

UNIVERZITET U BEOGRADU

FARMACEUTSKI FAKULTET

Vodnik J. Tatjana

**ZNAČAJ PREOPERATIVNOG I  
POSTOPERATIVNOG ODREĐIVANJA  
BIOMARKERA SEPSE ZA DIJAGNOZU I  
PROGNOZU INTRAABDOMINALNIH  
INFEKCIJA**

Doktorska disertacija

Beograd, 2014

UNIVERSITY OF BELGRADE

FACULTY OF PHARMACY

Vodnik J. Tatjana

**THE IMPORTANCE PREOPERATIVE  
AND POSTOPERATIVE  
DETERMINATION SEPSIS  
BIOMARKERS FOR DIAGNOSIS AND  
PROGNOSIS INTRAABDOMINAL  
INFECTIONS**

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2014

Mentor doktorske disertacije: Prof. dr Nada Majkić-Singh

Univerzitet u Beogradu, Farmaceutski fakultet

Članovi komisije: Prof. dr Nada Majkić-Singh

Univerzitet u Beogradu, Farmaceutski fakultet

Prof. dr Svetlana Ignjatović

Univerzitet u Beogradu, Farmaceutski fakultet

Doc dr Nenad Ivančević

Univerzitet u Beogradu, Medicinski fakultet

Datum odbrane:



*Mom dragom tati*

**Zahvaljujem se mojoj Profesorki dr Nadi Majkić–Singh, za neizmernu podršku u mom naučnom i profesionalnom radu, posvećenom vremenu i uvek dragocenim savetima.**

**Prof. dr Svetlani Ignjatović zahvaljujem se na bezrezervnoj podršci i nesebično pruženim savetima koji su doprineli mom stručnom napredovanju.**

**Zahvaljujem se doc dr Nenadu Ivančeviću na stručnim sugestijama i smernicama pri izradi ove disertacije.**

**Veliku zahvalnost dugujem svojim koleginicama Tanji Tadić, Veri Stjepanović i Snežani Jovičić na iskrenoj podršci i spremnosti da pomognu pri izradi ove teze.**

**Posebnu zahvalnost dugujem svom prijatelju dr Goranu Kaljeviću na nesebičnoj pomoći koju mi je pružio u ovom istraživanju.**

**Zahvaljujem se mojoj Leli i Nadi za njihovu iskrenu ljudsku podršku u mojim nastojanjima da uradim ovu disertaciju.**

**Za veliku ljubav i podršku zahvalna sam svome bratu Jožetu i njegovoj divnoj porodici i mom dragom Aci koji svemu ovome daje poseban smisao.**

**Zahvalnost bez granica dugujem svojim roditeljima koji su me svojom ljubavlju i razumevanjem podsticali na uspehe tokom celog života.**

## Izvod

Značaj preoperativnog i postoperativnog određivanja biomarkera sepsa za dijagnozu i prognozu intraabdominalnih infekcija

Sepsa je klinička manifestacija generalizovane inflamatorne reakcije domaćina na infekciju. Odgovor domaćina na mikroorganizam koji u njega prodire obuhvata brzo umnožavanje sinhronizovanih signala i odgovora koji se mogu širiti iz zahvaćenog tkiva. Imunološki mehanizmi obično uspevaju da potisnu sepsu. Kada ovi mehanizmi budu nadjačani, i to onda kada mikroorganizam krene iz lokalnog žarišta u cirkulaciju, homeostaza može zatajiti i tada nastaje stanje teške sepsa. Sepsa se može razviti kao odgovor na infekciju izazvanu mikroorganizmima, kao što su Gram-pozitivne i/ili Gram-negativne bakterije koje pokreću imuno-metaboličku reakciju organizma poznatu kao "sistemski inflamatorni odgovor" tj. SIRS. Prema ACCP/SCCM, sepsa se definiše kao sistemski odgovor organizma na infekciju sa najmanje dve odlike za SIRS i potvrđenim prisustvom infektivnog agensa. Ako ovakvom stanju pridodamo i disfunkciju organa, praćenu hipoperfuzijom i hipotenzijom, govorimo o teškoj sepsi.

Odgovor organizma u sepsi podrazumeva oslobađanje mnogih biomarkera, i to je činjenica koja nas navodi da se neki od ovih biomarkera mogu koristiti kao markeri infekcije ili ozbiljnosti sepsa. U poslednjoj deceniji prokalcitonin (PCT) je potvrdio svoju ulogu kao marker sepsa, a zajedno sa drugim rutinskim parametrima (broj leukocita (WBC) i koncentracija C-reaktivnog proteina (CRP)) omogućava brzu i pravovremenu dijagnozu infektivnih stanja. U poslednjih 4–5 godina, kao pouzdan marker sepsa sve više se izdvaja i presepsin.

Cilj istraživanja bio je da se ispituju dijagnostički i prognostički značaj biomarkera sepsa kod akutnih abdominalnih stanja, kao i da se ispita korelacija između parametara. Uzorci krvi su sakupljeni u vreme prijema, preoperativno, i nakon hirurške intervencije. Određivani su sledeći parametri: presepsin, prokalcitonin (PCT), CRP, IL-6, LBP i rutinski biohemijski, hematološki i parametri hemostaze. Ispitivanje je sprovedeno u Laboratoriji Centra za medicinsku biohemiju koja primenjuje standardne metode po instrukcijama proizvođača. Rezultati su statistički analizirani. ROC analiza je korišćena da se ispita sposobnost ispitivanih markera za dijagnozu sepsa. Istraživanje je obuhvatilo dve studije.

Prva studija obuhvatila je 98 pacijenata sa abdominalnim bolom i 90 zdravih dobrovoljaca (kao kontrolna grupa). Nakon hirurškog zahvata, obrazovane su grupe na osnovu pozitivnog (sepsa grupa, N=58) tj. negativnog (SIRS grupa, N=40) mikrobiološkog nalaza o intraabdominalnoj infekciji. Koncentracije prokalcitonina (izražene kao medijana) u serumu zdravih pojedinaca, bolesnika sa dijagnozom SIRS i bolesnika sa sepsom, na prijemu, su iznosile 0,21 ng/mL, 0,45 ng/mL i 2,32 ng/mL.

Nivoi prokalcitonina su bili značajno veći kod bolesnika sa sepsom nego kod bolesnika sa dijagnozom SIRS i zdravih osoba. Kod bolesnika sa sepsom i sindromom sistemskog inflamatornog odgovora izračunate vrednosti za ROC AUC su bile sledeće: za prokalcitonin 0,740, za CRP 0,495, za antitrombin III 0,570 i za protein C 0,610. Izračunata "cutt-off" vrednost pri razlikovanju grupe bolesnika sa sepsom i SIRS za prokalcitonin iznosila je 1,1 ng/mL. Dijagnostička osetljivost pri navedenoj "cutt-off" vrednosti iznosila je 72,4%, a dijagnostička specifičnost 62,5%.

Pri ispitivanju uzeto je u razmatranje i trajanje simptoma pre prijema u bolnicu. Bilo je ukupno 63 pacijenta, od ispitanih 98, koji su imali bolove u predelu stomaka više od 24 sata. Od tih 63, 41 bolesnik je razvio sepsu (S24) dok su kod preostalih 22 pacijenta zabeleženi simptomi karakteristični za SIRS (SIRS24). U grupi pacijenata koji su imali simptome duže od 24 časa, a razvili su sepsu (N=41) koncentracije prokalcitonina su povećane, te srednja vrednost iznosi 3,30 ng/mL, dok su vrednosti prokalcitonina u grupi pacijenata sa SIRS (N=22) u okviru normalnih vrednosti i srednja vrednost je 0,35 ng/mL. Razlika između izmerenih vrednosti bila je statistički značajna. U ovom slučaju, izračunate vrednosti za ROC AUC su bile sledeće: za prokalcitonin 0,869, za CRP 0,602, za antitrombin III 0,644 i za protein C 0,706. "Cutt-off" vrednost za PCT od 1,1 ng / mL sada je imala veću osetljivost (82,9 %) i veću specifičnost (77,3 %). Pored povećanih vrednosti prokalcitonina, dobijena je i pokazana značajna razlika ( $p=0,008$ ) u vrednostima proteina C, izmerenih kod bolesnika sa sepsom (S24) u odnosu na bolesnike grupe SIRS24, dok je značajnost za antitrombin III bila granična. Koncentracije CRP su povećane u obe grupe pacijenata, ali bez statistički značajnih razlika između bolesnika sa sepsom i SIRS. Na osnovu ROC analize, u ovoj studiji, prokalcitonin je pokazao da je značajno bolji dijagnostički parametar abdominalne sepse, naročito kod bolesnika sa simptomima dužim od 24 h, od ostalih ispitivanih markera. Ispitivanjem postoperativnih vrednosti biomarkera zaključeno je da se vrednost prokalcitonina smanjuje u roku od 72 sata, što je dokaz adekvatne terapije i znak dobre prognoze. Praćenjem drugih parametara omogućeno je prepoznavanje i smanjen rizik od pojave teškog oblika sepse i septičnog šoka, a time i stepen preživljavanja.

Druga studija je obuhvatila 70 zdravih dobrovoljaca (kontrolna grupa) i 60 bolesnika (35 muškaraca i 25 žena), koji su primljeni u Urgentni centar i na prijemu su imali najmanje dva dijagnostička kriterijuma za SIRS. Svi pacijenti su operisani pod dijagnozom akutnog abdomena. Nakon hirurške intervencije, potvrde laboratorijskih ispitivanja i pozitivnog mikrobiološkog nalaza 30 pacijenata svrstano je u grupu pacijenata sa dijagnozom sepse, dok je ostalih 30 pacijenata svrstano u grupu pacijenata koji su razvili SIRS. U grupi zdravih osoba srednja izmerena vrednost za presepsin iznosila je 258,7 pg/mL. Kod bolesnika sa SIRS, preoperativno, srednja vrednost je bila 430,0 pg/mL, a kod bolesnika sa sepsom 1508,3 pg/mL. Kod preoperativnih vrednosti

bolesnika sa sepsom postoji statistički značajna razlika u odnosu na vrednosti zdravih osoba, ali i na preoperativne vrednosti bolesnika sa SIRS ( $p < 0,0001$ ). Srednje vrednosti za prokalcitonin, preoperativno, u serumu zdravih pojedinaca, bolesnika sa dijagnozom SIRS i bolesnika sa sepsom, su iznosile 0,19 ng/mL, 0,33 ng/mL i 4,47 ng/mL. Bolesnici sa sepsom imali su statistički značajno više vrednosti od ostalih ispitanika ( $p < 0,0001$ ). Kao i prethodna dva parametra, i LBP, IL-6, CRP i leukociti pokazali su statistički značajno više vrednosti u odnosu na bolesnike sa SIRS i zdrave osobe ( $p < 0,0001$ ). APACHE II skor je korišćen kao indeks ozbiljnosti stanja organizma. Utvrđeno je da su vrednosti presepsina u značajnoj korelaciji sa vrednostima APACHE II skora, tačnije sa negativnim ishodom lečenja.

Da bi se još više dokazala korisnost i dijagnostička tačnost odabranih biomarkera za stanja sepse koristili smo ROC analizu da ispitamo da li se ovim markerima može utvrditi, preoperativno, razlika između bolesnika sa potvrđenom sepsom i bolesnika sa sistemski inflamatornim odgovorom. Izračunate vrednosti za ROC AUC su bile sledeće: za presepsin 0,996, za prokalcitonin 0,912, za LBP 0,857, za IL-6 0,822, za C-reaktivni protein 0,857 i za leukocite 0,777. Dobijeni rezultati su ponovo pokazali da su presepsin i prokalcitonin najkorisniji marker za diferencijaciju bolesnika sa i bez sepse. "Cutt-off" vrednost za presepsin od 630 pg/mL, gde je osetljivost 100% i specifičnost 93%, obezbeđuje u potpunosti odvajanje bolesnika sa sepsom od onih sa sistemski inflamatornim odgovorom. Takođe, i kod prokalcitonina ostvarena je "cutt-off" vrednost od 0,494 ng/mL, pri čemu je osetljivost 87%, a specifičnost 93%. Poređenjem presepsina sa drugim markerima pokazano je da je presepsin najbolji marker jer je pokazao vrhunsku dijagnostičku i prognostičku tačnost.

Cela studija je pokazala da su utvrđeni biomarkeri sepse veoma korisni u dijagnostici sepse. Nakon sumnje u sepsu, vreme do dijagnoze i lečenja je od ključnog značaja. Presepsin i prokalcitonin potvrdili su svoju ulogu kao markeri rane dijagnoze sepse. Veza između ovih parametara i drugih rezultata biohemijskih i hematoloških ispitivanja, znakova i simptoma i rezultata mikrobioloških ispitivanja mora biti uspostavljena. Samo tako oni mogu biti izuzetno korisni u proceni uspeha lečenja i uspostavljanju kliničkih protokola za sepsu.

**Ključne reči:** infekcija; sepsa; biomarkeri; dijagnoza; prognoza.

Naučna oblast: Medicinska biohemija

Uža naučna oblast: Medicinska biohemija

UDK broj: 577.1: [616-089: 544.452.14] (043.3)

616-079: 616-022.1 (043.3)



## Abstract

The importance preoperative and postoperative determination sepsis biomarkers for diagnosis and prognosis intraabdominal infections

Sepsis is a clinical manifestation of the general inflammatory reaction of the host-body to the infection. The reaction of the host-body to the microorganism that has entered into it implies the rapid multiplication of synchronized signals and responses issuing from the infected tissue. Immunological mechanisms usually manage to suppress sepsis. However, if these mechanisms are overwhelmed, which usually happens due to the invasion of the bloodstream by the microorganisms from a focus of infection, homeostasis is likely to be broken and a severe case of sepsis occurs. Sepsis may develop as a response to the infection caused by any microorganism, by various Gram-positive and Gram-negative bacteria which trigger the immunological reaction of the organism – the *systemic inflammation response syndrome* (SIRS). According to ACCP/SCCM, sepsis can be defined as the systemic response of the organism to the infection if the presence of at least two SIRS symptoms and an infectious agent is confirmed. Should we add organ failure, hypoperfusion and hypotension to the aforementioned symptoms, we are referring to the severe case of sepsis.

The sepsis response involves the release many biomarkers, a fact that leads to the suggestion that some of these biomarkers could be used as markers of infection or sepsis severity. In the last decade Procalcitonin (PCT) has confirmed its role as marker of sepsis, and along with other routine parameters (white blood cell (WBC) count and C-reactive protein (CRP) concentration) allow rapid and timely diagnosis of infectious conditions. In the last 4–5 years, presepsin became a valuable marker in sepsis qualification.

The aim of study was to identify the diagnostic and prognostic significance sepsis biomarkers in acute abdominal conditions and also to examine the correlation between parameters. Samples of blood for measurement each markers were collected at the time of admission and after medical treatment. We determined the following parameters, markers of sepsis: presepsin, procalcitonin (PCT), CRP, IL-6, LBP and routine biochemical, hematological and hemostatic parameters. Sepsis biomarkers were determined at the central laboratory Center of Medical Biochemistry using commercial available methods following the instructions of the manufacturers. Results were statistically analyzed. ROC analyses were used to examine the capability of markers to diagnose sepsis. Research was based on two study.

First study comprised 98 patients suffering from acute abdominal conditions, and 90 healthy volunteers as the control group. After surgery has been performed, groups were formed based on positive (sepsis group, N=58) or negative (SIRS group,

N=40) microbiological evidence of IAI. The median procalcitonin concentrations in serum from healthy individuals, subjects with SIRS and subjects with sepsis, on admission, were 0,21 ng/mL, 0,45 ng/mL and 2,32 ng/mL, respectively. Procalcitonin levels were significantly higher in the sepsis group than in the SIRS and healthy groups.

ROC analysis revealed the area under the curve (AUC) for procalcitonin was 0,740, which was the highest among the measurement marker. The AUC values for PCT, CRP, antithrombin III and protein C were 0,740, 0,495, 0,570 and 0,610, respectively. The cut-off value of 1,1 ng/mL, for PCT, yielded 72,4% sensitivity and 62,5% specificity. Also, we considered the duration of symptoms before admission. There was total of 63 patients in both groups who had abdominal symptoms for more than 24 h, 41 patients of which in the sepsis group (S24 group) and 22 patients in the SIRS group (SIRS24 group). In the S24 group we observed increased PCT concentrations (mean 3,30 ng/mL), while the values in the SIRS24 group were still within the normal range (mean 0,35 ng/mL). The difference between serum PCT values in SIRS24 and S24 groups were both more significant and specific. In this case, the AUC values for PCT, CRP, antithrombin III and protein C were 0,869, 0,602, 0,644 and 0,706, respectively. The cut-off value of 1,1 ng/mL, for PCT, yielded higher sensitivity (82,9 %) and higher specificity (77,3 %). Apart from increase in PCT values, significant difference in protein C values between S24 and SIRS24 groups was observed ( $p=0,008$ ), while difference in antithrombin III values was of borderline significance. The concentrations of CRP were increased in both groups of patients. However, there were no significant differences between sepsis and SIRS group. Based on the ROC analyses, procalcitonin was a significantly better diagnostic parameter of abdominal sepsis, particularly in patients with symptoms lasting more than 24 h, than the other examined parameters, in this study. In addition, we investigated postoperative values biomarkers. We concluded that the value of PCT decreases within 72 hours, which was evidence of adequate therapy and the sign of good prognosis. Monitoring other parameters help to identify those patients at increased risk of severe sepsis/septic shock and contributing to improve their treatment and survival.

