2): anti-inflammatory strategies. *J Biol Regul Homeost Agents* 2020; 34(2):327-331.
128. Fornasari. PM. COVID-19: Neutrophils “Unfriendly Fire” Imbalance Proteolytic Cascades Triggering Clinical Worsening and Viral Sepsis. Potential Role Explanation for Convalescent Plasma as “Fire Hose”. *Preprints* 2020; 2020050373 (doi: 10.20944/preprints202005.0373.v1).
129. Wilk AJ, Rustagi A, Zhao NQ, Roque J, Martínez-Colón GJ, McKechnie JL, Ivison GT, Ranganath T, Vergara R, Hollis T, Simpson LJ, Grant P, Subramanian A, Rogers AJ, Blish CA. A single-cell atlas of the peripheral immune response in patients with severe COVID-19. *Nat Med* 2020; 26(7):1070-1076.
130. Parackova Z, Zentsova I, Bloomfield M, Vrabcova P, Smetanova J, Klocperk A, Mesežnikov G, Casas Mendez LF, Vymazal T, Sediva A. Disharmonic Inflammatory Signatures in COVID-19: Augmented Neutrophils' but Impaired Monocytes' and Dendritic Cells' Responsiveness. *Cells* 2020; 9(10):2206.
131. Giamarellos-Bourboulis EJ, Netea MG, Rovina N, Akinosoglou K, Antoniadou A, Antonakos N, Damoraki G, Gkavogianni T, Adami ME, Katsaounou P, Ntaganou M, Kyriakopoulou M, Dimopoulos G, Koutsodimitropoulos I, Velissaris D, Koufargyris P, Karageorgos A, Katrini K, Lekakis V, Lupse M, Kotsaki A, Renieris G, Theodoulou D, Panou V, Koukaki E, Koulouris N, Gogos C, Koutsoukou A. Complex

- Immune Dysregulation in COVID-19 Patients with Severe Respiratory Failure. *Cell Host Microbe* 2020; 27(6):992-1000.e3.
132. Ong EZ, Chan YFZ, Leong WY, Lee NMY, Kalimuddin S, Haja Mohideen SM, Chan KS, Tan AT, Bertolotti A, Ooi EE, Low JGH. A Dynamic Immune Response Shapes COVID-19 Progression. *Cell Host Microbe* 2020; 27(6):879-882.e2.
133. Zuo Y, Yalavarthi S, Shi H, Gockman K, Zuo M, Madison JA, Blair C, Weber A, Barnes BJ, Egeblad M, Woods RJ, Kanthi Y, Knight JS. Neutrophil extracellular traps in COVID-19. *JCI Insight* 2020; 5(11):e138999.
134. Aghbash PS, Eslami N, Shamekh A, Entezari-Maleki T, Baghi HB. SARS-CoV-2 infection: The role of PD-1/PD-L1 and CTLA-4 axis. *Life Sci* 2021; 270:119124.
135. Arunachalam PS, Wimmers F, Mok CKP, Perera RAPM, Scott M, Hagan T, Sigal N, Feng Y, Bristow L, Tak-Yin Tsang O, Wagh D, Collier J, Pellegrini KL, Kazmin D, Alaaeddine G, Leung WS, Chan JMC, Chik TSH, Choi CYC, Huerta C, Paine McCullough M, Lv H, Anderson E, Edupuganti S, Upadhyay AA, Bosinger SE, Maecker HT, Khatri P, Roupheal N, Peiris M, Pulendran B. Systems biological assessment of immunity to mild versus severe COVID-19 infection in humans. *Science* 2020; 369(6508):1210-1220.
136. Lévy Y, Wiedemann A, Hejblum BP, Durand M, Lefebvre C, Surénaud M, Lacabaratz C, Perreau M, Foucat E, Déchenaud M, Tisserand P, Blengio F, Hivert B, Gautier M, Cervantes-Gonzalez M, Bachelet D, Laouéan C, Bouadma L, Timsit JF, Yazdanpanah Y, Pantaleo G, Hocini H, Thiébaud R, the French COVID cohort study group. CD177, a specific marker of neutrophil activation, is a hallmark of COVID-19 severity and death. *medRxiv* 2020.12.12.20246934; doi: 10.1101/2020.12.12.20246934
137. Sullivan RJ, Johnson DB, Rini BI, Neilan TG, Lovly CM, Moslehi JJ, Reynolds KL. COVID-19 and immune checkpoint inhibitors: initial considerations. *J Immunother Cancer* 2020; 8(1):e000933.
138. Diao B, Wang C, Tan Y, Chen X, Liu Y, Ning L, Chen L, Li M, Liu Y, Wang G, Yuan Z, Feng Z, Zhang Y, Wu Y, Chen Y. Reduction and Functional Exhaustion of T Cells in Patients With Coronavirus Disease 2019 (COVID-19). *Front Immunol* 2020; 11:827.
139. Vivarelli S, Falzone L, Torino F, Scandurra G, Russo G, Bordonaro R, Pappalardo F,

- Spandidos DA, Raciti G, Libra M. Immune-checkpoint inhibitors from cancer to COVID-19: A promising avenue for the treatment of patients with COVID-19 (Review). *Int J Oncol* 2021; 58(2):145-157.