The second study included 70 healthy volunteers (control group) and 60 inpatients (35 males and 25 females), who had been brought to the Emergency Center, and who fulfilled at least two of the diagnostic criteria for SIRS on arrival. All the patients underwent surgery under the diagnosis of acute abdomen. 60 patients with acute abdominal conditions who have met the established criteria for SIRS were included in our study, 30 of which were included in the sepsis group, while 30 were included in noninfectious SIRS group. The presepsin mean values were in healthy group, SIRS and sepsis group, on admission, 258.7 pg/mL, 430.0 pg/mL and 1508.3 pg/mL, respectively. The presepsin values were significantly higher in patients with sepsis than the healthy group and in patients SIRS group, ( $p<0,0001$ ). Also, the PCT

mean values were in healthy group, SIRS and sepsis group, on admission, 0,195 ng/mL, 0,334 ng/mL and 4,479, respectively. Thus, the sepsis group had a significantly higher level of PCT than the healthy and SIRS group ( $p < 0,0001$ ). Like the previous two parameters, LBP, IL-6, CRP and WBC on admission in sepsis group showed, likewise, significantly higher values than the healthy and SIRS group ( $p < 0,0001$ ). The APACHE II score was used as an index of severity of illness. In this study presepsin values were found to be significantly correlated with the APACHE II scores, in fact with poor outcomes for patient with severe sepsis.

The ROC curve analysis was performed to compare between SIRS and sepsis groups and to better prove the usefulness of sepsis marker in the diagnosis of sepsis. The area under the curve (AUC) obtained from the ROC curve of the SIRS patients and the sepsis patients were for presepsin 0,996, PCT 0,912, LBP 0,857, IL 6 0,822, CRP 0,857 and WBC 0,777. The best results were for presepsin and PCT. The AUC values for other markers also confirm the importance of these parameters for the diagnosis of sepsis. When the cut-off value, for presepsin, was set at 630 pg/mL, clinical sensitivity was 100% and specificity was 93% which provides complete separation of patients with sepsis from patient with SIRS diagnosis. The cut-off value for PCT was 0.494 ng/mL with a sensitivity and a specificity of 87% and 93%, respectively. When we divided the patients into an infection group and a no infection group and plotted the ROC curves of each of the markers to compare presepsin with other markers, the results showed that presepsin was the best and demonstrated superior prognostic accuracy.

This study has shown that the determined biomarkers of sepsis is very useful in the diagnosis of sepsis. After the suspicion of sepsis, the timing of the diagnosis and treatment is crucial. Presepsin with procalcitonin confirmed its role as a tool for early diagnosis of sepsis. The link between these parameters and other results of the biochemical and haematological assays, signs and symptoms and the results of the microbiological tests have to be established. Moreover, they would be utilized in evaluation of the success of the treatment and for establishing a clinical protocol for sepsis.

**Keywords:** infection; sepsis; biomarkers; diagnosis; prognosis;

Academic expertise: Medical biochemistry

Major in: Medical biochemistry

UDK N<sup>o</sup>: 577.1: [616-089: 544.452.14] (043.3)

616-079: 616-022.1 (043.3)

## Skraćenice korišćene u tekstu

ARDS	Acute Respiratory Disstress Syndrome
IAI	Intraabdominalne infekcije
SBP	Spontani bakterijski peritonitis
SLE	Sistemski lupus eritematodus
MODS	Multiple organ dysfunction syndrome
MOF	Multiple organ failure
SIRS	Systemic inflammatory response syndrom
APACHE	Acute Physiology and Chronic Health Evaluation
LPS	Lipopolisaharid
TNF	Tumor nekrozis faktor
DIK	Diseminovana intravaskularna koagulacija
LBP	Lipopolisaccharid binding protein
BPI protein	Bactericidal Permeability-Increasing protein
IL-6	Interleukin 6
IL-1	Interleukin 1
PAF	Platelet-activating factor
HMWK	High Molecular Weight Kininogen
vWF	von Willebrandov faktor
TXA2	Tromboksan A2
TF	Tkivni faktor
AT III	Antitrombin III
PLG	Plazminogen
APC	Aktivirani protein C
PAI-1	Plazminogen aktivator inhibitor
TPA	Tkivni plazminogen aktivator
PCT	Prokalcitonin
CRP	C-reaktivni protein
sCD14-ST	Presepsin
WBC	White blood cell (Leukociti)

# SADRŽAJ

1. UVOD.....	1
1.1. Istorijat sepse.....	1
1.2. Uvod u infektivne bolesti: uzajamno delovanje domaćina i uzročnika patogena.....	5
1.3. Intraabdominalne infekcije (IAI).....	6
1.3.1. Bol u stomaku (abdominalni bol) i peritonitis.....	6
1.3.2. Infekcija u abdomenu.....	8
1.4. Sepsa .....	12
1.4.1. Definicija, oblici i pokazatelji.....	12
1.4.2. Etiopatogeneza septičkog šoka i sindroma multiorganske disfunkcije (MODS).....	17
1.4.2.1. Septikemija i šok.....	18
1.4.2.2. Sindrom septičnog šoka i MODS.....	20
1.4.3. APACHE II skor.....	22
1.5. Mikrobiološki uzročnici intraabdominalnih infekcija.....	27
1.5.1. Gram pozitivne infekcije.....	30
1.5.2. Gram negativne infekcije.....	32
1.6. Endotoksinska stimulacija inflamatornog odgovora.....	35
1.6.1. Uloga zapaljenskih medijatora.....	39
1.6.1.1. Proteaze plazme.....	40
1.6.1.2. Sistem koagulacije.....	43
1.6.1.3. Metaboliti arahidonske kiseline.....	47
1.6.1.4. Lizosomalni konstituenti.....	48
1.6.1.5. Ostali zapaljenski medijatori.....	49
1.7. Klinička slika i lečenje sepse.....	52
1.7.1. Principi antibiotske terapije.....	55
1.8. Biomarkeri sepse.....	57
1.8.1. Prokalcitonin.....	57
1.8.2. Lipolisaharid vezujući protein ( <i>LBP</i> ).....	61

1.8.3. Interleukin 6.....	63
1.8.4. C-reaktivni protein.....	64
1.8.5. Markeri sistema hemostaze.....	65
1.8.6. Presepsin (sCD14-ST).....	70
2. CILJ RADA.....	74
3. MATERIJALI I METODE.....	76
3.1. Komercijalni reagensi.....	76
3.2. Pribor i aparati.....	79
3.2.1. Pribor.....	79
3.2.2. Aparati.....	79
3.3. MATERIJAL.....	80
3.4. METODE.....	85
3.4.1. Određivanje koncentracije presepsina.....	85
3.4.2. Određivanje prokalcitonina (PCT).....	86
3.4.3. Određivanje LBP ( <i>Lipopolysaccharide binding protein</i> ).....	89
3.4.4. Određivanje interleukina 6 (IL-6).....	90
3.4.5. Određivanje koncentracije C-reaktivnog proteina (CRP).....	91
3.4.6. Određivanje aktivnosti antitrombina III.....	92
3.4.7. Određivanje aktivnosti proteina C.....	93
3.4.8. Određivanje aktivnosti plazminogena.....	94
3.4.9. Određivanje koncentracije D-dimera.....	94
3.4.10. Određivanje hematoloških parametara na brojaču.....	95
3.4.11. Određivanje koncentracije ukupnih proteina.....	96
3.4.12. Određivanje koncentracije albumina.....	97
3.4.13. Određivanje koncentracije kalijuma.....	98
3.4.14. Određivanje koncentracije neorganskog fosfora.....	99
3.4.15. Mikrobiološka ispitivanja.....	100
3.5. ANALIZA PODATAKA.....	101
4. REZULTATI.....	102
4.1. Značaj preoperativnog i postoperativnog određivanja biomarkera sepse.....	102

4.2. Klinička vrednost biomarkera sepse u prvoj studiji.....	103
4.2.1. Biomarkeri sepse preoperativno i postoperativno kod ispitivanih osoba.....	104
4.2.2. Korelacija određivanih parametara u prvoj studiji.....	120
4.2.3. Određivanje parametara sepse kod pacijenata sa simptomima dužim od 24 sata.....	125
4.2.4. Dijagnostička vrednost određivanih parametara kao markera sepse u IAI.....	126
4.3. Klinička vrednost određivanih parametara u drugoj studiji.....	129
4.3.1. Preoperativne vrednosti biomarkera sepse.....	129
4.3.2. Postoperativne vrednosti biomarkera sepse.....	138
4.3.3. Korelacija određivanih parametara u drugoj studiji.....	145
4.3.4. Presepsin u različitim patofiziološkim stanjima.....	151
4.3.5. APACHE II u grupi pacijenata sa sepsom.....	152
4.3.6. Dijagnostička vrednost određivanih parametara kao markera sepse u IAI.....	154
5. DISKUSIJA.....	159
5.1. Prokalcitonin i drugi markeri teške sistemske bakterijske infekcije kod ispitanika prve studije.....	160
5.1.1. Dijagnostički značaj biomarkera sepse kod pacijenata sa simptomima abdominalnog bola dužim od 24 sata.....	166
5.1.2. Dijagnostička vrednost određivanih parametara kao biomarkera sepse u IAI kod ispitanika prve studije.....	167
5.2. Presepsin, prokalcitonin i drugi markeri teške sistemske bakterijske infekcije kod ispitanika druge studije.....	169
5.2.1. Dijagnostička vrednost presepsina, prokalcitonina i određivanih parametara kao biomarkera sepse u IAI kod ispitanika druge studije.....	181
6. ZAKLJUČCI.....	185
7. LITERATURA.....	190

# UVOD

## 1.1. Istorijat sepse

Sepse je dinamičan, heterogen i veoma težak klinički sindrom uzrokovan sistemskim zapaljenjskim odgovorom domaćina na infekciju, čije su komplikacije jedan od vodećih uzročnika morbiditeta i mortaliteta u svetu (1, 2).

Još od doba Hipokrata koji je 400. godine pre nove ere prvi opisao sepsu, imunopatofiziologija ovog kompleksnog oboljenja ostaje tema koja je predmet mnogih istraživanja. U prošlosti, kada je medicinska higijena bila nepoznata, infekcija rana je bila uobičajena komplikacija nakon operacije. Kao uzrok prepoznato je truljenje rane tzv. sepsa. Iako je termin sepsa usko povezan sa savremenom intenzivnom negom medicinski koncept je dosta stariji. Reč "sepsa" je prvi put opisana od strane Hipokrata (oko 460–370 p.n.e.), a potiče od grčke reči "sipsi" (σήψη) što u prevodu znači "truliti". Ibn Sina (979–1037 p.n.e.) je primetio podudarnost između "truljenja" krvi (septikemije) i groznice. Ovaj koncept sepse koji je uveden u antičko doba korišćen je sve do 19. veka. Iz tog perioda je poznato samo nekoliko primera patofizioloških istraživanja. Herrmann Boerhave (1668–1738), lekar u Leidenu, smatrao je da su toksične materije iz vazduha bile uzrok sepse. Početkom 19. veka, hemičar Justus von Liebig proširio je teoriju tvrdeći da je kontakt između rane i kiseonika bio odgovoran za razvoj sepse.



Ignac Zemelvajs (1818–1865)

Ignac Zemelvajs (1818–1865) bio je prvi istraživač koji je razvio savremeni pogled na sepsu. On je bio akušer u Opštoj bolnici u Beču u vreme kada je smrt žene porodilje od



porodiljske groznice bila česta komplikacija. Njegovo odeljenje je imalo naročito visoku stopu smrtnosti od oko 18%. Zemelvajns je otkrio da su vrlo često studenti pregledali porodilje neposredno nakon časova patologije. Higijenske mere kao što je pranje ruku ili upotreba hirurških rukavica tada nije bila uobičajena praksa. Zemelvajns odbija ideju da su porodiljske groznice izazvane, kako se tada nazivalo, "raspadanjem životinjske materije koja je ušla u krvni sistem". U stvari, on je uspeo da snizi smrtnost na oko 2,5% uvođenjem postupka pranja ruku sa hlorisanim krečnim rastvorom pre svakog ginekološkog pregleda. Međutim, i pored kliničkog uspeha, higijenske mere nisu prihvaćene, a kolege su ga vređale, primoravajući ga da napusti grad. Tek 1863. godine, znači više od 15 godina nakon njegovih nalaza, uspeo je da objavi svoj rad pod nazivom "Etiologija, terminus i profilaksa porodiljske groznice" (*Die Aetiologie, Der Begriff und die Profilaksa des Kindbettfiebers*). Neuspeh da se postigne profesionalni ugled i protivljenja medicinskih ustanova uzrok je njegovih psihijatrijskih problema. Zemelvajns je na kraju završio u duševnoj bolnici, gde je umro od infekcije, verovatno kao posledica nasilja koje je tamo doživeo. Umro je od bolesti kojoj je posvetio svoj život i borbu.



Luj Paster (1822–1895)

Francuski hemičar Luj Paster (1822–1895) otkrio je jednoćelijske sićušne organizme koji izazivaju "truljenje" tj. sepsu. On ih je nazvao "bakterija" ili "mikrobi" i ispravno izveo zaključak da ovi organizmi tj. mikrobi mogu biti uzrok bolesti. On je takođe došao do značajnog otkrića da se bakterija u tečnosti može "ubiti" zagrevanjem. To je značilo da tečnost može da se steriliše.



Džozef Lister (1827–1912)

Džozef Lister (1827–1912) je radio kao hirurg u Glazgovu u Kraljevskoj ambulanti. U vreme kada je postao načelnik odeljenja hirurgije, oko 50% pacijenata sa amputacijama umirali su od sepse. Lister je uradio korelaciju između Zemelvajsovih zapažanja, Pasterovih otkrića i umiranja u svojoj bolnici. Za to vreme savremenim naučnim studijama, prvo na životinjama, pa sa ljudima, on je ispitao efekte dezinfekcije na koži kao i instrumenata sa karbolnom kiselinom (tzv. antiseptik metoda). Na taj način, Lister je uspeo da drastično smanji smrtnost posle amputacije. Za razliku od Zemelvajsa, Lister je uspeo da ubedi svoje kolege o opravdanosti njegove antiseptik metoda. Godine 1887, Robert Koh (1843–1910) je uveo sterilizaciju parom i tako doprineo Listerovoj tehnici.



Hermann Lennhartz

Lekar H. Lennhartz, koji je radio kao medicinski direktor u Eppendorf bolnici, u Nemačkoj, inicirao je promenu u razumevanju sepse iz drevnog koncepta "truljenja" do modernog pogleda na bakterijske bolesti. Njegov učenik Hugo Schottmuller (1867–1936) je 1914. otvorio put za modernu definiciju sepse: "Sepsa je prisutna ukoliko fokus koji se razvio iz patogene bakterije, stalno ili povremeno, upada u krvotok na takav način da to izaziva subjektivne i objektivne simptome". Tako je, po prvi put, izvor

infekcije kao uzrok sepse došao u fokus istraživanja. Schottmuller dalje objašnjava: "Terapija ne bi trebalo da bude usmerena protiv bakterija u krvi, nego protiv oslobođenih bakterijskih toksina...". Sa ovim razmišljanjem je bio i ispred svog vremena.

Iako su antiseptičke procedure značile ogroman medicinski napredak, ubrzo je postalo jasno da određen broj obolelih i dalje razvija sepsu. U ovom vremenu pre antibiotika, stopa smrtnosti je bila veoma visoka. Ovi pacijenti često su pokazivali veoma nizak krvni pritisak. Ovo stanje se nazivalo septički šok. Tek sa uvođenjem antibiotika posle Drugog svetskog rata stopa smrtnosti od sepse se počela smanjivati. Sa tehnološkim napretkom, intenzivna nega počela je da se razvija i septični pacijenti uskoro su postali glavni pacijenti u jedinicama intenzivne nege.



Dr D.G. Asbough

1967. godine, Asbough i kolege primetili su ozbiljnu bolest pluća koja se razvila kod bolesnika na intenzivnoj nezi sa teškim kratkim dahom, gubitkom funkcije pluća i difuznom alveolarnom infiltracijom. Ova bolest se zove respiratorni distress sindrom kod odraslih (ARDS) i bio je često fatalna komplikacija. Ubrzo je shvaćeno da su posebno septični bolesnici patili od ove komplikacije. Osim toga, pokazalo se da je razvoj ARDS rezultat zapaljenske reakcije i na taj način izazvan od supstanci proizvedenih u bolesnom telu. 1980. godine je otkriveno da inflamatorna reakcija nije bila samo u plućima već u celom telu. Otuda je postalo jasno da nastanak sepse nije samo iz infektivnog fokusa, nego da je odgovor domaćina protiv infekcije ključan u nastanku sepse. Rodžer C. Bone (1941–1997) ponudio je prvu definiciju sepse 1989. godine koja je jednim svojim delom na snazi i danas: "Sepsa se definiše kao invazija mikroorganizama i/ili njihovih toksina u krvotok, kao i sve reakcije organizma protiv ove invazije" (3).