140. Lescure FX, Bouadma L, Nguyen D, Parisey M, Wicky PH, Behillil S, Gaymard A, Bouscambert-Duchamp M, Donati F, Le Hingrat Q, Enouf V, Houhou-Fidouh N, Valette M, Mailles A, Lucet JC, Mentre F, Duval X, Descamps D, Malvy D, Timsit JF, Lina B, van-der-Werf S, Yazdanpanah Y. Clinical and virological data of the first cases of COVID-19 in Europe: a case series. *Lancet Infect Dis* 2020; 20(6):697-706.
141. Endeman H, van der Zee P, van Genderen ME, van den Akker JPC, Gommers D. Progressive respiratory failure in COVID-19: a hypothesis. *Lancet Infect Dis* 2020; 20(12):1365.
142. de la Rica R, Borges M, Gonzalez-Freire M. COVID-19: In the Eye of the Cytokine Storm. *Front Immunol* 2020; 11:558898.
143. Xiao L, Sakagami H, Miwa N. ACE2: The key Molecule for Understanding the Pathophysiology of Severe and Critical Conditions of COVID-19: Demon or Angel? *Viruses* 2020; 12(5):491.
144. Laing AG, Lorenc A, Del Molino Del Barrio I, Das A, Fish M, Monin L, Muñoz-Ruiz M, McKenzie DR, Hayday TS, Francos-Quijorna I, Kamdar S, Joseph M, Davies D, Davis R, Jennings A, Zlatareva I, Vantourout P, Wu Y, Sofra V, Cano F, Greco M, Theodoridis E, Freedman JD, Gee S, Chan JNE, Ryan S, Bugallo-Blanco E, Peterson P, Kisand K, Haljasmägi L, Chadli L, Moingeon P, Martinez L, Merrick B, Bisnauthsing K, Brooks K, Ibrahim MAA, Mason J, Lopez Gomez F, Babalola K, Abdul-Jawad S, Cason J, Mant C, Seow J, Graham C, Doores KJ, Di Rosa F, Edgeworth J, Shankar-Hari M, Hayday AC. A dynamic COVID-19 immune signature includes associations with poor prognosis. *Nat Med* 2020; 26(10):1623-1635.
145. Sollini M, Morbelli S, Ciccarelli M, Cecconi M, Aghemo A, Morelli P, Chiola S, Gelardi F, Chiti A. Long COVID hallmarks on [18F]FDG-PET/CT: a case-control study. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* 2021; Mar 7:1–11.
146. Di Cosimo S, Malfettone A, Pérez-García JM, Llombart-Cussac A, Miceli R, Curigliano G, Cortés J. Immune checkpoint inhibitors: a physiology-driven approach to the treatment of coronavirus disease 2019. *Eur J Cancer* 2020; 135:62-65.
147. Surbatovic M, Radakovic S, Jevtic M, Filipovic N, Romic P, Popovic N, Jevdjic J,

- Grujic K, Djordjevic D. Predictive value of serum bicarbonate, arterial base deficit/excess and SAPS III score in critically ill patients. *Gen Physiol Biophys* 2009; 28(Spec No):271-276.
148. Ackland GL, Prowle JR. Presepsin: solving a soluble (CD14) problem in sepsis? *Intensive Care Med* 2015; 45(2):351-353.
149. Masson S, Caironi P, Fanizza C, Thomae R, Bernasconi R, Noto A, Oggioni R, Pasetti GS, Romero M, Tognoni G, Latini R, Gattinoni L. Circulating presepsin (soluble CD14 subtype) as a marker of host response in patients with severe sepsis or septic shock: data from the multicenter, randomized ALBIOS trial. *Intensive Care Med* 2015; 41(1):12-20.
150. Brodska H, Valenta J, Pelinkova K, Stach Z, Sachl R, Balik M, Zima T, Drabek T. Diagnostic and prognostic value of presepsin vs. established biomarkers in critically ill patients with sepsis or systemic inflammatory response syndrome. *Clin Chem Lab Med* 2018; 56(4):658-668.
151. Yang HS, Hur M, Yi A, Kim H, Lee S, Kim S-N. Prognostic value of presepsin in adult patients with sepsis: systematic review and meta-analysis. *PLoS ONE* 2018; 13(1):e0191486.
152. Behnes M, Bertsch T, Lepiorz D, Lang S, Trinkmann F, Brueckmann M, Borggreffe M, Hoffmann U. Diagnostic and prognostic utility of soluble CD 14 subtype (presepsin) for severe sepsis and septic shock during the first week of intensive care treatment. *Crit Care* 2014; 18(5):507.
153. El-Shafie MES, Taema KM, El-Hallag MM, Kandeel AMA. Role of presepsin compared to C-reactive protein in sepsis diagnosis and prognostication. *Egypt J Crit Care Med* 2017; 5(1):1-12.