## **1.2. Uvod u infekcijske bolesti: uzajamno delovanje domaćina i uzročnika patogena**

Uprkos decenijama evidentnog napretka u lečenju i sprečavanju, infekcijske bolesti su i dalje na vrhu i glavni uzrok smrti i bolesti, čime pogoršavaju uslove života miliona ljudi širom sveta. Infekcija zahvata brojne organske sisteme i kao takva je izazov dijagnostičkoj veštini lekara i medicini uopšte. Otkrićem antimikrobnih lekova smatralo se da su infekcijske bolesti postale istorija u medicini. Polovinom prošlog veka došlo je do razvoja više stotina lekova koji su snažni, sigurni i delotvorni, i to ne samo protiv bakterija nego i protiv virusa, gljivica i parazita, znači protiv svih poznatih uzročnika infekcije. U decenijama koje su usledile, ipak došlo se do saznanja da se sa razvojem antimikrobnih sredstava razvijala i sposobnost mikroorganizama da izbegnu utvrđene antibakterijske mehanizme stvarajući nove vlastite u cilju svog preživljavanja. Ipak, danas se otkriva uloga infekcijskih agenasa i u etiologiji bolesti koje su nekada smatrane neinfekcijskim. Tako postoji mogućnost da su i druge bolesti nepoznatog uzroka, kao npr. sarkoidoza, upalna bolest creva i sl., zapravo u osnovi infekcijske.

Za nastanak nekog infekcijskog procesa neophodan je kontakt domaćina i uzročnika-patogena. Takođe, i mnogi specifični faktori utiču na verovatnoću oboljevanja od infekcijske bolesti. Starost, prethodne bolesti i vakcinacija, stanje uhranjenosti, trudnoća, sveopšte i emocionalno stanje, mogu uticati na rizik od infekcije nakon izlaganja potencijalnom patogenu. Važnost pojedinih odbrambenih mehanizama domaćina, bilo specifičnih ili nespecifičnih, postaje očigledna tek kada nedostaju. Neki medicinski postupci povećavaju rizik od infekcije i to na nekoliko načina. Najpre, dodir sa patogenom tokom bolničkog lečenja, oštećenjem kože (intravenskim kateterima ili hirurškim instrumentima) ili površine sluzokože (endotrahealnim tubusima i urinarnim kateterima), zatim uvođenjem stranih tela, oštećenjem prirodne flore antibioticima i terapijom imunosupresivnim lekovima. Infekcija obuhvata vrlo složene interakcije domaćina i patogenog uzročnika. U većini slučajeva potrebno je nekoliko faza patogenog procesa za nastanak infekcije jer domaćin poseduje niz složenih mehanizama za sprečavanje infekcije. Prvi kontakt je najčešće u zoni kože i sluzokože gde postoji vrlo složen mehanizam odbrane organizma. Mehaničke barijere podrazumevaju čvrsti rožnati epitel i proizvode lučenja žlezda u koži. Hemijske

prepreke kao što je kisela sredina u želucu i mokraćnoj bešici, predstavljaju nepogodnu okolinu za većinu mikroorganizama. Takođe, i normalna mikroflora sastavljena od nepatogena, naseljava sluzokožu i otežava prilaz patogena usled kompeticije za resurse istog okruženja. Oštećenja kože koja nastaju kao posledica ugriza ili uboda, opekotine, ogrebotine, hirurške rane dopuštaju ulaz patogenih mikroorganizama. Gastrointestinalni trakt može postati nedelotvorna prepreka ako se želudačna kiselost uništi hirurškim zahvatom ili antacidnim lečenjem ili ako je sluzokoža erodirana tumorom ili citotoksičnom terapijom, naročito kod neutropeničnih bolesnika. Opstrukcija digestivnog ili žučnog sistema, tumorom ili kamenom, dopušta endogenoj ili unetoj bakterijskoj flori da proдре u zahvaćeno tkivo, a često i u krvotok. U tom smislu, svako mesto u organizmu može postati mesto infekcije ako devitalizirano tkivo ili strano telo zauzmu bakterije ili se inficiraju direktnim prodorom (4).

### **1.3. Intraabdominalne infekcije (IAI)**

#### **1.3.1. Bol u stomaku (abdominalni bol) i peritonitis**

Ispravno tumačenje akutnog bola u stomaku jedan je od najvećih izazova za svakog dijagnostičara. Retke su kliničke okolnosti koje zahtevaju toliko iskustva i znanja kao akutna abdominalna bol, gde se najteže posledice mogu predvideti pomoću suptilnih simptoma i znakova. Dijagnoza "akutnog abdomena" koja se tako često čuje nije baš najprihvatljivija jer i najočitiji "akutni abdomen" možda ne treba lečiti hirurškim putem, dok nekada i najblaže boli mogu ukazati na razvoj stanja koji zahteva operativni zahvat.

Upala peritoneuma (potrbušnice), serozne membrane koja oblaže abdominalnu šupljinu i unutrašnje organe naziva se peritonitis. Upalni nadražaj parijetalne potrbušnice izaziva jak i postojan bol baš u nivou upalnog područja. Ovakva tačna lokalizacija moguća je jer podražaj prenose somatski nervi koji su locirani u potrbušnici. Bol peritonealne upale uvek se pojačava pritiskom ili promenom pritiska peritoneuma, bila ona izazvana palpiranjem, kašljanjem ili kivanjem. Zato bolesnik sa peritonitisom leži mirno i nastoji da izbegne kretanje za razliku od bolesnika sa kolikama koji se stalno prevrće. Kod peritonealnog nadražaja javlja se i tonični

refleksni spazam trbušne muskulature čiji intenzitet zavisi od mesta upalnog procesa, od brzine kojom se razvija i nervnog sistema u tom području. Kao što je slučaj i sa bolom, tako je i mišićni spazam manji ako se proces razvija polako. Bol i mišićni spazam pojačavaju i svako pomicanje, duže stajanje ili pritisak (4). Infekcije u trbušnoj duplji nastaju većinom kao posledica razaranja normalnih anatomskih granica. Ovakva oštećenja mogu nastati kada prsne crvuljak (apendicitis) ili divertikulum, zatim kada je zid creva oslabljen ishemijom, tumorom ili upalom ili u slučaju inflamatornih stanja kao što je npr. pankreatitis ili upala karlice kada enzimi tj. mikroorganizmi prelaze u trbušnu šupljinu (5).

Peritonealna šupljina je velika, podeljena na gornju i donju poprečnim mezokolonom. Pankreas, dvanaestopalačno, uzlazno i silazno debelo crevo smešteni su u prednjem retroperitonealnom prostoru, dok su u zadnjem bubrezi, mokraćovodi i nadbubrežne žlezde. Ostali organi, a to su jetra, želudac, jednjak, slezina, jejunum, ileum, poprečno i sigmoidno debelo crevo, slepo crevo i crvuljak nalaze se unutar same trbušne šupljine. Normalno je trbušna duplja prekrivena seroznom opnom, a u njoj se nalazi manja količina tečnosti dovoljna za pomeranje organa. Tečnost je serozna i sadrži proteine, najviše albumine, ali do 30 g/L, i manju količinu leukocita (manje od 300/ $\mu$ L). U slučaju infekcije ovaj odnos se menja i u šupljinama se nakuplja tečnost i gnoj.

Peritonitis može biti primarni (bez vidljivog inicijalnog događaja) ili sekundarni, koje odlikuje različita klinička slika i prisustvo različitih mikroorganizama. Spontani bakterijski peritonitis (SBP) najčešće se razvija kod bolesnika sa cirozom jetre koji imaju ascit. Naime, dolazi do hematogenog širenja mikroorganizama kao posledica bolesne jetre i poremećene portalne cirkulacije. Klinička slika SBP razlikuje se od kliničke slike sekundarnog peritonitisa. Karakteristična mikrobiološka slika SBP je da se uglavnom nalazi samo jedna vrsta mikroorganizama u uzorku peritonealne tečnosti i da su anerobi vrlo retki. Suprotno SBP, kod sekundarnog peritonitisa pravilo je mešana flora koja uključuje i anaerobe. Sekundarni peritonitis nastaje kada bakterije ispune i kontaminiraju peritoneum i to kao posledica njihovog ili oslobađanja iz nekog procesa u samom abdomenu. Nastupajuća bol se pojačava širenjem infekcije na peritonealnu šupljinu, naročito kada je zahvaćen obilno inerviran parijetalni peritoneum. Većina sekundarnih peritonitisa zahteva hitni operativni zahvat i lečenje antibioticima. U

nelečenom peritonitisu često je stvaranje apscesa. Definiše se kao infekcija koja sadrži žive mikroorganizme i polimorfonuklearne ćelije unutar fibrozne opne.

Peritonitis je ograničeni ili generalizovani upalni proces peritoneuma koji se može javiti u akutnom ili hroničnom obliku. U akutnom obliku motorika creva je smanjena, a crevni lumen postaje proširen gasovima i tečnošću. Nakupljanje tečnosti je rezultat poremećaja reapsorpcije i apsorpcije, kako u tankom crevu tako i u kolonu. Usled nakupljanja tečnosti u peritonealnoj šupljini, ali i smanjenog oralnog unosa može doći do pada i volumena plazme i poremećaj bubrežne i srčane funkcije. Bakterijski peritonitis uzrokovan je prodorom bakterija u trbušnu šupljinu nakon perforacije organa iz digestivnog trakta ili spoljašnje penetrantne povrede. Najčešći uzroci su apendicitis, perforacija udružena sa divertikulitisom, peptički ulkus, gangrenozni jednjak, gangrenozna opstrukcija tankog creva i sl. Izvor peritonitisa može biti svaka lezija koja dovodi do širenja bakterija. Hemijski peritonitis nastaje kao posledica izlivanja enzima pankreasa, želudačne kiseline ili žuči. Sterilni peritonitis može se javiti kod bolesnika sa SLE (sistemski lupus eritematosus), porfirijom i naslednom mediteranskom groznicom (4).

### **1.3.2. Infekcija u abdomenu**

Digestivni trakt predstavlja ogroman prostor za život i razvoj različitih vrsta mikroorganizma tj. bakterija. Razlikujemo više stotina različitih bakterijskih vrsta od kojih je samo mali broj patogen za čoveka. Njihovo širenje i zaraženost prostora u kojima se normalno ne nalaze zavise od faktora koji su ili uslovljeni biološkim osobinama bakterija ili su posledica delovanja patološkog procesa. Nakon perforacije ili invazije bakterija u peritonealnu duplju, ipak određene vrste ne opstaju jer peritonealni prostor nije prirodna sredina za njihov rast i razvoj. Tako samo mali broj patogena preživljava nove uslove jer se prelaskom u intraperitonealni prostor bakterije suočavaju sa faktorima nespecifične odbrane organizma pa veći deo biva neutralisan. Ovaj proces ipak dovodi do štetne selekcije otpornih patogenih bakterija koje bez prirodne konkurencije nastavljaju svoje nekontrolisano razmnožavanje. Tako nastaje i povećana virulentnost sojeva i posledično razvoj zapaljenskog procesa. Karakter intarabdominalnih zapaljenskih procesa uslovljen je vrstom uzročnika, njegovom

virulentnošću i brojem što važi samo za patogene bakterije. Vrlo je važno i da li postoji patološki sinergizam bakterija, jer u najvećem broju slučajeva teških peritonitisa radi se o mešovitim aerobno-anaerobim infekcijama. Istraživanja su potvrdila postojanje bakterijskog sinergizma izraženog kroz bifazni tok inflamatornog procesa koji podrazumeva septičnu i apcesnu fazu (6). Ove faze su direktna posledica patološkog delovanja različitih bakterija. Septična faza nastaje nakon izlivanja sadržaja u peritonealnu duplju kao posledica toksičnog delovanja gram negativnih aerobnih bakterija koje se vrlo brzo razmnožavaju. Druga, apcesna faza odlikuje se sporijim rastom anaerobne flore. Kritični nivo toksemije je trenutak kada se ove dve faze poklope i tada je procenat mortaliteta najveći. Ovakav aerobno-anaerobni model je osnovni etiološki faktor difuznih purulentnih peritonitisa. U stanjima gde su pored anaerobnih bakterija prisutni i gram pozitivni aerobi (enterokok npr.) izostaje septična faza jer nema izvora endotoksina, ali nastaje apcesna faza bolesti jer je enterokok kao aerobna bakterija omogućio nesmetan rast anaerobne flore. Kod razvoja monobakterijskih peritonitisa jasno se uočavaju patogeni efekti svake bakterijske vrste, kao kod uzročnika *E. Coli*, gde ne dolazi do stvaranja apscesa, ali je prisutna slika septičnog oboljenja usled endotoksemije.

Većina intraabdominalnih infekcija (IAI) spada u grupu hirurških infekcija u užem smislu. Hirurške infekcije predstavljaju patološke procese koji se hirurški leče, uzrokuju ih bakterije, podrazumevaju hiruršku intervenciju i naravno antibiotsku terapiju. Između mnogobrojnih vrsta IAI postoje velike razlike kako u etiologiji tako i u patogenezi s tim da je osnovna zajednička komponenta bakterijski infekcijski proces. Uvidom u različite oblike intraabdominalnih infekcija, pre svega u njihov nastanak i kasniji razvoj, za većinu intraabdominalnih infekcija se kaže da se odvijaju u tri faze. Svaka IAI započinje u nekom organu trbušne duplje ili peritoneumu. Kada je infekcija primarno u parenhimnom organu, prva faza je u samom organu, odakle se vrši disperzija infekcijskog procesa bilo u cirkulaciju ili u slobodnu peritonealnu duplju. Druga faza podrazumeva širenje infekcije u peritoneum tj. posledičan razvoj peritonitisa kao generalizovanog oblika zapaljenja. Sledeći korak u razvoju IAI je prodor bakterija u opštu cirkulaciju i pojava sepse. Sepsa može progredirati u septični šok ili sindrom multipnih organskih oštećenja (MODS). Naravno, da se IAI može



zaustaviti i u nekoj od ovih faza, a da li će doći do lokalizacije infekcijskog procesa zavisi pre svega od odbrambene sposobnosti samog organizma (5, 7, 8).

Nezavisno od mehanizma nastanka peritonitisa dalji tok je zajednički za sve. Primarna reakcija peritoneuma počinje alteracijom mezotelnih ćelija koje u zoni oštećenja oslobađaju velike količine zapaljenskih medijatora u intersticijalni prostor. U izlivenom sadržaju dolazi do razmnožavanja patogenih mikroorganizama čija se virulencija izrazito povećava. Sa ovim izrazitim povećanjem dolazi i do povećanog stvaranja toksina. Ukoliko je broj patogenih mikroorganizama veći to je i stepen oštećenja znatniji jer se povećava i broj različitih toksina pa su veći i jači mehanizmi koji direktno oštećuju ćelije. Nezavisno od prirode toksina, toksični efekat se najpre ispoljava razgradnjom mezotelnih ćelija i degranulacijom mastocita bogatih vazoaktivnom supstancom, heparinom. Ujedno sa ovim procesom aktivira se i sistem komplementa sa indukcijom fagocita i njihovim prelaskom u zonu zapaljenja. Vazoaktivne supstance i toksini, lokalno, povećavaju permeabilnost krvnih sudova, dolazi do njihove paralize sa dilatacijom, stazom i eksudacijom tečnosti. Pozitivna hemotaksa uslovljava i prelaz polimorfonuklearnih leukocita u zonu zapaljenja i aktivaciju lokalnih fagocita, što će usloviti fagocitozu bakterija čime organizam pokreće odbrambene mehanizme. Ako bi se upalni proces zaustavio na ovom stadijumu imao bi odlike seroznog peritonitisa (*Peritonitis serosa*). Ipak, ako je odbrambeni potencijal organizma nedovoljan, upalni proces se nastavlja, te se nakon daljih promena na krvnim sudovima oslobađa fibrinogen koji prelazi u zonu zapaljenja ili slobodnu peritonealnu duplju. Pod dejstvom inflamatornog eksudata na fibrinogen, on se pretvara u fibrin, a peritonitis poprima odlike serofibroznog zapaljenja. Stvaraju se obilne fibrinske naslage, upalni proces postaje fibrozni tj. nastaje *Peritonitis fibrinosa*. Uparedo sa prelaskom fibrinogena iz krvnih sudova, leukociti se postavljaju periferno u krvnim sudovima i počinju masovnu migraciju u peritonealnu duplju, što dovodi do stvaranja gnoja te peritonitis postaje gnojni tj. *Peritonitis purulenta*. Gnoj se sastoji od raspadnutih delova leukocita, bakterija koje dominiraju i zapaljenske tečnosti. Ulaskom masnih granula u protoplazmu ćelije dolazi do degranulacije jedra i stvaranja hromatinskih sekvenci. Količina i sastav masnih kapljica određuje boju i konzistenciju gnoja tako da je on vrlo često žut ili žuto zelen. Izrazito zelen gnoj nastaje ako je uzročnik infekcije *Pseudomonas*, žut kod stafilokoka, a prljavo siv kod streptokoka.

Prelaz eritrocita u zapaljenski eksudat dovodi do tamnog prebojavanja koji u terminalnoj fazi bolesti postaje crn ili tamno braon boje i u njemu se mogu naći prebojeni sadržaji sulfohemoglobina i verdoglobina. Kada u krajnjoj fazi nastupi prevalencija anaerobne flore dolazi i do potpune putrefakcije (truljenja) peritonealnog sadržaja.