154. Mahmoud AM, Sherif HM, Saber HM, Taema KM. Presepsin as a predictor of sepsis outcome in comparison with procalcitonin and C-reactive protein. *Research and Opinion in Anesthesia & Intensive Care* 2019; 6:313-20.
155. Kim H, Hur M, Moon HW, Yun YM, Di Somma S, on behalf of GREAT Network. Multi-marker approach using procalcitonin, presepsin, galectin-3, and soluble suppression of tumorigenicity 2 for the prediction of mortality in sepsis. *Ann Intensive Care* 2017; 7(1):27.
156. Larsen FF, Petersen JA. Novel biomarkers for sepsis: A narrative review. *Eur J Intern*

- Med 2017; 45:46-50.
157. Lu B, Zhang Y, Li C, Liu C, Yao Y, Su M, Shou S. The utility of presepsin in diagnosis and risk stratification for the emergency patients with sepsis. *Am J Emerg Med* 2018; 36(8):1341-1345.
158. Kang J, Gong P, Zhang XD, Wang WJ, Li CS. Early Differential Value of Plasma Presepsin on Infection of Trauma Patients. *Shock* 2019; 52(3):362-369.
159. Kondo Y, Umemura Y, Hayashida K, Hara Y, Aihara M, Yamakawa K. Diagnostic value of procalcitonin and presepsin for sepsis in critically ill adult patients: a systematic review and meta-analysis. *J Intensive Care* 2019; 7:22.
160. Almansa R, Martín S, Martín-Fernandez M, Heredia-Rodríguez M, Gómez-Sánchez E, Aragón M, Andrés C, Calvo D, Rico-Feijoo J, Esteban-Velasco MC, Vaquero-Roncero LM, Ortega A, Gómez-Pesquera E, Lorenzo-López M, de Cenarruzabeitia IL, Benavides D, López-Sánchez J, Doncel C, González-Sánchez C, Zarca E, Ríos-Llorente A, Diaz A, Sanchez-Barrado E, de Heredia JB, Calvo-Vecino JM, Muñoz-Bellvís L, Gomez-Herreras JI, Aldecoa C, Tamayo E, Bermejo-Martin JF. Combined quantification of procalcitonin and HLA-DR improves sepsis detection in surgical patients. *Sci Rep* 2018; 8(1):11999.
161. Bösch F, Schallhorn S, Miksch RC, Chaudry IH, Faist E, Werner J, Angele MK, Pratschke S. The Prognostic Value of Presepsin for Sepsis in Abdominal Surgery: A Prospective Study. *Shock* 2020; 54(1):56-61.
162. AlRawahi AN, AlHinai FA, Doig CJ, Ball CG, Dixon E, Xiao Z, Kirkpatrick AW. The prognostic value of serum procalcitonin measurements in critically injured patients: a systematic review. *Crit Care* 2019; 23(1):390.
163. Houwink AP, Rijkenberg S, Bosman RJ, van der Voort PH. The association between lactate, mean arterial pressure, central venous oxygen saturation and peripheral temperature and mortality in severe sepsis: a retrospective cohort analysis. *Crit Care* 2016; 20:56.
164. Bou Chebl R, El Khuri C, Shami A, Rajha E, Faris N, Bachir R, Abou Dagher G. Serum lactate is an independent predictor of hospital mortality in critically ill patients in the emergency department: a retrospective study. *Scand J Trauma Resusc Emerg Med* 2017; 25(1):69.
165. Reyna MA, Josef CS, Jeter R, Shashikumar SP, Westover MB, Nemati S, Clifford

- GD, Sharma A. Early Prediction of Sepsis From Clinical Data: The PhysioNet/Computing in Cardiology Challenge 2019. *Crit Care Med.* 2020; 48(2):210-217.
166. Pierrakos C, Velissaris D, Bisdorff M, Marshall JC, Vincent JL. Biomarkers of sepsis: time for a reappraisal. *Crit Care* 2020; 24(1):287.
167. Liu X, Shen Y, Wang H, Ge Q, Fei A, Pan S. Prognostic Significance of Neutrophil-to-Lymphocyte Ratio in Patients with Sepsis: A Prospective Observational Study. *Mediators Inflamm* 2016; 2016:8191254.
168. Saliccioli JD, Marshall DC, Pimentel MA, Santos MD, Pollard T, Celi LA, Shalhoub J. The association between the neutrophil-to-lymphocyte ratio and mortality in critical illness: an observational cohort study. *Crit Care* 2015; 19(1):13.
169. Azab B, Jaglall N, Atallah JP, Lamet A, Raja-Surya V, Farah B, Lesser M, Widmann WD. Neutrophil-lymphocyte ratio as a predictor of adverse outcomes of acute pancreatitis. *Pancreatology* 2011; 11(4):445-452.
170. Riché F, Gayat E, Barthélémy R, Le Dorze M, Matéo J, Payen D. Reversal of neutrophil-to-lymphocyte count ratio in early versus late death from septic shock. *Crit Care* 2015; 19:439.
171. de Jager CP, Wever PC, Gemen EF, Kusters R, van Gageldonk-Lafeber AB, van der Poll T, Laheij RJ. The neutrophil-lymphocyte count ratio in patients with community-acquired pneumonia. *PLoS One* 2012; 7(10):e46561.
172. Naess A, Nilssen SS, Mo R, Eide GE, Sjursen H. Role of neutrophil to lymphocyte and monocyte to lymphocyte ratios in the diagnosis of bacterial infection in patients with fever. *Infection* 2017; 45(3):299-307.
173. Wang J, Yin Y, Wang X, Pei H, Kuai S, Gu L, Xing H, Zhang Y, Huang Q, Guan B. Ratio of monocytes to lymphocytes in peripheral blood in patients diagnosed with active tuberculosis. *Braz J Infect Dis* 2015; 19(2):125-131.
174. Xiang J, Zhou L, Li X, Bao W, Chen T, Xi X, He Y, Wan X. Preoperative Monocyte-to-Lymphocyte Ratio in Peripheral Blood Predicts Stages, Metastasis, and Histological Grades in Patients with Ovarian Cancer. *Transl Oncol* 2017; 10(1):33-39.
175. Eo WK, Kwon S, Koh SB, Kim MJ, Ji YI, Lee JY, Suh DS, Kim KH, Kim HY. The Lymphocyte-Monocyte Ratio Predicts Patient Survival and Aggressiveness of Endometrial Cancer. *J Cancer* 2016; 7(5):538-545.

176. Zheng CF, Liu WY, Zeng FF, Zheng MH, Shi HY, Zhou Y, Pan JY. Prognostic value of platelet-to-lymphocyte ratios among critically ill patients with acute kidney injury. *Crit Care* 2017; 21(1):238.
177. Bekdas M, Ozturk H. Platelet-to-Lymphocyte ratio in diagnosis of acute complicated appendicitis in childhood. *Journal of Clinical and Analytical Medicine* 2017; 8(4):299-301.
178. Furuncuoglu Y, Tulgar S, Dogan AN et al. How obesity affects the neutrophil/lymphocyte and platelet/lymphocyte ratio, systemic immune-inflammatory index and platelet indices: a retrospective study. *Eur Rev Med Pharmacol Sci* 2016; 20(7):1300-1306
179. Shimoyama Y, Umegaki O, Agui T, Kadono N, Minami T. Neutrophil to lymphocyte ratio and platelet to lymphocyte ratio are superior to other inflammation-based prognostic scores in predicting the mortality of patients with gastrointestinal perforation. *JA Clin Rep* 2017; 3(1):49.
180. Oh GH, Chung SP, Park YS, Hong JH, Lee HS, Chung HS, You JS, Park JW, Park I. Mean Platelet Volume to Platelet Count Ratio as a Promising Predictor of Early Mortality in Severe Sepsis. *Shock* 2017; 47(3):323-330.
181. Legrand M, Klijn E, Payen D, Ince C. The response of the host microcirculation to bacterial sepsis: does the pathogen matter? *J Mol Med (Berl)* 2010; 88(2):127-133.
182. Skovbjerg S, Martner A, Hynsjö L, Hessle C, Olsen I, Dewhirst FE, Tham W, Wold AE. Gram-Positive and Gram-Negative Bacteria Induce Different Patterns of Cytokine Production in Human Mononuclear Cells Irrespective of Taxonomic Relatedness. *J Interferon Cytokine Res* 2010; 30(1):23-32
183. Cohen J. A role for the micro-organism in the outcome from infection? A principle challenged. *Crit Care Med* 2011; 39(8):2001-2002.
184. Finney SJ, Leaver SK, Evans TW, Burke-Gaffney A. Differences in lipopolysaccharide- and lipoteichoic acid-induced cytokine/chemokine expression. *Intensive Care Med* 2012; 38(2):324-332.
185. Xu XJ, Tang YM, Liao C, Song H, Yang SL, Xu WQ, Shi SW, Zhao N. Inflammatory cytokine measurement quickly discriminates gram-negative from gram-positive bacteremia in pediatric hematology/oncology patients with septic shock. *Intensive Care Med* 2013; 39(2):319-326.

186. Janols H, Bergenfelz C, Allaoui R, Larsson AM, Rydén L, Björnsson S, Janciauskiene S, Wullt M, Bredberg A, Leandersson K. A high frequency of MDSCs in sepsis patients, with the granulocytic subtype dominating in gram-positive cases. *J Leukoc Biol* 2014; 96(5):685-693.
187. Gabrilovich DI. Editorial: The intricacy of choice: can bacteria decide what type of myeloid cells to stimulate? *J Leukoc Biol* 2014; 96(5):671-674.
188. Ost M, Singh A, Peschel A, Mehling R, Rieber N, Hartl D. Myeloid-Derived Suppressor Cells in Bacterial Infections. *Front Cell Infect Microbiol* 2016; 6:37.
189. Minejima E, Bensman J, She RC, Mack WJ, Tuan Tran M, Ny P, Lou M, Yamaki J, Nieberg P, Ho J, Wong-Beringer A. A Dysregulated Balance of Proinflammatory and Anti-Inflammatory Host Cytokine Response Early During Therapy Predicts Persistence and Mortality in *Staphylococcus aureus* Bacteremia. *Crit Care Med* 2016; 44(4):671-679.