Nezavisno od vrste i stepena inflamatornog procesa, u abdomenu, moguća je dalja propagacija infekcijskog procesa. Limfni otvori peritoneuma resorbuju velike količine eksudata, ali i bakterijskih ćelija. Ako makrofage ne fagocituju prodrle bakterije postoji mogućnost njihovog prelaska u opštu cirkulaciju te se peritonitis komplikuje sepsom. Sepsa tj. septični šok ne moraju biti praćeni obaveznim prodorom bakterija u krvotok, jer se tu pojavljuje još jedan važan mehanizam toksičnog dejstva bakterija, a to je resorpcija endotoksina gram negativnih aerobnih bakterija. Direktnim oslobađanjem endotoksina dolazi do eksplozije metabolizma u ćelijama kao i sporednih metaboličkih puteva što sve dovodi do teške intoksikacije. Najjači toksični efekat se ispoljava na krvnim sudovima, miokardu i imunološkom sistemu, a biološke posledice su ishemično-hipoksična i toksično-metabolička oštećenja različitih ćelija koje progresivno vode njihovom umiranju. Aktivacija imunoloških sistema je osnovni pokretački mehanizam za nastanak inflamatorne reakcije kao posledica oslobađanja velikih količina endotoksina. Istovremeno se u abdomenu stvara eksudat čime se gubi intersticijalna tečnost, a organizam prelazi u stanje cirkulatornog kolapsa i šoka. Kao posledica nedovoljne oksigenacije krvi u plućima, nedovoljnog snabdevanja periferije kao i promenjenog metabolizma kiseonika u samim ćelijama nastaje hipoksija. Toksični efekti na miokardu su izraziti i manifestuju se tahikardijom, hipotenzijom, smanjenjem sistolnog volumena i povećanim perifernim otporom. Hiperdinamsku fazu šoka smenjuje hipodinamska faza kada su promene na organima ireverzibilne. Toksični efekat na plućima dovodi do stvaranja arteriovenskih šantova, povećanog plućnog otpora, destrukcije alveocita i razvoja šoknih pluća ili *ARDS*-a (engl. *Acute Respiratory Distress Syndrome*) (10). Redukcija perfuzije uz postojeću hipovolemiju i hipoksemiju dovodi do direktne nekroze tubulocita i posledično do porasta uree, smanjenje klirensa kreatinina i razvoja renalne insuficijencije. Endokrini sistem izaziva mikrovaskularne efekte. Septično stanje predstavlja stres za organizam što uslovljava pojačanu sekreciju ACTH-a, kao regulatornog hormona, i posledično stvaranje endorfina. Oni primarno

otklanjanju bol i anksiozno stanje, ali dovode i do vazodilatacije i povećanja permeabiliteta kapilara. Teška intoksikacija i lokalna hipoksija u digestivnom traktu kao i bujanje bakterija uzročnika u crevima i crevna distenzija, dovode do prestanka perfuzije i povećava intraabdominalni pritisak, koji još više pogoršava stanje perfuzije u bubrezima i plućima. Postoji i mikroembolizacija i ona je ta koja zatvara ovaj začarani krug, jer prestankom cirkulacije na periferiji organizam prelazi u stanje ireverzibilnog šoka (4, 5, 7–9).

## **1.4. Sepsa**

### **1.4.1 Definicija, oblici i pokazatelji**

U patogenezi sepse učestvuje nekoliko veoma značajnih mehanizama koji su sami po sebi dovoljni da dovedu do kliničke manifestacije oboljenja. Ova činjenica samo doprinosi saznanju da definicija sepse nije jednostavna. Potreba za sistematizacijom patoloških procesa direktna je posledica raznovrsnosti i složenosti patofizioloških mehanizama i dostignuća u toj oblasti.

Na konferenciji *American Society of Chest Physicians and Society of Critical Care Medicine* iz 1991. godine (11) postavljene su prve precizne definicije sledećih pojmova:

- Infekcija označava prisustvo mikroorganizama u inače sterilnim tkivima, sa ili bez zapaljenske reakcije
- Bakterijemija označava prolazno prisustvo različitih bakterija u krvi, koje ne mora uvek da pređe u SIRS ili sepsu
- Sistemski inflamatorni odgovor (engl. *SIRS – Systemic inflammatory response syndrom*) je sistemski i klinički inflamatorni odgovor, na različite uzročnike infektivne i neinfektivne prirode
- Sepsa je sistemski odgovor na infekciju gde uvek postoji infekcijsko žarište, dakle sepsa je SIRS uzrokovan infekcijom

- Teška sepsa je stadijum u razvoju sepse koga karakterišu organske disfunkcije, slaba perfuzija tkiva sa pojavom laktatne acidoze, oligurije, poremećenog mentalnog statusa i hipotenzije
- Sepsom indukovana hipotenzija je stanje gde je sistolni pritisak niži od 90 mm Hg (ili za 40 mmHg niži od donje granice sistolnog pritiska za tog bolesnika), a nema drugih kardioloških uzroka hipotenziji
- Septični šok se opisuje kao teška sepsa sa perzistirajućom hipotenzijom, rezistentnom na fluido terapiju, uz poremećaj hipoperfuzije tkiva i organsku disfunkciju
- Multiorganska disfunkcija (engl. *MODS – Multiple organ dysfunction syndrome*) ili sindrom multipnih organskih oštećenja (engl. *MOF - Multiple organ failure*) podrazumeva oštećenje više organa i organskih sistema koji se bez adekvatnog lečenja ne mogu oporaviti tj. kada se homeostaza ne može održati bez adekvatne pomoći i često je posledica imunoloških procesa u toku sepse i SIRS-a i predstavlja njihov kraj.

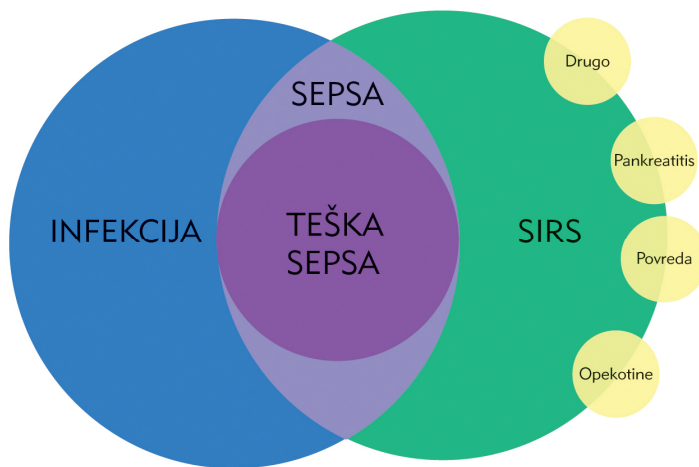
Ovakav koncept poznat je već poslednjih dvadesetak godina i u tom periodu shvatanje patofiziologije ovako kompleksnog stanja, kakav je sepsa, se razvijalo kao i nova dijagnostička i terapijska sredstva (12). Novi model poznat kao PIRO model podrazumeva ranu i objektivniju ocenu kliničkog stanja bolesnika. Ovaj model ujedinjuje važne i dostupne biomarkere koji opisuju sklonost (engl. *Predisposition*), infekciju (engl. *Infection*), odgovor organizma (engl. *Response*) i organsku disfunkciju (engl. *Organ dysfunction*). Bolesnici sa sistemskom infekcijom kojoj je pridodata i organska disfunkcija ili stanje šoka klinički se teško razlikuju od sličnih stanja, ali bez infekcije. Svaka od četiri komponente imale su potvrđen značaj prilikom izvedenih studija, pri čemu je pokazano i dokazano da se PIRO model može razviti u model za predviđanje stanja teške sepse i mortaliteta (13–16).

Sindrom sistemskog inflamatornog odgovora tj. SIRS (engl. *systemic inflammatory response syndrome*) se definiše kao sindrom u kome se mogu naći najmanje dva od dole navedenih znakova:

- Povišena telesna temperatura iznad 38 °C ili snižena ispod 36 °C
- Srčana frekvenca veća od 90 otkucaja/min

- Tahipneja sa više od 20 udisaja / min ili  $pCO_2 < 4,3kPa$
- Broj leukocita manji od  $4 \times 10^9/L$  ili veći od  $12 \times 10^9 /L$  ili prisustvo više od 10% nezrelih oblika neutrofila

Sistemska inflamatorni odgovor može biti prouzrokovan i traumom, pankreatitisom, opekotinama, imunološkim oštećenjima organa, ishemijom i drugim posledicama teških bolesti, a na mestu preklapanja sa infekcijom izazvanom ne samo bakterijama već i virusima, gljivicama i parazitima nalazi se sepsa i teški oblik sepse (11, 12).



Slika 1. Povezanost sepse, infekcije i SIRS prema *American Society of Chest Physicians and Society of Critical Care Medicine* (11)

Shodno dokumentima pod nazivom *Surviving Sepsis Campaign: International guidelines for management of severe sepsis and septic shock* (17, 18) dijagnostički kriterijumi za sepsu, tešku sepsu i septički šok podrazumevaju:

Osnovne pokazatelje:

- Povišena telesna temperatura iznad  $38 \text{ }^\circ\text{C}$  ili snižena ispod  $36 \text{ }^\circ\text{C}$
- Srčana frekvencija veća od 90 otkucaja/min
- Tahipneja sa više od 20 udisaja / min ili  $pCO_2 < 4,3kPa$ , kao i
- Izmenjen mentalni status
- Značajne edeme ili pozitivan bilans tečnosti ( $>20 \text{ mL/kg}$  za 24 sata)
- Hiperglikemija (koncentracija glukoze veća od  $7,7 \text{ mmol/L}$ ) u odsustvu *diabetes mellitus*

Inflamatorne pokazatelje:

- Broj leukocita manji od  $4 \times 10^9/L$  ili veći od  $12 \times 10^9 /L$  ili prisustvo više od 10% nezrelih oblika neutrofila,
- Vrednost C-reaktivnog proteina veća od 2 Sd iznad referentnog opsega
- Vrednost prokalcitonina veća od 2 Sd iznad referentnog opsega

Hemodinamski pokazatelj:

- Arterijska hipotenzija (sistolni pritisak manji od 90 mmHg, srednji arterijski pritisak manji od 70 mmHg iliistolni pritisak 40 mmHg niži od donje granice sistolnog pritiska

Pokazatelje disfunkcije organa:

- Arterijska hipoksemija ( $pO_2 / FiO_2 < 300$ )
- Akutna oligurija (diureza  $< 0,5 \text{ mL/kg/h}$  tj.  $45 \text{ mmol/L}$  za najmanje dva sata i pored adekvatne terapije)
- Sniženje kreatinina na manje od  $44,2 \text{ } \mu\text{mol/L}$  tj. povećanje iznad  $176,8 \text{ } \mu\text{mol/L}$
- Poremećaj koagulacije (INR  $> 1,5$  ili aPTT  $> 60\text{s}$ )
- Ileus (bez zvučnih signala)
- Trombocitopenija ( broj niži od  $100 \times 10^9 / L$ )
- Hiperbilirubinemija (koncentracija bilirubina veća od  $70 \text{ mmol/L}$ )
- Hiperlaktemija ( $> 1 \text{ mmol/L}$ ) i
- Smanjenje kapilarne perfuzije.

Sepsu u završnom stanju karakteriše čitav niz metaboličkih poremećaja, ali putevi i brzina razvoja nisu uvek isti. U toku multiorganske disfunkcije razvijaju se dva metabolička odgovora, dve faze, i to hiperdinamska i hipodinamska faza bolesti. Hiperdinamska faza podrazumeva povećani srčani učinak i smanjeni vaskularni otpor sa ili bez hipotenzije, ali uz visoku, normalnu ili smanjenu potrošnju kiseonika u tkivima. Hipodinamsku fazu karakteriše smanjen srčani učinak, hipotenzija i povećan periferni vaskularni otpor, uz smanjenu potrošnju kiseonika dok je u plazmi povećana koncentracija laktata. Ova faza predstavlja često i ireverzibilan stadijum septičnog šoka, sa visokim mortalitetom i bez odgovora na primenjenu terapiju (17–19).

Osnovna metabolička karakteristika septičnog šoka, nezavisno od hemodinamske faze, je razvoj laktične acidoze kao posledica anaerobnog metabolizma i poremećenog klirensa laktata. Usled toksičnog dejstva bakterijskih toksina snabdevanje

ćelija energijom odvija se putem glikolize sa posledično velikim oslobađanjem laktata. Kada je klirens laktata uredan, kao u hiperdinamskoj fazi, neće doći do razvoja acidoze, ali ako proces napreduje, nivo laktata tj. prisustvo acidoze u krvi odrediće razliku između sepsa i septičnog šoka (20, 21).

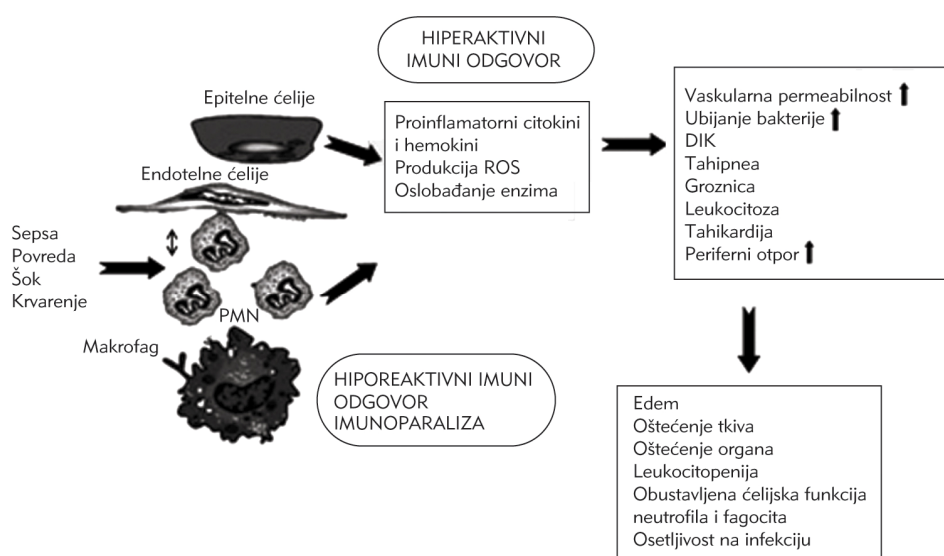
Svako septično stanje odlikuje povećanje metabolizma, koji može biti uvećan od 40–60% od normalne vrednosti. Potrošnja kiseonika je povećana, a procenat uvećanja zavisi od vrste tkiva ili organa. U toku sepsa kod intraabdominalne infekcije dolazi do povećanja potrošnje kiseonika u splahničkim organima što se odražava i na procentualno povećanje potrošnje kiseonika sa 20% na 30%. Slično je i kod bubrega gde je potrošnja kiseonika udvostručena. Sve napred navedeno ukazuje da povećana potrošnja kiseonika u organizmu nastaje usled ubrzane kardiopulmonalne funkcije i usled većih metaboličkih potreba svih organa. Vrlo je značajan i odnos između snabdevanja kiseonikom i ćelijske potrošnje kiseonika. Kod zdravih ljudi povećanje saturacije izaziva blagi porast njegove krajnje potrošnje. Suprotno ovom principu, u infekciji postoji periferni kiseonični deficit gde povećanje saturacije u krvi ne dovodi do povećanja potrošnje kiseonika u tkivima. Takođe, pojačan metabolički odgovor može biti praćen i povišenom telesnom temperaturom. Kod bolesnika sa intraabdominalnim infekcijama, lečenih od peritonitisa i sepsa, kao glavni energetske izvor koriste se masti. Hiperlipidemija se javlja u sklopu gram negativne sepsa dok je u septičnim stanjima prouzrokovanim gram pozitivnim bakterijama obično nema. Celokupan metabolizam lipida u sepsi podrazumeva lipolizu i imobilizaciju masnih kiselina i pored visokih koncentracija insulina koji stimuliše sintezu masti, što se objašnjava povećanom adrenergičkom aktivnošću (iako je nivo insulina povišen) (21, 22).

U sepsi i peritonitisu su povišene serumske koncentracije glukoze. Glukoza u serumu raste disproporcionalno na parenteralni unos i nezavisno od prisutnog insulina, i to kao posledica jake glukoneogeneze usled adrenergičkog odgovora organizma. U teškim intoksikacijama bakterijskog porekla uz poremećaje oksidacije stvaraju se i velike količine laktata i piruvata i acidoza u krvi. Jetra koristi laktat i piruvat za glukoneogenezu i oko 30% endogene glukoze potiče od povećanih laktata u serumu. Pored pomenute glukoneogeneze, porastu glukoze doprinosi i brza razgradnja glikogena u hepatocitima. Inflamatorna tkiva služe kao glavni potrošači glukoze. Leukociti, fibroblasti i epitelne ćelije su glikolitičke ćelije i one troše povećane količine glukoze u

procesu ćelijske i tkivne reparacije. Glukoza se pretvara u laktat, a on stiže do jetre gde se od njega ponovo sintetiše glukoza. Glukoza koja sagoreva, nadoknađuje se glukoneogenezom iz aminokiselina koje oslobađaju skeletni mišići. Nalaz hipoglikemije nije uobičajen u IAI sa septičnim komplikacijama, ali označava pojačanu potrošnju na periferiji uz smanjenu glukoneogenezu što je odlika preterminalnih stanja. Informatorno-toksična stanja dovode do velikog gubitka azota i njegovog negativnog bilansa jer je jako povećan katabolizam proteina uz umereno povećanu sintezu (21–24).

#### 1.4.2. Etiopatogeneza septičnog šoka i sindroma multiorganske disfunkcije (MODS)

Razvoj bakterijske IAI je jedinstven proces, čije se faze prepoznaju kao posebni klinički oblici. Primarna intaabdormalna zapaljenja su prvi stadijum u genezi mogućih infekcijskih stanja. Pod pojmom sepse podrazumevamo infekcijska stanja gde obavezno postoji fokus i gde bakterije prodiru u opštu cirkulaciju, što dovodi do oštećenja tkiva i organa. Tako je i nastao pojam sindroma multiorganske disfunkcije (MODS), kao poslednja faza u razvoju IAI. MODS odlikuje veoma ozbiljna klinička slika sa evidentnim disfunkcijama više različitih organskih sistema.