190. Antonakos N, Tsaganos T, Oberle V, Tsangaris I, Lada M, Pistiki A, Machairas N, Souli M, Bauer M, Giamarellos-Bourboulis EJ. Decreased cytokine production by mononuclear cells after severe gram-negative infections: early clinical signs and association with final outcome. *Crit Care* 2017; 21(1):48.
191. Surbatovic M, Popovic N, Vojvodic D, Milosevic I, Acimovic G, Stojicic M, Veljovic M, Jevdjic J, Djordjevic D, Radakovic S. Cytokine profile in severe Gram-positive and Gram-negative abdominal sepsis. *Sci Rep* 2015; 5:11355.
192. Udovicic I, Surbatovic M, Rondovic G, Stanojevic I, Zeba S, Djordjevic D, Peric A, Milosavljevic S, Stankovic N, Abazovic D, Vojvodic D. Do nature of bacteremia and origin of secondary sepsis in critically ill patients determine subset of myeloid derived suppressor cells expansion? *Vojnosanit Pregl* 2020; 77(9):923-933
193. Aydemir H, Piskin N, Akduman D, Kokturk F, Aktas E. Platelet and mean platelet volume kinetics in adult patients with sepsis. *Platelets* 2015; 26(4):331-335.
194. Cajander S, Rasmussen G, Tina E, Magnuson A, Söderquist B, Källman J, Strålin K. Dynamics of monocytic HLA-DR expression differs between bacterial etiologies during the course of bloodstream infection. *PLoS One* 2018; 13(2):e0192883.
195. Leijte GP, Rimmelé T, Kox M, Bruse N, Monard C, Gossez M, Monneret G, Pickkers P, Venet F. Monocytic HLA-DR expression kinetics in septic shock patients with different pathogens, sites of infection and adverse outcomes. *Crit Care* 2020; 24(1):

- 110.
196. Boeddha NP, Kerklaan D, Dunbar A, van Puffelen E, Nagtzaam NMA, Vanhorebeek I, Van den Berghe G, Hazelzet JA, Joosten KF, Verbruggen SC, Dik WA, Driessen GJ. HLA-DR Expression on Monocyte Subsets in Critically Ill Children. *Pediatr Infect Dis J* 2018; 37(10):1034-1040.
197. Monneret G, Lepape A, Voirin N, Bohé J, Venet F, Debard AL, Thizy H, Bienvenu J, Gueyffier F, Vanhems P. Persisting low monocyte human leukocyte antigen-DR expression predicts mortality in septic shock. *Intensive Care Med* 2006; 32(8):1175-1183.
198. Boomer JS, To K, Chang KC, Takasu O, Osborne DF, Walton AH, Bricker TL, Jarman SD 2nd, Kreisel D, Krupnick AS, Srivastava A, Swanson PE, Green JM, Hotchkiss RS. Immunosuppression in patients who die of sepsis and multiple organ failure. *JAMA* 2011; 306(23):2594-2605.
199. Wu JF, Ma J, Chen J, Ou-Yang B, Chen MY, Li LF, Liu YJ, Lin AH, Guan XD. Changes of monocyte human leukocyte antigen-DR expression as a reliable predictor of mortality in severe sepsis. *Crit Care* 2011; 15(5):R220.
200. Ploder M, Pelinka L, Schmuckenschlager C, Wessner B, Ankersmit HJ, Fuerst W, Redl H, Roth E, Spittler A. Lipopolysaccharide-induced tumor necrosis factor alpha production and not monocyte human leukocyte antigen-DR expression is correlated with survival in septic trauma patients. *Shock* 2006; 25(2):129-134.
201. Winkler MS, Rissiek A, Prießler M, Schwedhelm E, Robbe L, Bauer A, Zahrte C, Zoellner C, Kluge S, Nierhaus A. Human leukocyte antigen (HLA-DR) gene expression is reduced in sepsis and correlates with impaired TNF α response: A diagnostic tool for immunosuppression? *PLoS One* 2017; 12(8):e0182427.
202. Duggal NA, Snelson C, Shaheen U, Pearce V, Lord JM. Innate and adaptive immune dysregulation in critically ill ICU patients. *Sci Rep* 2018; 8(1):10186.
203. Timmermans K, Kox M, Vaneker M, van den Berg M, John A, van Laarhoven A, van der Hoeven H, Scheffer GJ, Pickkers P. Plasma levels of danger-associated molecular patterns are associated with immune suppression in trauma patients. *Intensive Care Med* 2016; 42(4):551-561.
204. Seshadri A, Brat GA, Yorkgitis BK, Keegan J, Dolan J, Salim A, Askari R, Lederer JA. Phenotyping the Immune Response to Trauma: A Multiparametric Systems

- Immunology Approach. Crit Care Med 2017; 45(9):1523-1530.
205. Gaudilliere B, Angst MS, Hotchkiss RS. Deep Immune Profiling in Trauma and Sepsis: Flow Is the Way to Go! Crit Care Med. 2017; 45(9):1577-1578.