Slika 2. Informatorna kaskada do MODS (25)



Evolucija sepse podrazumeva razvoj nekoliko patoloških procesa koji zajednički i paralelno teku. Iz zapaljenskog fokusa prodiru patogene bakterije u cirkulaciju, oslobađa se endotoksin što dovodi do "eksplozije" metabolizma u ćelijama praćeno uključivanjem i sprednih metaboličkih puteva i teške intoksikacije. Oslobođeni endotoksini ekscitiraju i dejstvo zapaljenskih medijatora, te zajedno deluju na krvne sudove, miokard, imuni sistem i metabolizam, čime iniciraju disfunkciju respiratornog, cirkulatornog i koagulacionog sistema. Biološka posledica ovih poremećaja su toksično-metabolička i ishemično-hipoksična oštećenja ćelija što dovodi do njihove destrukcije. Klinička posledica je početno organsko oštećenje koje zahvata više organa, dajući sliku multiorganske disfunkcije (25, 26).

#### **1.4.2.1 Septikemija i šok**

Kada mikroorganizam prodre u opštu cirkulaciju infekcijski proces može ići u dva pravca. Prvo, sama činjenica da mikroorganizmi cirkulišu kroz organizam može dovesti do stvaranja novih apscesnih tvorevina tj. do sekundarnih žarišta infekcije. S druge strane, bakterijske ćelije aktiviraju čitav niz imunoloških i/ili endokrinih reakcija uz jačanje metaboličkih procesa i konačnom slikom šoka i multiorganske disfunkcije. Usled kretanja bakterija po čitavom organizmu moguće je formiranje apscesa u miokardu te nastaje popuštanje levog srca i kardiogeni šok. Isto tako pojava apscesa u mozgu uzrok je neurogenog šoka. Progresija bakterijske infekcije u peritoneumu uzrokuje prelaz tečnosti u peritonealnu duplju uz razvoj hipovolemijskog šoka. Antiinflamatorni sistemi koji se aktiviraju kao odbrana od nadolazeće infekcije uslovljavaju hemodinamske efekte koji vode u stanje septičnog šoka.

Infekcijski proces koji se razvija preko primarnog žarišta dovodi do teških oštećenja ćelije. Odbrambeni mehanizam podrazumeva opsonizaciju, fagocitozu, adheziju komplementa na bakterijski zid i sledstveno prepoznavanje bakterija od strane aktiviranog makrofaga ili polimorfonukleara. Kontakt fagocita i mikroorganizma opsoniranog imunoglobulinima, dovodi do stvaranja slobodnih kiseoničnih radikala. Kiseonik se enzimski prevodi u jonsko stanje, i dalje se stvaraju peroksid, hidroksilni joni i drugi reaktivni metaboliti, koji se otpuštaju izvan odbrambene ćelije, što je od značaja za dalju bakterijsku destrukciju. Delovanje bakterijskog endotoksina na ćelijsku

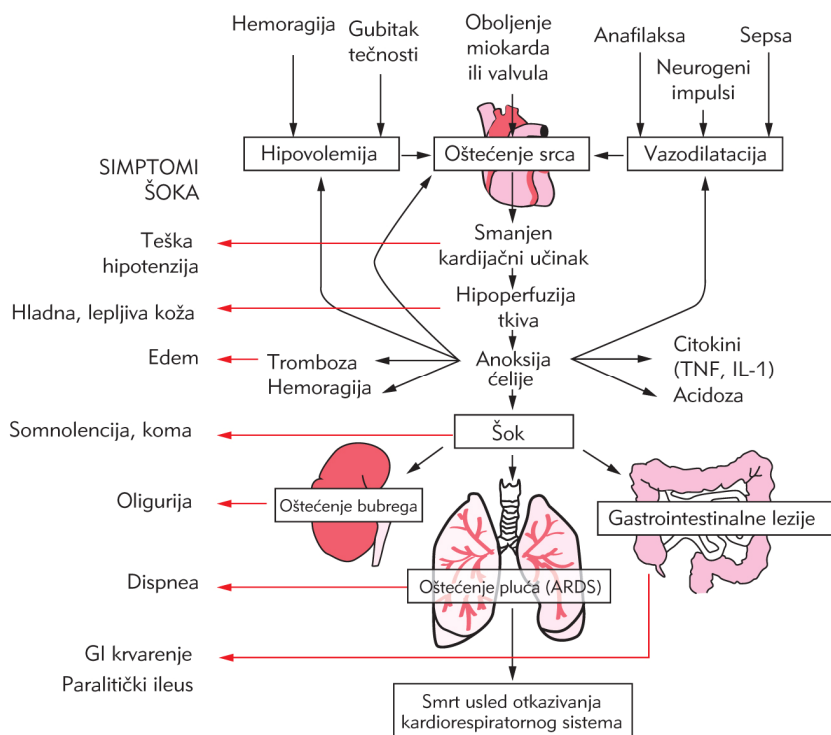
membranu dešava se istovremeno kad i efekat endotoksinom indukovanih medijatora. Mesto delovanja je spoljašnji deo ćelijske membrane i sistem Na,K-ATP-aze. Posledično smanjenje kalijuma u ćeliji uzrokuje poremećaj glukoneogeneze, glikolize i sinteze proteina. Porast natrijuma uzrokuje hiperhidraciju citozola sa otokom subcelularnih organela i intermembranskih pregrada mitohondrija. Ipak uz porast intracitozalnog kalcijuma, stvara se fosfolipaza, čija je aktivacija usmerena na membrane organela što će za posledicu imati promenu glikogenolize, glikolize i funkcije mitohondrija. U normalnim uslovima mitohondrije povlače kalcijum iz citosola. Ako je ovo povlačenje veliko unutrašnji sloj membrane obustavlja produkciju cAMP-a usmeravajući se na izbacivanje kalcijuma iz ćelije. Joni natrijuma ulaze u intermembranske prostore, pojačava se potrošnja ATP-a u regulaciji jonske pumpe. Posledica je smanjena oksidativna fosforilacija i povećanje NADH/NAD u matriksu čime se zaustavlja Krebsov ciklus. Razvija se intramitohondrijalna acidoza, acetyl-CoA se stvara iz piruvata i masnih kiselina. Energetski balans ćelije je narušen, jer se ATP ne nadoknađuje i dolazi do edema i dalje razaranja mitohondrija. Usled energetskog deficita, rastvaraju se i ostale organele kao i membrana jedra. Ova oštećenja ćelija pod uticajem endotoksina dovode i do razlaganja međućelijskih veza i do pojave intersticijalnog edema usled isticanja intravaskularne tečnosti, elektrolita i proteina. Usled edema i ekstravaskularnih hemoragija smanjena je perfuzija tkiva, a snabdevanje kiseonikom je otežano i zbog pojave tromboza u mikrocirkulaciji usled aktivacije koagulacionog sistema.

Stadijum pancelularnog edema podrazumeva energetske promene u ćeliji koje dovode do strukturnih promena u njoj i zahvata sve ćelije u organizmu usled generalizovanog intestinalnog edema i potpuno onemogućene resorpcije, pojave intravaskularne koagulacije i opšte hipotenzije. U skladu sa rečima J.C. Haldana da "Anoksija ne samo da zaustavlja mašinu već lomi njenu mašineriju" nadoknada energije je skoro beskorisna (27). Metaboličke promene odlikuje patofiziološki model sačinjen iz dve faze. Prva faza podrazumeva nekontrolisanu inflamatornu reakciju sa endotoksičnim oštećenjem ćelije, prevažodno membrane i mitohondrija. Druga faza je stanje pancelularnih promena koje su rezultat delovanja inflamatornih medijatora oslobođenih u zoni primarnog oštećenja. Tako se razvija generalizovana hipoperfuzija i hipoksija uz oštećenje svih ćelija. Poslednji u nizu u genezi infektivnog procesa je i

nastanak pancelularnog edema koji predstavlja završni rezultat endotoksemije (4, 28–31).

#### **1.4.2.2 Sindrom septičnog šoka i MODS**

Šok se može definisati kao stanje pri kojem izrazito opšte smanjenje delotvorne dostave kiseonika i drugih hranljivih materija tkivima dovodi najpre do reverzibilnih, a zatim ako potraje i duže i do ireverzibilnih oštećenja ćelija i organa. Za preživljavanje presudno je održavanje odgovarajuće perfuzije vitalnih organa. Perfuzija podrazumeva postojanje i održavanje odgovarajućeg arterijskog pritiska koji je pak određen minutnim volumenom i sistemskim vaskularnim otporom. Minutni volumen proizvod je frekvence srca i udarnog volumena, koji je funkcija venskog priliva u srce, otpora i kontraktilnosti miokarda. Sistemski vaskularni otpor proporcionalan je dužini krvnog suda i viskoznosti krvi. Etiološka podela šoka podrazumeva postojanje nekoliko vrsta ovih stanja. Kardiogeni šok nastaje usled lezije ili nekroze miokarda kada je smanjena sistolička funkcija. Ekstrakardijalni tj. vansrčani opstruktivni šok najuočljiviji je pri tamponadi perikarda te je minutni volumen srca nizak kao i srednji arterijski pritisak. Oligemijski ili hipovolemijski šok posledica je krvarenja ili velikog gubitka tečnosti kao u slučaju opekotina, dehidracije i sl. Septički šok je primer tzv. distribucijskog šoka, koga odlikuje smanjenje sistemskog vaskularnog otpora što će usloviti i slabu preraspodelu protoka u mikrocirkulaciji. Septički šok počinje infekcijskim žarištem koje oslobađa mikrobe i/ili jedan ili više medijatora u krvotok koji mogu izazvati vazokonstrikciju, ali u većini vazodilataciju. Periferna vazodilatacija uzrokuje smanjenje sistemskog vaskularnog otpora i veliki minutni volumen srca. Loša distribucija krvotoka uz prisutnu laktičnu acidozu i pored velikog minutnog volumena srca i dejstva medijatora, dovodi do preterane vazodilatacije u jednom, ali i konstrikcije u drugom delu vaskularnog sistema. Iako je minutni volumen srca visok, ipak dolazi do dilatacije komora i pada njihove funkcije te nastupa stanje depresije miokarda. Ako septički šok potraje, zajedničko delovanje perifernih vaskularnih abnormalnosti i depresija miokarda uzrokuje letalan ishod i to u oko 50% slučajeva. Smrt je posledica tvrdokorne hipotenzije i/ili višestrukog prestanka rada organa (bubrega, jetre, pluća i mozga) (4, 18, 32).



Slika 3. Patogeneza septičnog šoka (Damjanov, 2000)

Razvoj bakterijemije u stanje šoka i sindrom multipnih organskih oštećenja započinje stanjem hipermetabolizma sa pojavom groznice, drhtavice, tahikardije i tahipneje i tada vazodilatacija nastaje kao direktan efekat zapaljenskih medijatora i endorfina, dok je intravaskularni volumen i srčana rezerva još očuvana. Drugi patogenetski mehanizmi pri septičkom šoku podrazumevaju proces nakupljanja neutrofila kao i trombocita, pojačava stvaranje lokalnih vazoaktivnih supstanci (npr. arahidonske kiseline) i slobodnih kiseoničnih radikala, stvaraju se mikrotrombovi što je uvod u promene mikrovaskularne perfuzije i direktnog oštećenja endotelne ćelije. U nekim situacijama perfuzija tkiva je primerena, ali pod dejstvom medijatora na nivou tkiva nastaje "metabolički blok" kada je sprečena eksploatacija kiseonika i hranljivih materija. Posledično nakupljaju se laktati jer ćelija ne primenjuje oksidacijski aerobni metabolizam što je i uvodi u fazu disfunkcije. Permeabilitet kapilara se povećava, intravaskularni volumen opada i organizam ulazi u stanje ireverzibilnog šoka. Ovakav udruženi mehanizam direktnog ćelijskog oštećenja i snažne permeabilnosti osnovni je mehanizam multipnih organskih oštećenja (MODS). Ova faza odlikuje se refraktarnom

hipotenzijom, koja ne odgovara na nadoknadu volumena. Naziva se i "sindrom posle sepsa" jer nezavisno od patogeneze šoka (kardiogeni, neurogeni, hipovolemijski) ovo je završni stadijum oboljenja. Za njega su karakteristični sledeći poremećaji koji se javljaju pojedinačni ili zajedno. To su: ARDS, akutna bubrežna insuficijencija, encefalopatija, insuficijencija jetre i digestivnog trakta i progresivna kardiomiopatija.

Šok je obično hitno stanje čije zbrinjavanje zahteva ravnotežu između potrebe da se počne lečenje pre nego šok izazove ireverzibilna oštećenja vitalnih organa i potrebe celovite kliničke obrade neophodne za sveukupno otkrivanje uzroka infekcije (4, 32, 33).

### **1.4.3. APACHE II skor**

Sistem skorova predstavlja pokušaj objektivizacije procene stanja teško povređenih i kritično obolelih i podrazumeva bodovanje tj. kvantifikaciju vitalnih funkcija. Scoring sistemi se dele na anatomske, fiziološke i kombinovane. Anatomske skorovi su nepogodni i nepouzdati, naročito kod prijema povređenih u urgentne službe, jer se zasnivaju samo na vidljivim oštećenjima i mogu se kompletirati tek nakon obavljenih svih dijagnostičkih procedura (rentgen i sl.). Skoring sistemi koji koriste fiziološke parametre (krvni pritisak, puls, motorni odgovor, frekvencija respiracija i sl.) mnogo su podesniji za odlučivanje o inicijalnom tretmanu politraumatizovanih bolesnika (34). Sistemi bodovanja (*scoring* sistemi) ukazuju na stepen oštećenja organizma u trenutku započinjanja lečenja. Ovako se utvrđuje kvantifikacija toksičnog oštećenja uzimajući u obzir stepen oštećenja proisteklog iz patogeneze oboljenja i ostalih relevantnih faktora rizika. Ovi sistemi stvaraju se pod standardnim uslovima i mogu pomoći u određivanju terapijske strategije. Svaki skoring sistem se zasniva na praćenju (pato)fizioloških promena, gradirajući te promene u nekoliko stadijuma čime su obuhvaćeni najvažniji organi. Dugogodišnjom primenom ovih bodovnih sistema moguće je odrediti podgrupe sa najmanjim pa ka najvećem broju bodova. Teoretski to bi značilo da će bolesnik sa najmanjim brojem bodova bezuslovno preživeti intraabdominalni infekcijski proces, dok kod bolesnika sa maksimumom bodova te šanse su svedene na minimum. Poklapanje rezultata lečenja ukazuje kako na valjanost skoring sistema tako i na adekvatno lečenje. Uvođenje nove metode lečenja može u

potpunosti izmeniti postojeća saznanja tako da primena scoring sistema nije značajna samo sa aspekta procene i prognoze, već olakšava i poređenje različitih terapijskih pristupa (35).

Scoring sistemi omogućavaju svrstavanje pacijenata u velike grupe, gde se pomoću matematičkih formula dobijaju podaci koji objektiviziraju i olakšavaju:

- a. procenu stanja bolesnika u trenutku ispitivanja,
- b. kretanje toka bolesti,
- c. procenu ishoda lečenja.

Najčešće korišćeni sistemi skorovanja kod odraslih pacijenata u jedinicama intenzivne nege su:

- APACHE II i III SCORE (*Acute Physiology And Chronic Health Evaluation*),
- LODS (*Logistic Organ Dysfunction Score*),
- MOF (*Multiple Organ Failure*) Score,
- MOD (*Multiple Organ Dysfunction*) Score,
- SAPS (*Simplified Acute Physiology*) Score,
- SOFA (*Sepsis-related Organ Failure Assessment*) Score,
- GCS (*Glasgow Coma Scale*)

Izbor skor sistema u jedinici intenzivne nege zavisi od kliničke slike kritično obolelih pacijenata. Svaka primena scoring sistema uvek mora biti kombinovana sa istovremenim kliničkim praćenjem bolesnika. Najčešće korišćen scoring sistem kod bolesnika na intenzivnoj nezi je APACHE II Score system. *Acute Physiology and Chronic Health Evaluation* skor se dobija sabiranjem bodova tri prateća bodovna sistema. To su: akutni fiziološki skor (APS), skor dobi (*Age points*) i procena hronične bolesti (CHE - *Chronic Health Evaluation*).

APS + A + CHE je APACHE

Akutni fiziološki skor je u korelaciji sa težinom bolesti i sastoji se od 12 parametara, uključujući i neurološke bodove (15 sa *Glasgow Coma Scale*). Normalne fiziološke odlike važe 0 bodova, više i niže su klasifikovane od 1 do 4. Vrednosti za akutni fiziološki skor (APS) se uzimaju tokom prvih 24 h od prijema na intenzivnu negu. Za obradu podataka se uzima najlošija izmerena vrednost.