206. Fang WF, Douglas IS, Chen YM, Lin CY, Kao HC, Fang YT, Huang CH, Chang YT, Huang KT, Wang YH, Wang CC, Lin MC. Development and validation of immune dysfunction score to predict 28-day mortality of sepsis patients. PLoS One 2017; 12(10):e0187088.
207. Jiang W, Zhong W, Deng Y, Chen C, Wang Q, Zhou M, Li X, Sun C, Zeng H. Evaluation of a combination "lymphocyte apoptosis model" to predict survival of sepsis patients in an intensive care unit. BMC Anesthesiol 2018; 18(1):89.
208. Lee J, Tam H, Adler L, Ilstad-Minnihan A, Macaubas C, Mellins ED. The MHC class II antigen presentation pathway in human monocytes differs by subset and is regulated by cytokines. PLoS One 2017; 12(8):e0183594.
209. Conway Morris A, Datta D, Shankar-Hari M, Stephen J, Weir CJ, Rennie J, Antonelli J, Bateman A, Warner N, Judge K, Keenan J, Wang A, Burpee T, Brown KA, Lewis SM, Mare T, Roy AI, Hulme G, Dimmick I, Rossi AG, Simpson AJ, Walsh TS. Cell-surface signatures of immune dysfunction risk-stratify critically ill patients: INFECT study. Intensive Care Med 2018; 44(5):627-635.
210. Textoris J, Gordon AC. Sepsis: who will shoot first? Pharma or diagnostics? Intensive Care Med 2018; 44(8):1331-1333.
211. Zorio V, Venet F, Delwarde B, Floccard B, Marcotte G, Textoris J, Monneret G, Rimmelé T. Assessment of sepsis-induced immunosuppression at ICU discharge and 6 months after ICU discharge. Ann Intensive Care 2017; 7(1):80.
212. Lachmann G, von Haefen C, Kurth J, Yuerek F, Spies C. Innate immunity recovers earlier than acquired immunity during severe postoperative immunosuppression. Int J Med Sci 2018; 15(1):1-9.
213. Torrance HDT, Longbottom ER, Vivian ME, Lalabekyan B, Abbott TEF, Ackland GL, Hinds CJ, Pearse RM, O'Dwyer MJ. Post-operative immune suppression is mediated via reversible, Interleukin-10 dependent pathways in circulating monocytes following major abdominal surgery. PLoS One. 2018; 13(9):e0203795.
214. Almansa R, Martín S, Martín-Fernandez M, Heredia-Rodríguez M, Gómez-Sánchez E, Aragón M, Andrés C, Calvo D, Rico-Feijoo J, Esteban-Velasco MC, Vaquero-

- Roncero LM, Ortega A, Gómez-Pesquera E, Lorenzo-López M, de Cenarruzabeitia IL, Benavides D, López-Sanchez J, Doncel C, González-Sanchez C, Zarca E, Ríos-Llorente A, Diaz A, Sanchez-Barrado E, de Heredia JB, Calvo-Vecino JM, Muñoz-Bellvís L, Gomez-Herreras JI, Aldecoa C, Tamayo E, Bermejo-Martin JF. Combined quantification of procalcitonin and HLA-DR improves sepsis detection in surgical patients. *Sci Rep* 2018; 8(1):11999.
215. Hoffmann JJ. Neutrophil CD64 as a sepsis biomarker. *Biochem Med (Zagreb)* 2011; 21(3):282-290.
216. Livaditi O, Kotanidou A, Psarra A, Dimopoulou I, Sotiropoulou C, Augustatou K, Papasteriades C, Armaganidis A, Roussos C, Orfanos SE, Douzinas EE. Neutrophil CD64 expression and serum IL-8: sensitive early markers of severity and outcome in sepsis. *Cytokine* 2006; 36(5-6):283-290.
217. Song SH, Kim HK, Park MH, Cho HI. Neutrophil CD64 expression is associated with severity and prognosis of disseminated intravascular coagulation. *Thromb Res* 2008; 121(4):499-507.
218. Hsu KH, Chan MC, Wang JM, Lin LY, Wu CL. Comparison of Fcγ receptor expression on neutrophils with procalcitonin for the diagnosis of sepsis in critically ill patients. *Respirology* 2011; 16(1):152-160.
219. Muller Kobold AC, Tulleken JE, Zijlstra JG, Sluiter W, Hermans J, Kallenberg CG, Tervaert JW. Leukocyte activation in sepsis; correlations with disease state and mortality. *Intensive Care Med* 2000; 26(7):883-892.
220. Danikas DD, Karakantza M, Theodorou GL, Sakellaropoulos GC, Gogos CA. Prognostic value of phagocytic activity of neutrophils and monocytes in sepsis. Correlation to CD64 and CD14 antigen expression. *Clin Exp Immunol* 2008; 154(1):87-97.
221. Cid J, García-Pardo G, Aguinaco R, Sánchez R, Llorente A. Neutrophil CD64: diagnostic accuracy and prognostic value in patients presenting to the emergency department. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2011; 30(7):845-852.