Tabela 1 Ekstremne vrednosti za akutni fiziološki skor (APS)

REKTALNA TEMPERATURA (C°)	$\leq 29,9 - \geq 41$	0 – 4
MAP (mmHg)	$\leq 49 - \geq 160$	0 – 4
PULS (/min)	$\leq 39 - \geq 180$	0 – 4
BROJ RESPIRACIJA (/ min)	$\leq 5 - \geq 50$	0 – 4
OKSIGENACIJA (A-aDO <sub>2</sub> , FiO <sub>2</sub> , PaO <sub>2</sub> )	A-aDO <sub>2</sub> < 200 – $\geq 500$ , FiO <sub>2</sub> $\geq 0.5 - < 0.5$ , PaO <sub>2</sub> > 70 – < 55	0 – 4
pH ARTERIJSKE KRVI	$\geq 7,70 - < 7,15$	0 – 4
Na u SERUMU (mmol/L)	$\geq 180 - \leq 110$	0 – 4
K u SERUMU (mmol/L)	$\geq 7 - < 2.5$	0 – 4
KREATININ U SERUMU (mmol/L)	$\geq 132 - < 53$ sa ili bez akutne bubrežne insuficijencije	0 – 8
HEMATOKRIT (%)	$\geq 60 - < 20$	0 – 4
Le (x 10 <sup>9</sup> / L)	$\geq 40 - < 1,0$	0 – 4
GLASGOW COMA SCORE		3 – 15

U sastavu APACHE II Scora, kao i drugih kompleksnih skorova se nalazi i *Glasgow Coma Score* (GCS) koji se koristi se za procenu stepena oštećenja centralnog nervnog sistema.

OTVARA OČI		VERBALNI ODGOVOR		MOTORNI ODGOVOR	
				Sluša komande	6
		Orijentisano odgovara	5	Lokalizuje bol	5
Spontano	4	Konfuzno odgovara	4	Fleksioni pokreti	4
Na govornu stimulaciju	3	Neodgovarajuće reči	3	Dekortikaciona fleksija	3
Na bol	2	Nerazumljivi zvuci	2	Decerebraciona ekstenzija	2
Ne otvara oči	1	Ne odgovara	1	Bez odgovora	1

Vrednosti GCS od 3 do 8 ukazuju na tešku kranio cerebralnu povredu, od 8 do 12 srednje tešku, a 12 do 15 na laku kranio cerebralnu povredu.

Skor za starost pacijenta u kalkulaciju uvodi i uticaj starosti na tok i ishod lečenja.

GODINE	BODOVI
≤ 44	0
45 - 54	+ 2
55 - 64	+ 3
65 - 74	+ 5
≥ 75	+ 6

Hronično zdravstveno stanje pacijenta značajno utiče na tok i ishod lečenja. Zbog toga je skor za hronično zdravstveno stanje pacijenta uključen u APACHE II skor.

OPERATIVNI STATUS	ZDRAVSTVENO STANJE	BODOVI
Pacijent se ne operiše	Teška organska insuficijencija ili imunokompromitovan n pacijent	+ 5
	Nema podataka o teškoj organskoj insuficijenciji i pacijent je imunokompetentan	0
Hitno operisan pacijent	Teška organska insuficijencija ili imunokompromitovan pacijent	+ 5
	Nema podataka o teškoj organskoj insuficijenciji i pacijent je imunokompetentan	0
Elektivno operisan pacijent	Teška organska insuficijencija ili imunokompromitovan pacijent	+ 2
	Nema podataka o teškoj organskoj insuficijenciji i pacijent je imunokompetentan	0

Imunokompromitovan je pacijent ukoliko:

- a. dobija terapiju koja smanjuje odbrambene snage organizma - imunosupresivna terapija, hemioterapija, kao i dugotrajna upotreba steroida ili njihove visoke doze,
- b. ima teško oboljenje koje je vezano za imunološke funkcije - maligni limfom, leukemija, AIDS.



Organska insuficijencija podrazumeva:

- a. insuficijenciju jetre
  - o biopsijom dokazanu cirozu jetre,
  - o portnu hipertenziju,
  - o hepatičnu encefalopatiju;
- b. insuficijenciju kardiovaskularnog sistema
  - o stepen IV NYHA klasifikacije
- c. respiratornu insuficijenciju
  - o opstruktivne, restriktivne ili vaskularne bolesti pluća
- d. renalnu insuficijenciju
  - o ako je pacijent na hroničnoj dijalizi.

Izračunavanje APACHE II Score: *APS Score* + bodovi za starost pacijenta + bodovi za hronično zdravstveno stanje. Minimalni skor je 0, a maksimalni 71. Što je skor veći, veći je rizik intrahospitalne smrtnosti.

Tabela II Predviđena stopa (%) intrahospitalne smrtnosti prema APACHE II skoru

APACHE II skor	% smrtnosti
0 - 9	0%
10 - 19	22%
20 - 29	58%
≥ 30	90%

Specifičnost ovog skora se ocenjuje sa 98 % tako da ovaj skor predstavlja zlatni standard za procenu rizika umiranja. (35, 36).

Ovi scoring sistemi treba sa zadovolje kriterijum kao što su preciznost, pouzdanost i specifičnost. Ako su kriterijumi ispunjeni, scoring sistemi ispunjavaju više ciljeva: mogućnost predviđanja ishoda trauma (mortalitet pre svega), upoređivanje terapijskih metoda, mogućnost adekvatnije pre- i inter-hospitalne trijaže kao i potencijalnu prevencija komplikacija.

APACHE sistem, koji se najčešće koristi u jednicama intenzivne nege, uveden je još 1982. godine i do sada je urađeno više revizija (37–40).

## 1.5. Mikrobiološki uzročnici intraabdominalnih infekcija

U digestivnom sistemu ima veliki broj aerobnih i anaerobnih bakterija, neravnomerno raspoređenih po pojedinim segmentima. Bakterijsku floru usne duplje i jednjaka karakterišu *Streptococcus viridans*, *Neisseria spp.* i *Peptostreptococcus spp.* U želudcu usled delovanja želudačne kiseline broj bakterija je smanjen tako da se u bakteriološkom smislu želudac, duodenum i jejunum smatraju sterilnim. Fiziološku mikrofloru kolona odlikuje prisustvo anaerobnih bakterija (96–99%) i aerobnih bakterija (1–4%). Ovakva zastupljenost bakterijskih vrsta postoji u fiziološkim uslovima, dok će većina patoloških procesa dovesti do kolonizacije bakterija i u onim delovima digestivnog sistema u kojima ih pod normalnim uslovima nema. Intestinalna flora ima veliku ulogu u sintezi vitamina K, konverziji žučnih kiselina kao i apsorpciji hranljivih materija. Takođe, intestinalne bakterije proizvode amonijačna jedinjenja, što u određenim patofiziološkim uslovima (npr. kod *maelene*) može dovesti i do povećanja ekstrarenalne ureje. Na sastav bakterijske flore imaju uticaj starost, životna dob, način ishrane, faktori digestivne funkcije (kiselost želudačnog soka, prisustvo žučnih kiselina, crevni motilitet) kao i stanje imunološkog sistema.

Unutrašnjost intestinalnog sistema predstavlja pogodnu sredinu za razvoj i život bakterija. Tu bakterije dobijaju potrebne organske materije za sintezu ćelijskih komponenti, a pod tako optimalnim uslovima i ćelijske deobe se odvijaju svakih 20–30 minuta. Bakterijski rast se odigrava u dve faze. Prva faza podrazumeva njihov nastanak i zavisi od lokalnih faktora sredine, a njoj sledi faza eksponencijalnog rasta kada bakterijska populacija postiže svoj maksimum i kada se bakterijska masa zgušnjava i prekida u daljem razmnožavanju jer nedostaje hranljivih materija. Nagomilavaju se toksični metaboliti ili dejstvuju imunološki mehanizmi odbrane organizma. Većina bakterijskih toksina, egzotoksina, ima direktna toksična dejstva na ćelije ljudskog organizma. Velikim delom egzotoksini svoje efekte ispoljavaju na koagulacioni sistem, ali deluju i proteolitički na enzime ćelijskog zida (Tabela III). Nasuprot egzotoksinima postoje i endotoksini gram negativnih bakterija, koji deluju jedinstveno, aktivacijom retikuloendotelnog sistema organizma, kako u plazmi tako i na nivou ćelije. Tako da,

ako postoji veći broj bakterija uključenih u inflamatorni proces i toksični efekat će biti izraženiji i ovaj odnos je direktno proporcionalan (41).

Tabela III Bakterijski egzotoksini i njihovo poreklo

EGZOTOKSIN	BAKTERIJA
Hemolizini	<i>Peptostreptococcus spp.</i>
Streptolizini	<i>Aerobne i anaerobne streptokoke</i>
Leukocidini	<i>Fusobacterium necroforum</i>
Proteolitički enzimi ćelijskog zida	<i>Bacteroides fragilis</i>
Kolagenaze	<i>Clostridium spp.</i> <i>B. Melaningenicus</i>
Hijaluronidaze	<i>Clostridium spp.</i>
Heparinaze	<i>Enterobacteriaceae</i> <i>Fusobacterium spp.</i> <i>Bacteroides fragilis</i>
Streptokinaze i streptodornaze	<i>Aerobne i anaerobne streptokoke</i>
Koagulaze	<i>Staphylococcus spp.</i> <i>Streptococcus spp.</i> <i>Clostridium spp.</i>
Lecitinaze	<i>Clostridium spp.</i>
Citoplazmatski toksini	<i>Bacteroides fragilis</i> <i>Fusobacterium necroforum</i> <i>Clostridium spp.</i>

Sepsu i njenu potencijalno letalnu komplikaciju septički šok, uglavnom izazivaju gram negativni organizmi svojim lipopolisaharidima, zatim peptidoglikani gram pozitivnih i gram negativnih bakterija kao i, gore navedeni, egzotoksini gram pozitivnih mikroorganizama (Tabela IV). U 30–80 % slučajeva sepsu izazivaju gram negativne, a u 5–24 % slučajeva gram pozitivne bakterije. Studija Angusa i sar. (33) pokazala je da sepsu u 62% izazivaju gram negativne bakterije, u 47% slučajeva uzročnik je gram pozitivna bakterija, a u 19% pridružena je i gljivična infekcija. Sve rasprostranjenija primena invazivnih procedura u procesu lečenja i imunosupresivna terapija doprinose porastu njihovog pojavljivanja u humanoj medicini.

Tabela IV Mikroorganizmi i tipične infekcije udružene sa sepsom

<b>Gram negativne bakterije</b>	
<i>Enterobacteriaceae i pseudomonas</i>	peritonitis, pijelonefritis, infekcije žučnih puteva
Meningokoke	purpura fulminans
<b>Gram pozitivne bakterije</b>	
Pneumokoke	pneumonia, meningitis
Streptokoke	septikemija
<i>Staphylococcus aureus</i>	septikemija
<b>Drugi mikroorganizmi</b>	
Anaerobi – <i>Clostridium</i>	peritonitis, gangrenozne infekcije
<i>Candida species</i>	kandidijaza

**Gram pozitivne bakterije** imaju tipičnu dvoslojnu citoplazmatsku membranu sa rigidnim ćelijskim zidom koji mikroorganizmu omogućava karakterističan oblik i preživljavanje u osmotski neadekvatnoj sredini. Ćelijski zid sastoji se od peptidoglikana polimerizovanog N-acetilglukozamina i njegovog laktatnog etra N-acetilmuraminske kiseline. Većina patogenih gram pozitivnih bakterija ima dodatne ekstracelularne strukture kao npr. površinske polisaharide (grupni antigen streptokoka), polisaharidne kapsule i površinske proteine neophodne za preživljavanje u krvi.

**Gram negativne bakterije**, slično kao i Gram pozitivne bakterije, poseduju citoplazmatsku membranu i peptidoglikanski sloj, ali nešto redukovan. Za ove bakterije karakteristična je spoljašnja membrana koja je kovalentno vezana za tetrapeptide peptidoglikanskog sloja lipoproteina. Ovi proteini sadrže specijalne lipidne sastojke na terminalnom cisteinu koji čvrsto vezuje lipoproteine u spoljašnju membranu. Spoljašnji sloj spoljašnje membrane sadrži lipopolisaharide (LPS), sastavljene od relativno konzerviranog di-N-acetilglukozaminskog kostura sa fosfatnim, hidroksilnim i amino grupama. Cela ova struktura označena je kao lipid A i poseduje većinu važnih bioloških osobina koje su povezane s LPS-om ili endotoksinom.

Kompleksan fenomen koji nastaje iz kolonizacije bakterija, invazije, produkcije toksina i odgovora domaćina nazivamo bolest. Među prvim bolestima koje proizilaze iz bakterijskih infekcija su one koje su uzrokovane mikroorganizmima koji produkuju toksine. Lipidni deo A gram negativnog LPS-a ima potentne biološke aktivnosti, koje su uzrok tzv. gram negativnih sepsi. Ovo podrazumeva povišenu telesnu temperaturu, proteolizu mišića, nekontrolisanu intravaskularnu koagulaciju i šok. Ovi efekti su posledica stvaranja interleukina-1 i TNF, koji pokazuju hipertermičku aktivnost delujući na hipotalamus, povećavaju propustljivost krvnih sudova, remete aktivnost endotelnih ćelija indukujući ih na prokoagulacijsku aktivnost. Neke su bolesti uzrokovane primarnom prisutnošću bakterija u tkivima koja su normalno sterilna. Invazija krvi gram negativnim bakterijama uzrokuje sepsu i bakterijemiju bez jasnog uključivanja egzotoksina, ali je endotoksin vrlo važan (41).

### 1.5.1 Gram pozitivne infekcije

**Stafilokoke** od kojih je *Staphylococcus aureus* najvažniji patogen kod ljudi, postoje su gram pozitivne bakterije, koje koloniziraju kožu većine ljudskih bića. Ali, ako se koža i sluznica povrede npr. hirurškim zahvatom ili traumom, stafilokoke mogu proći i razmnožiti se u potkožnim tkivima uzrokujući tipično lokalizovan površinski apsces. Međutim, ako prodru u limfu i krv nastupa stafilokokna bakterijemija i mogući septički šok. Neki sojevi *Staphylococcus aureus* produkuju toksine koji izazivaju multisistemsku disfunkciju kao što je toksični šok.

*Staphylococcus aureus* je gram pozitivna bakterija, koja se retko nalazi u kolonu, pa bi i učestalost u intraabdominalnim infekcijama trebala biti manja i dominantno je ginekološkog porekla. Prava intraabdominalna infekcija je posledica bilijarno-pankreatične infekcije. Zahvaljujući proteinu A (antifagocitni faktor), sastavnom delu ćelijskog zida, stafilokok je veoma otporan na fagocitozu. Luči više beta-laktamaza te mu je i otpornost na beta laktamske antibiotike značajno veća.

Sve ukupno, stafilokoke su gram pozitivne, nepokretne, aerobne i katalaza-pozitivne koke. Ime su dobile po tipičnom skupljanju mikroorganizama u grozdove. Patogeni stafilokoki se od nepatogenih razlikuju po sposobnosti da anaerobno fermentiraju glukozu. *Staphylococcus aureus* nazvan je tako zbog zlatne boje kolonije

koje rastu na čvrstoj podlozi. Njegovi sojevi obično su hemolitični i izražavaju veću ekspresiju biohemijske aktivnosti u smislu produkcije koagulaze, toksina i hemolize nego ostali. Ako se isključi infekcija koja nastaje iz urinarnog trakta *Staphylococcus aureus* je vrlo često izolovan patogeni u primarnim i sekundarnim bakterijemijama u infekcijama hirurških rana. Infekcije stafilokokom obično nastaju kao posledica faktora bakterijske virulencije tj. sposobnosti bakterije da preživi pod nepovoljnim okolnostima i proizvodi enzime i toksine, kao i slabljenja odbrane organizma. Neki enzimi koje proizvodi *Staphylococcus aureus* imaju ulogu u virulenciji. Katalaza razara vodonik peroksid i može zaštititi mikroorganizam za vreme fagocitoze, dok koagulaza uzrokuje koagulaciju plazme formiranjem trombinu sličnog sastojka. Mnogi sojevi stvaraju hijaluronidazu, enzim koji razara hijaluronsku kiselinu u vezivnom tkivu matriksa što pomaže širenju infekcije. *Staphylococcus aureus* proizvodi ekstracelularne enzime i poznata su četiri različita eritrocitna hemolizna toksina označena kao alfa, beta, gama i delta toksin. Preko 90% svih sojeva *Staphylococcus aureus* rezistentno je na penicilin. Rezistencija je uzrokovana stvaranjem laktamaza, pa se lečenje vrši penicilinaza rezistentnim beta laktamskim antibiotikom (42).

**Streptokoke** su gram pozitivne bakterije sferičnog do ovoidnog oblika koje stvaraju karakteristične lance prilikom rasta u tekućem mediju i uglavnom su anaerobi. Mnogi streptokoki koji izazivaju infekcije kod ljudi stvaraju zonu potpune hemolize oko bakterijske kolonije pri kultiviranju na krvnom agaru što je poznato kao tip beta hemolize. Drugi streptokoki stvaraju zonu parcijalne ili alfa hemolize, dok streptokoke koji su nehemolitični nazivamo gama hemolitični. Vodeći uzročnik bakterijske sepse i meningitisa iz ove vrste je streptokok grupe B, dok su enterokoki vrlo zapaženi kao uzročnici intraabdominalnih i urinarnih infekcija.

*Streptococcus spp.* relativno retko uzrokuje infekcije u peritoneumu osim u slučaju pelveoperitonitisa kada je incidenca jako visoka. Luče veći broj toksičnih enzima što im i povećava virulencu (43).

*Enterococcus spp.* je gram pozitivna aerobna bakterija, niske patogenosti i incidence koja je uslovljena prisustvom anaerobnih bakterija.

*Peptostreptococcus spp.* su gram pozitivne anaerobne bakterije koje stvaraju gas.

*Clostridium spp.* je jedina gram pozitivna anaerobna vrsta koja stvara spore. Da bi se razvila IAI potrebni su specifični uslovi kao npr. smanjen parcijalni pritisak kiseonika, obimna tkivna oštećenja i neadekvatan fagocitni odgovor. U toku razmnožavanja ne postoji supstrat što ga čini još virulentnijim. Ima sposobnost produkcije velikog broja toksina. Egzotoksini klostridija dovode do fulminantne tkivne destrukcije, a kao posebno toksični se izdvajaju lecitinaze alfa toksina i gama toksin koji direktno oštećuju ćelijske membrane. Alfa toksin lizira eritrocite i dovodi do sekundarne anemije i hemoglobinurije. Hijaluronidaze ovih anaeroba rastvaraju međućelijske pregrade i olakšavaju širenje infekcije. Slično deluju i kolagenaze koje uništavaju kolagena vlakna i sprečavaju proces lokalizacije infekcijskog fokusa. Usled destrukcije kapilarne mreže nastaju mnogobrojne tromboze sa posledičnim prestankom tkivne perfuzije (44).

### 1.5.2. Gram negativne infekcije

*E. coli* je parazitski mikroorganizam koji naseljava gastrointestinalni trakt. Kod osoba sa oslabljenim organizmom inače nevirulentni sojevi mogu dovesti do pneumonije, sepse ili infekcije urinarnog trakta, naročito ako postoji prisustvo stranog tela (npr. endovaskularni kateter). Prethodno zdrave osobe podložne su tzv. kontaktnoj infekciji uzrokovanoj normalnim sadržajem kod ruptуре creva koja nastaje kod apendicitisa ili abdominalne traume.

*E. coli* predstavlja mali deo normalne flore creva – preko 99% su striktno anaerobi – ali je značajan patogen u onim infekcijama koje nastaju kao rezultat izlaska normalnog crevnog sadržaja u prethodno sterilnu okolinu. Aerobna flora, uključujući i *E. coli* normalnog crevnog sadržaja je primarno odgovorna za ranu septikemiju povezanu sa izlivanjem crevnog sadržaja dok su anaerobne vrste potrebne da se formira apsces. *E. coli* se obično nalazi u kulturama uzoraka uzetim kod peritonitisa uzrokovano perforacijom slepog creva, divertikuluma ili peptičnog ulkusa, a često se nalazi i u krvotoku bolesnika s težim oblicima bolesti. Takođe, sreće se i u slučajevima intraabdominalnih apscesa, holecistitisa, pri ishemiji creva i sl.

*E. coli* je gram negativna aerobna bakterija intestinalnog trakta. Pokretna je zahvaljujući flagelama koje ujedno predstavljaju H antigen. Posедуje kapsulu koja

predstavlja faktor virulencije jer sprečava fagocitozu. Najvažniji antigen je O antigen ili endotoksin, lipopolisaharidni kompleks u zidu bakterije, odgovoran za nastanak endotoksemije u prisustvu bakterijske infekcije. Preciznije, to je spoljašnji sloj bakterijske membrane koga grade lipid A i polisaharidni sloj. Prisustvo jednog bočnog polisaharidnog lanca određuje i prisustvo O antigena koji ujedno određuje i grupnu specifičnost bakterije. Lipid A je odgovoran za većinu bioloških dejstava endotoksina jer snažno utiče na imuni sistem tako što indukuje selektivnu proliferaciju B limfocita i njihovu diferencijaciju do sekretornih plazma ćelija. Direktni efekti endotoksina su hipotenzija sa cirkulatornim kolapsom, groznica, leukopenija, trombocitopenija i dermalna nekroza, kao i diseminovana intravaskularna koagulopatija (DIK) sa kortikalnom nekrozom bubrega. Patogenost ove bakterije najbolje se može prikazati kao odnos relativne frekvence u intestinalnom traktu, a to je oko 0,06% bakterijske mase, i zastupljenosti u IAI koja iznosi blizu 50% tj. infekcijska incidenca je nekoliko stotina puta veća nego kod drugih enteralnih bakterija (45).

Rodovi *Klebsiella* i *Enterobacter* pripadaju grupi *Klebsiellae* i obično su nepomične i nastanjuju, kao i *E. coli*, gastrointestinalni trakt. *Klebsiella pneumoniae* i njegovi bliski srodnici su glavni uzročnici infekcija donjeg respiratornog trakta (uzrokujući lobarnu pneumoniju), urinarnog trakta, bilijarnog trakta i hirurških rana. Mnoge od ovih infekcija su udružene sa bakterijemijom i životno ugrožavajućim septičkim šokom. *Klebsiella spp.* je gram negativni bacil bez flagela, koji pokazuje izrazitu tendenciju ka stvaranju apscesa i uzročnik je brojnih respiratornih i urinarnih infekcija. Produkujući brojne beta-laktamaze ima izraženu prirodnu otpornost na antibiotike.

Vrste *Enterobacter* su oportunistički patogeni koji se klinički ne mogu razlikovati od *Klebsiella*, ali mogu proizvoditi cefalosporinaze koje inaktiviraju čak i cefalosporine treće generacije. Od praktične važnosti su *Enterobacter aerogenes* i *Enterobacter cloacae*. Vrlo su slični klebsieli, imaju manji bakterijski patogeni faktor i često se izoluju iz peritonealnog sadržaja kod imunodeficijentnih-tercijarnih peritonitisa.

*Proteae* su aktivno pokretljive bakterije (koje ne fermentiraju laktozu) i sastoje se od tri genera *Proteus*, *Morganella* i *Providencia* i sedam vrsta među kojima su najpoznatiji *Proteus vulgaris* i *Proteus mirabilis*. Sojevi *Proteusa* se normalno nalaze u



tlu, vodi i otpadu i deo su normalne fekalne flore. Kao i druge gram-negativne bakterije *Proteus* može kontaminirati opekotine, dekubitisne ulkuse i hirurške rane i dalje izazvati invaziju u krvotok. Kliničke manifestacije su tipične za gram negativnu sepsu uključujući i šok. U većini slučajeva kao ulazno mesto pokaže se urinarni trakt, a zatim i bilijarno stablo, gastrointestinalni trakt i u toku hirurških zahvata.

U okviru grupe od praktične važnosti su indol negativni *Proteus mirabilis* i indol pozitivni *Proteus vulgaris*. Pokazuju veliku sklonost ka stvaranju apscesa i čest je uzročnik urinarnih i respiratornih infekcija. Ove bakterije imaju veliki broj flagela kojima se vrlo uspešno kreću i prijanjaju na mezotelne ćelije. Otporne su na mnoge antibiotike, naročito *Proteus vulgaris*, koji se neretko izoluje iz apscesnih formacija.

*Pseudomonas* vrsta je ubikvitaran, slobodnoživući, oportunistički gram-negativni patogen. *Pseudomonas aeruginosa* je najveći patogen te grupe. To je mali, aerobni gram-negativni štapić koji pripada rodu *Pseudomonadaceae* i proizvodi plavozeleni pigment piocianin, koji pomaže u njegovoj identifikaciji. Ova bakterija je male patogenosti pod fiziološkim, normalnim, uslovima zahvaljujući prirodnoj rezistenciji organizma iskazanoj kroz neutrofilnu fagocitozu. U prirodi je široko rasprostranjen, nalazi se u tlu, vodi, biljkama i životinjama uključujući i ljude. Kod zdravih ljudi često nastanjuje spoljašnje uvo, gornji respiratorni trakt i debelo crevo. Striktni je aerob, male frekvence u kolonu i učestvuje u IAI, uglavnom mešovitog tipa, pri čemu mu znatno raste virulencija. Luči veoma jak egzotoksin A i mnoge enzime kao npr. elastaze i lecitinaze. Ima sposobnost kolonizacije digestivnog trakta, što je bitno s aspekta dugotrajne antibiotske terapije. Većina infekcija sa *Pseudomonas aeruginosa* su bolničkog porekla i najčešće se prenosi na bolesnike putem ruku osoblja ili isparavanjem iz potencijalnih depoa infekcije, a to su npr. respiratori, endoskopski aparati, umivaonici i drugi izvori za koje je karakteristična visoka vlažnost.

*Bacteroides spp.* i *Fusobacterium spp.* su gram negativni striktni anaerobi, vrlo visoke virulencije. Osnovna odlika anaerobne flore je mešovitost bakterijskih vrsta, zato važnu ulogu u takvim polimikrobnim infekcijama ima *Bacteroides melaningenicus*, izrazito patogena bakterija, koja produkuje faktore rasta neophodne drugim anaerobnim bakterijama. *Bacteroides fragilis* je najvažniji predstavnik ove grupe. Njihova patogenost ogleđa se u ogromnom broju izlučenih egzotoksina, različite strukture, kao što su heparinaze koje izazivaju DIK (45).

## 1.6. Endotoksinska stimulacija inflamatornog odgovora

Istraživanja u kome su definisana dejstva cirkulišućih medijatora sepse datiraju od kraja 19. veka. Ipak bio je potreban ceo vek da se dokaže da je uzrok smrti u stanjima akutne bakterijemije ipak nekontrolisano stvaranje medijatora koje i započinje u ćelijama domaćina.

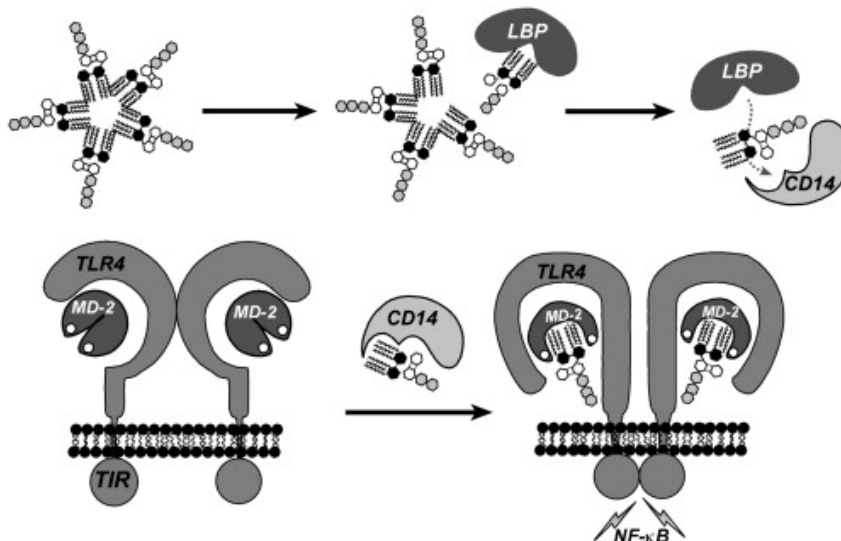
Inflamacija je sredstvo kojim se održava zdravlje, ali je i potencijalni uzročnik ireverzibilnih tkivnih oštećenja. Kao i ostali fiziološki mehanizmi i inflamacija je strogo kontrolisan proces. Kontrolisanje inflamacije se postiže proteinima akutne faze, antioksidantnom zaštitom, inhibitornim citokinima i hormonskom kontrolom. Kada se homeostaza naruši razvija se sepsa. Nastanku sepse pogoduje poremećaj odbrane organizma što je slučaj kod trauma, neoplazmi, opekotina ili kod pacijenata na terapiji imunosupresivima i citostaticima.

Sepsa se javlja kada dođe do oštećenja sluznice digestivnog trakta jer bakterije ili njihovi proizvodi toksini dospevaju u cirkulaciju. Bakterije i njihovi proizvodi stimulišu stvaranje brojnih citokina i drugih inflamatornih medijatora sa proinflamatornim i antiinflamatornim funkcijama. Kada njihova produkcija postane nekontrolisana nastaje stanje septičnog šoka. Ćelije koje se najviše oštete u toku sepse i septičnog šoka su endotelne ćelije krvnih sudova. Tumor nekroza faktor (TNF) pojačava eksprimiranje adhezivnih molekula na endotelnim ćelijama i aktivira adherirane neutrofile, dovodeći do oksidativnog praska koji je praćen generisanjem slobodnih radikala kiseonika. Oni dalje direktno oštećuju endotelne ćelije dovodeći do izlivanja u okolno tkivo. Shodno tome kažemo da se sistemski inflamatorni proces odigrava sa obe strane endotela: i u krvnim sudovima i u okolnom tkivu (32, 46, 47).

Kako počinje sepsa? Kada se bakterijski proizvodi nađu u domaćinu, oni ga ne ubijaju direktno, već aktiviraju ćelije monocitno/makrofagnog sistema, a zatim neutrofili i endotelne ćelije započinju aktivacionu kaskadu. Odgovor može da započne lokalno, ili u cirkulaciji, a zatim se širi sistemski na različita tkiva.

U membrani ćelija makrofaga, monocita i aktiviranih granulocita nalaze se receptori proteinske strukture poznati kao receptori endotoksina (CD14). Takođe, u plazmi postoji nekoliko rastvorljivih faktora koji vezuju endotoksin i utiču na njegove biološke efekte. To su lipopolisaharidni vezujući protein (*Lipopolisacharid binding*

*protein– LBP*) i baktericidni protein koji povećava permeabilitet (*BPI*). Oba proteina specifično vezuju endotoksin za terminalnu amino grupu stvarajući kompleks sa lipidom A bakterije. Osim toga sistemski odgovor na endotoksin podstiče i aktivira CD14, ali i *Toll-like* receptor 4 i MD-2 protein (Slika 4). Organizam prepoznaje određene mikrobne molekule kao znak da je mikroorganizam izvršio prodor. Lipopolisaharid (LPS tj. endotoksin) najmoćnija je signalna molekula gram negativnih bakterija. Vezivanjem lipopolisaharida (LPS) gram negativnih bakterija (endotoksin) za LBP obrazuje se kompleks koji se vezuje za CD14 (receptorske površinske molekule na monocitima) čime se olakšava interakcija sa makrofagima koja se i odvija preko proteina CD14 kao receptora za endotoksin. LBP je hepatski protein akutne faze koji veže LPS u kompleks koji se vezuje za CD14 receptor i indukuje sekreciju citokina. Lipopolisaharid aktivira i endotelne i epitelne ćelije uz prisustvo LBP i CD14, iako one nemaju CD14 u svojoj membrani, ali je proces omogućen rastvorljivim CD14 molekulima koji su prisutni u cirkulaciji. Velika koncentracija rastvorljivih CD14 molekula može da spreči stimulaciju monocita lipopolisaharidom. Ćelijski odgovor na LPS podrazumeva stvaranje i oslobađanje medijatora koji umnožavaju i prenose mikrobne signale na druge ćelije i tkiva (32, 47–49).



Slika 4. Stvaranje kompleksa LPS-LBP-CD14

Peptidoglikan i lipotehionske kiseline gram pozitivnih bakterija, određeni polisaharidi, enzimi i toksini izazivaju odgovor sličan onome koji indukuje LPS.

Septični šok udružen sa gram negativnom bakterijskom infekcijom, jedan je od vodećih uzroka smrti u intraabdominalnim infekcijama. Endotoksin ovih bakterija započinje aktivaciju nastanka septičnog šoka uz stimulaciju citokina. Iako su endotoksini različitog bakterijskog porekla, molekularna struktura i biološka svojstva su im vrlo slična. Ono najvažnije, da bi ispoljio svoj patološki efekat endotoksin se mora osloboditi iz bakterijske ćelije, a kada se to desi endotoksin se brzo vezuje za različite plazmatske proteine, aktivirajući čitav niz reakcija od kojih su neke i neželjene odbrambene reakcije organizma. Efekti endotoksina (Tabela V) zavise, pre svega, od njegove količine (koncentracije) u cirkulaciji (50, 51).

Tabela V Efekti endotoksina na organizam

<b>sistemske odgovore</b> groznica, povišena temperatura	<b>hematološke promene</b> leukocitoza
<b>disfunkcija organa</b> kardiovaskularni sistem respiratorni sistem digestivni sistem urogenitalni sistem	<b>humoralni odgovor</b> fibrinoliza hemostaza sistem komplementa
<b>metabolički odgovor</b> potrošnja kiseonika metabolički substrati	<b>inflamatorne ćelije</b> neutrofili alveolarni makrofagi
<b>endokrini odgovor</b> hipotalamička osovina stres hormoni	<b>citokinski odgovor</b> TNF, IL-1, IL-6, IL-8 anticitokinski molekuli
<b>jetra</b> proteini akutne faze i neopterin	

Efekti endotoksina na kardiovaskularni sistem odlikuju se pojačanom srčanom radnjom, ubrzanjem pulsa i povećanom potrošnjom kiseonika (za oko 50%) što će usloviti brži prolaz krvi kroz bubrege i pad vaskularnog otpora. Da bi se prilagodio

novonastalom stanju u organizmu dolazi do preraspodele krvotoka što je i uvod u hiperdinamsku fazu šoka. Febrilno stanje svakako doprinosi pojačanom radu kardiovaskularnog sistema, ali je presudan direktan uticaj endotoksina. Promene respiratorne funkcije podrazumevaju primarno povećan broj respiracija, pad parcijalnog pritiska ugljen dioksida i tek kasnije promena u parcijalnom pritisku kiseonika kao i alveolarno-epitelne permeabilnosti. Endotoksin uzrokuje i značajna povećanja crevne i bubrežne permeabilnosti što će za posledicu imati izraženiju translokaciju bakterija i samog endotoksina pa i razvoj endogene sepse. Povećana potrošnja kiseonika glavna je metabolička promena u okviru endotoksemije. Najveća potrošnja kiseonika je, usled povećanog protoka krvi, na nivou splahničkog krvotoka pa se ova pojava praćena i povećanim metabolizmom naziva splahnički metabolički odgovor (50–52).