222. Daix T, Guerin E, Tavernier E, Mercier E, Gissot V, Hérault O, Mira JP, Dumas F, Chapuis N, Guitton C, Béné MC, Quenot JP, Tissier C, Guy J, Piton G, Roggy A, Muller G, Legac É, de Prost N, Khellaf M, Wagner-Ballon O, Coudroy R, Dindinaud E, Uhel F, Roussel M, Lafon T, Jeannet R, Vargas F, Fleureau C, Roux M, Allou K,

- Vignon P, Feuillard J, François B; Septiflux Trial Group. Multicentric Standardized Flow Cytometry Routine Assessment of Patients With Sepsis to Predict Clinical Worsening. *Chest* 2018; 154(3):617-627.
223. Hanna MOF, Abdelhameed AM, Abou-Elalla AA, Hassan RM, Kostandi I. Neutrophil and monocyte receptor expression in patients with sepsis: implications for diagnosis and prognosis of sepsis. *Pathog Dis* 2019; 77(6):ftz055.
224. Zanoni I, Granucci F. Role of CD14 in host protection against infections and in metabolism regulation. *Front Cell Infect Microbiol* 2013; 3:32.
225. Ciesielska A, Matyjek M, Kwiatkowska K. TLR4 and CD14 trafficking and its influence on LPS-induced pro-inflammatory signaling. *Cell Mol Life Sci* 2021; 78(4):1233-1261.
226. Aalto H, Takala A, Kautiainen H, Siitonen S, Repo H. Monocyte CD14 and soluble CD14 in predicting mortality of patients with severe community acquired infection. *Scand J Infect Dis* 2007; 39(6-7):596-603.
227. Tansho-Nagakawa S, Ubagai T, Kikuchi-Ueda T, Koshio O, Koshibu Y, Kikuchi H, Ono Y. Analysis of membrane antigens on neutrophils from patients with sepsis. *J Infect Chemother* 2012;18(5):646-651.
228. Wang JF, Li JB, Zhao YJ, Yi WJ, Bian JJ, Wan XJ, Zhu KM, Deng XM. Up-regulation of programmed cell death 1 ligand 1 on neutrophils may be involved in sepsis-induced immunosuppression: an animal study and a prospective case-control study. *Anesthesiology* 2015; 122(4):852-863.
229. Meghraoui-Kheddar A, Chousterman BG, Guillou N, Barone SM, Granjeaud S, Vallet H, Corneau A, Guessous K, Boissonnas A, Irish JM, Combadière C. Two new immature and dysfunctional neutrophil cell subsets define a predictive signature of sepsis useable in clinical practice. *bioRxiv* May 31, 2020; doi: 10.1101/2020.05.29.123992
230. Uhel F, Azzaoui I, Grégoire M, Pangault C, Dulong J, Tadié JM, Gacouin A, Camus C, Cynober L, Fest T, Le Tulzo Y, Roussel M, Tarte K. Early Expansion of Circulating Granulocytic Myeloid-derived Suppressor Cells Predicts Development of Nosocomial Infections in Patients with Sepsis. *Am J Respir Crit Care Med* 2017; 196(3):315-327.
231. Huang X, Venet F, Wang YL, Lepape A, Yuan Z, Chen Y, Swan R, Kherouf H,

- Monneret G, Chung CS, Ayala A. PD-1 expression by macrophages plays a pathologic role in altering microbial clearance and the innate inflammatory response to sepsis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2009; 106(15):6303-6308.
232. Shao R, Fang Y, Yu H, Zhao L, Jiang Z, Li CS. Monocyte programmed death ligand-1 expression after 3-4 days of sepsis is associated with risk stratification and mortality in septic patients: a prospective cohort study. *Crit Care* 2016; 20(1):124.
233. Pan T, Zhou T, Li L, Liu Z, Chen Y, Mao E, Li M, Qu H, Liu J. Monocyte programmed death ligand-1 expression is an early marker for predicting infectious complications in acute pancreatitis. *Crit Care* 2017; 21(1):186.
234. Avendaño-Ortiz J, Maroun-Eid C, Martín-Quirós A, Lozano-Rodríguez R, Llanos-González E, Toledano V, Gómez-Campelo P, Montalbán-Hernández K, Carballo-Cardona C, Aguirre LA, López-Collazo E. Oxygen Saturation on Admission Is a Predictive Biomarker for PD-L1 Expression on Circulating Monocytes and Impaired Immune Response in Patients With Sepsis. *Front Immunol* 2018; 9:2008.
235. Patera AC, Drewry AM, Chang K, Beiter ER, Osborne D, Hotchkiss RS. Frontline Science: Defects in immune function in patients with sepsis are associated with PD-1 or PD-L1 expression and can be restored by antibodies targeting PD-1 or PD-L1. *J Leukoc Biol.* 2016 Dec;100(6):1239-1254.
236. Shen XF, Cao K, Jiang JP, Guan WX, Du JF. Neutrophil dysregulation during sepsis: an overview and update. *J Cell Mol Med* 2017; 21(9):1687-1697.
237. Zigmond SH, Sullivan SJ. Sensory adaptation of leukocytes to chemotactic peptides. *J Cell Biol* 1979; 82(2):517-527.
238. Hoffstein ST, Friedman RS, Weissmann G. Degranulation, membrane addition, and shape change during chemotactic factor-induced aggregation of human neutrophils. *J Cell Biol* 1982; 95(1):234-241.
239. Keller HU. Motility, cell shape, and locomotion of neutrophil granulocytes. *Cell Motil* 1983; 3(1):47-60.
240. McNeil PL, Kennedy AL, Waggoner AS, Taylor DL, Murphy RF. Light-scattering changes during chemotactic stimulation of human neutrophils: kinetics followed by flow cytometry. *Cytometry* 1985; 6(1):7-12.
241. Hug S, Bernhard S, Stratmann AEP, Erber M, Wohlgemuth L, Knapp CL, Bauer JM, Vidoni L, Fauler M, Föhr KJ, Radermacher P, Hoffmann A, Huber-Lang M, Messerer

- DAC. Activation of Neutrophil Granulocytes by Platelet-Activating Factor Is Impaired During Experimental Sepsis. *Front Immunol* 2021; 12:642867.
242. Buoro S, Seghezzi M, Vavassori M, Dominoni P, Apassiti Esposito S, Manenti B, Mecca T, Marchesi G, Castellucci E, Azzarà G, Ottomano C, Lippi G. Clinical significance of cell population data (CPD) on Sysmex XN-9000 in septic patients with or without liver impairment. *Ann Transl Med* 2016; 4(21):418.
243. Marull A, Nieto X, Jimenez O, Hernando J, Tejerina P, Serrando M. NE-SFL and NE-SSC parameters as a screening for sepsis. *Clin Chim Acta* 2019; 493(Suppl. 1):S12ž
244. Celik IH, Demirel G, Aksoy HT, Erdeve O, Tuncer E, Biyikli Z, Dilmen U. Automated determination of neutrophil VCS parameters in diagnosis and treatment efficacy of neonatal sepsis. *Pediatr Res* 2012; 71(1):121-125.
245. Chaves F, Tierno B, Xu D. Quantitative determination of neutrophil VCS parameters by the Coulter automated hematology analyzer: new and reliable indicators for acute bacterial infection. *Am J Clin Pathol* 2005; 124(3):440-444.
246. Arora P, Gupta PK, Lingaiah R, Mukhopadhyay AK. Volume, conductivity, and scatter parameters of leukocytes as early markers of sepsis and treatment response. *J Lab Physicians* 2019; 11(1):29-33.
247. Ustyantseva M, Khokhlova OI, Agadzhanian VV. Innovative Technologies in the Evaluation of the Neutrophil Functional Activity in Sepsis. *Sysmex Journal International* 2019; 29(1):8-13.
248. Matsumoto H, Ogura H, Shimizu K, Ikeda M, Hirose T, Matsuura H, Kang S, Takahashi K, Tanaka T, Shimazu T. The clinical importance of a cytokine network in the acute phase of sepsis. *Sci Rep* 2018; 8(1):13995.
249. van Deventer SJH, von der Möhlen MAM, van der Poll T. Potential Importance of IL-8: A Potent Chemokine in Sepsis. *Y: J.-L. Vincent (ed.), Yearbook of Intensive Care and Emergency Medicine* 1993. © Springer-Verlag Berlin Heidelberg 1993. стр. 114-121.
250. Monneret G, Venet F. Sepsis-induced immune alterations monitoring by flow cytometry as a promising tool for individualized therapy. *Cytometry Part B* 2016; 93B:376-386
251. Schuurman AR, Reijnders TDY, Kullberg RFJ, Butler JM, van der Poll T, Wiersinga WJ. Sepsis: deriving biological meaning and clinical applications from high-

- dimensional data. *Intensive Care Med Exp* 2021; 9(1):27.
252. Mendelson AA, Lansdell C, Fox-Robichaud AE, Liaw P, Arora J, Cailhier JF, Cepinskas G, Charbonney E, Dos Santos C, Dwivedi D, Ellis CG, Fergusson D, Fiest K, Gill SE, Hendrick K, Hunniford VT, Kowalewska PM, Krewulak K, Lehmann C, Macala K, Marshall JC, Mawdsley L, McDonald B, McDonald E, Medeiros SK, Muniz VS, Osuchowski M, Presseau J, Sharma N, Sohrabipour S, Sunohara-Neilson J, Vázquez-Grande G, Veldhuizen RAW, Welsh D, Winston BW, Zarychanski R, Zhang H, Zhou J, Lalu MM; Sepsis Canada's National Preclinical Sepsis Platform. National Preclinical Sepsis Platform: developing a framework for accelerating innovation in Canadian sepsis research. *Intensive Care Med Exp* 2021; 9(1):14.
253. Lat I, Coopersmith CM, De Backer D, Coopersmith CM; Research Committee of the Surviving Sepsis Campaign. The surviving sepsis campaign: fluid resuscitation and vasopressor therapy research priorities in adult patients. *Intensive Care Med Exp* 2021; 9(1):10.