Pod klasičnim endokrinim odgovorom podrazumeva se sekrecija tzv. stres hormona koji održavaju homeostatske mehanizme za vreme sepse i septičnog šoka i to su: kortizol, glukagon i kateholamini. Prisustvo endotoksina u plazmi snažno utiče na hipotalamično-pituitarno-adrenalnu osovinu i uzrokuje snažno lučenje ACTH-a, hormona rasta, plazmatskih kateholamina endorfina i vazopresina. Endotoksin svojim delovanjem uzrokuje i promene u metabolizmu gvožđa u smislu pada njegovog nivoa u serumu. Iz jetre se oslobađaju i velike količine C-reaktivnog proteina čije je povećanje značajno jer se održava i 24 sata nakon poslednje endotoksinske stimulacije. Hematološki efekti endotoksina su različiti. U zavisnosti od količine endotoksina, u prvim satima, može doći do leukopenije koja se nastavlja leukocitozom uz pojavu nezrelih neutrofila i štapićastih ćelija. Evidentna je i monocitopenija, kao rezultat pada broja limfocita i monocita, a značajno se smanjuje i broj trombocita.

Ciljni organ za delovanje endotoksina je endotel krvnih sudova i to putem direktnog oštećenja ili preko sekundarnih medijatora (IL-1 ili TNF). Kontrola stvaranja fibrina zavisi od ravnoteže koja postoji između trombogenih faktora i zaštitnih mehanizama koji kontrolišu stvaranje tromba i fibrinolizu. Vrlo brzo nakon dejstva endotoksina i razvoja sepse dolazi do nakupljanja fibrina i mikrotromba, samim tim i aktivacije fibrinolitičkog sistema, a posledično do insuficijencije mikrocirkulacije (50, 53).

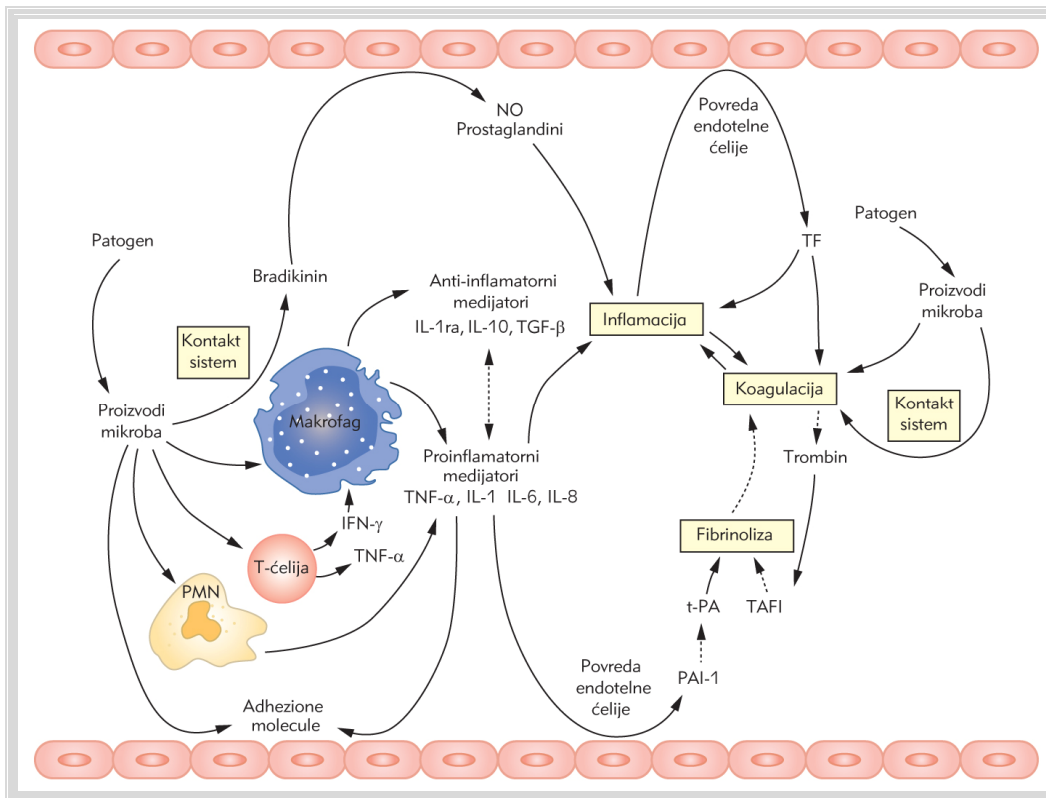
### 1.6.1.Uloga zapaljenskih medijatora

Značajni faktori koji određuju tip, karakter i intenzitet zapaljenske (inflamatorne) reakcije nazivaju se inflamatorni medijatori. Oni potiču iz različitih tkiva i organa i to iz plazme, ćelija i oštećenih tkiva i to su:

1. Vazoaktivni amini
2. Plazma proteaze
  - kininski sistem (bradikinin i kalikrein)
  - sistem komplementa (C3a, C5a, C5b-9)
  - koagulacioni sistem
3. Metaboliti arahidonske kiseline
  - Preko cikooksigenaze (endoperoksidaze, prostaglandini, tromboksan)
  - Preko lipooksigenaze (leukotrijeni)
4. Lizosomalni konstituenti
5. Slobodni kiseonični radikali
6. Faktori aktivacije trombocita
7. Citokini i dr.

Medijatori imaju sledeće osobine:

- nisu prisutni u aktivnoj formi u normalnim fiziološkim uslovima,
- ako se i mogu odrediti u normalnim fiziološkim uslovima njihova koncentracija ne sme biti velika,
- njihova aktivnost može biti umanjena specifičnim inhibitorima tako da nakon njihove aktivacije dovode do:
  - teških toksičnih oštećenja,
  - hemodinamske nestabilnosti,
  - respiratorne insuficijencije,
  - povećanja ili smanjenja biomarkera inflamacije,
  - morfoloških oštećenja organa – MODS.



Slika 5. Povezanost sistema medijatora u inflamaciji (47)

Grupi medijatora koji učestvuju u ranim fazama inflamatorne reakcije pripadaju vazoaktivni amini tj. histamin i serotonin. Nalaze se u granulama mastocita, bazofila i trombocita i uzrokuju vazodilataciju i povećanu vaskularnu permeabilnost. Iz mastocita ih oslobađaju supstance kao što su: fizički agensi (trauma, hladnoća), interleukini i imunološke reakcije (receptori na mastocitima koji vezuju IgE, C3a i C5a). Oslobađanje histamina i serotonina iz trombocita nastaje nakon agregacije trombocita posle kontakta sa kolagenom, trombinom, ADP i antigen-antitelo kompleksima. Agregaciju trombocita sa posledičnim oslobađanjem histamina može uzrokovati i PAF (*Platelet-activating factor*) oslobođen u procesu IgE imunoloških reakcija (32, 47).

### 1.6.1.1. Proteaze plazme

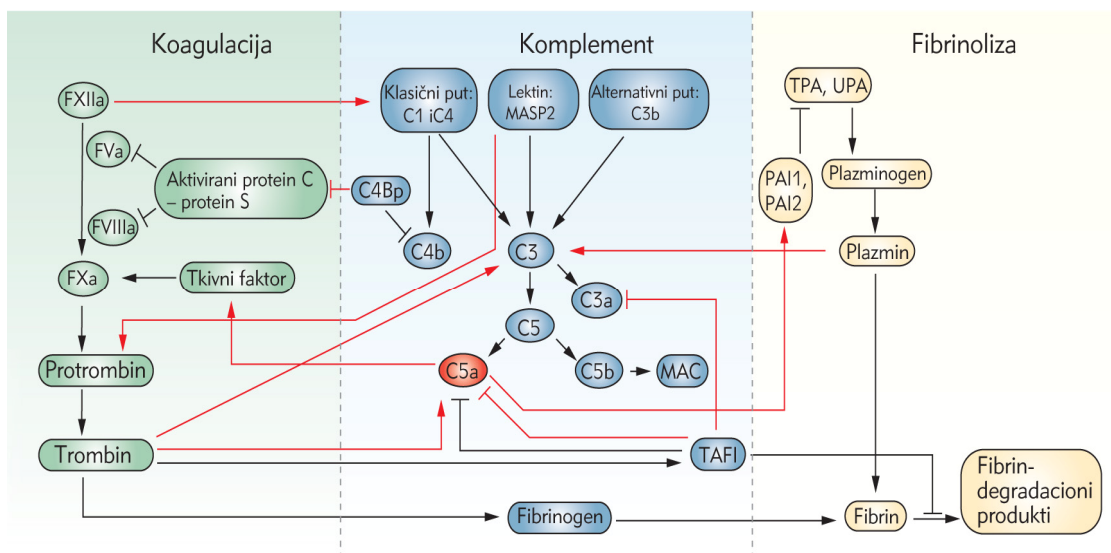
Proteaze plazme podrazumevaju tri međusobno povezana sistema i to su: kininski sistem, sistem komplementa i koagulacioni sistem. Kinini su primarno vazoaktivni, dok su komponente komplementa i vazoaktivni i hemotaktični. Krajnji

rezultat aktivacije kininskog sistema je stvaranje bradikinina koji primarno povećava permeabilnost krvnih sudova, a dovodi i do kontrakcija glatke muskulature i dilatacije krvnih sudova. Inicijalni proces počinje aktivacijom Hagemanovog faktora, nakon kontakta sa površinski aktivnim supstancama tipa kolagen bazalne membrane i endotoksin. Aktiviran Hagemanov faktor inicira promene u koagulacionom, fibrinolitičkom i kininskom sistemu. Proizvod ove kaskade je kalikrein, koji cepa HMWK (*High Molecular Weight Kininogen*) pri čemu nastaje i bradikinin. Kalikrein sam po sebi, preko mehanizma povratne sprege, dovodi do (auto)amplifikacije inicijalnih stimulusa.

Sistem komplementa funkcioniše kao deo imunog sistema organizma i podrazumeva blizu 20 proteina čiji biološki efekti su vaskularna permeabilnost, hemotaksa, opsonofagocitoza i liza bakterijske ćelije. Ovi proteini, imunološki različiti, cirkulišu u krvi i intersticijalnim tečnostima. Imaju sposobnost reakcije sa kompleksima antigen-antitelo, sa njima pojedinačno, ali i sa ćelijskim membranama tako da lako uništavaju bakterije, ali i ćelije samog organizma. Njihovo mesto sinteze je jetra, a u krvi su normalno prisutni u inaktivnom stanju. Aktivacija sistema komplementa indukuje čitav niz različitih biohemijskih reakcija u procesu eliminacije mikroorganizama. Niz komponenata tipa C5b, C6, C7, C8 i C9, ispoljava litička svojstva, a njihova aktivacija uslovljena je ili prisustvom samog uzročnika ili imunim kompleksima. U toku sekvence sistema komplementa, brojni fragmenti se vezuju za prisutne aktivatore (opsonizacija) čime se omogućava vezivanje za specifične receptore fagocita i dalje uklanjanje aktivatora iz organizma. U toku zapaljenskih reakcija najvažniju grupu fragmenata predstavljaju anafilotoksini C3a, C4a i C5a, koji povećavaju vaskularnu permeabilnost i indukuju kontrakcije glatke muskulature. C3a komponenta komplementa direktno aktivira trombocite sa posledičnim otpuštanjem vazoaktivnih medijatora, a zajedno sa komponentom C5a reaguje sa mastocotima i bazofilnim granulocitima što će uzrokovati oslobađanje histamina i drugih vaskularnih vazodilatatornih medijatora. Aktivirane komponente mogu takođe, mobilisati leukocite iz koštane srži kao i ubrzati adherenciju i agregaciju granulocita ka vaskularnom endotelu. C5a ima ulogu i u hemotaksi, ali i stimulaciji granulocita, monocita i makrofaga u eliminaciji bakterija putem aktivacije lizozomalnih enzima i oslobađanja slobodnih kiseoničnih radikala. Pojedini elementi sistema komplementa aktiviraju i



arahidonsku kaskadu, indukujući stvaranje u monocitima IL-1 i TNF. Kada se aktivacija i otpuštanje citokina vrši usled delovanja endotoksina, tada se efekat aktivacije komplekta ogleda u povećanju produkcije citokina. C5a je taj koji povećava otpuštanje IL-6 koji je vrlo potentan stimulator mononuklearne sekrecije citokina.



Slika 6. Plazma proteaze u inflamatornom odgovoru (48)

Snižene koncentracije komponenti sistema komplekta u toku sepse su posledica povećane potrošnje ovih faktora u toku infekcijske reakcije. Smatra se da postoji inverzna korelacija između nivoa C3a i C4a sa padom broja trombocita i broja leukocita, što upućuje na moguću ulogu u adherenciji ovih ćelija u mikrocirkulaciji.

Aktivacija komplekta može imati značajnu ulogu u patogenezi cirkulatornih promena u septičnom šoku, koji se razvija uglavnom kod bolesnika sa gram negativnom bakterijskom infekcijom. Pojava C3a i C5a komponenti komplekta u plazmi direktno je povezana sa pojavom endotoksina pa se zato one nazivaju i endotoksin zavisne komponente (32, 46–49).

### 1.6.1.2. Sistem koagulacije

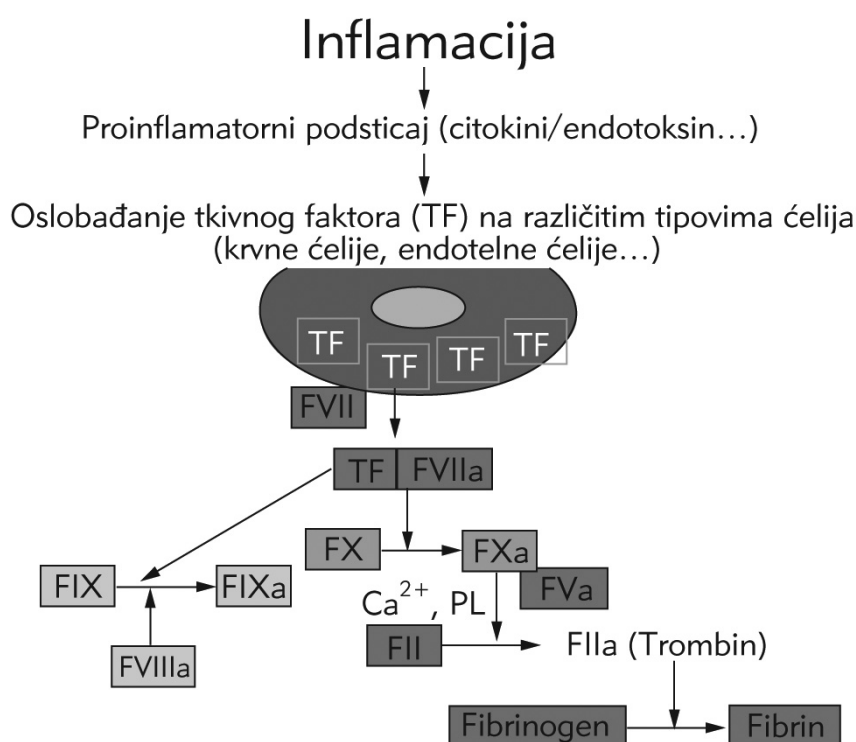
Inflamacija i hemostazni sistem su međusobno povezana dva patofiziološka procesa koji značajno utiču jedan na drugi. U tom dvosmernom odnosu, upala dovodi do aktivacije hemostatskog sistema koji zauzvrat takođe značajno utiče na upalne aktivnosti (55). Lokalna aktivacija hemostatskog sistema je bitan deo odbrane domaćina i kod zaraznih i nezaraznih inflamatornih stanja. Ipak, preterana i nedovoljno kontrolisana hemostatska aktivnost izazvana zapaljenjem može znatno doprineti težini bolesti. Primer kliničkog stanja u kome postoji čvrsto međusobno zavisna veza između upale i hemostaza koja značajno doprinosi patogenezi i/ili progresiji bolesti su sistemski inflamatorni odgovor (SIRS) na infekciju i sepsa. Upala pomera hemostatsku aktivnost prema prokoagulantnom stanju od sposobnosti proinflamatornih medijatora da aktiviraju sistem koagulacije i da inhibiraju antikoagulantnu i fibrinolitičku aktivnost. Kada dođe do aktiviranja hemostatskih sistema u inflamatornim stanjima, pojačanje hemostatskih poremećaja može dovesti do tromboze i oštećenja organa. Zauzvrat, nekontrolisano aktiviranje hemostatskih sistema može takođe pojačati inicijalni inflamatorni odgovor i na taj način izazvati dodatna oštećenja organa. Hemostatski sistem djeluje zajedno sa inflamatornom kaskadom stvarajući ciklus upala-hemostaza u kome svaki aktivirani proces promoviše onaj drugi, a oba sistema funkcionišu na principu pozitivne povratne sprege. Cilj upale je da se obnovi integritet ugroženih ili oštećenih tkiva zaraznog patogena. S druge strane, hemostaza je fiziološki odbrambeni mehanizam da se zaustavi krvarenje usled oštećenja zida krvnog suda (56). Aktivirajući se povredom zida krvnog suda, hemostatski sistem se sastoji od složene mreže pojedinačnih komponenti. Glavnu ulogu u procesu stvaranja trombocitnog ugruška imaju vaskularne endotelne ćelije i trombociti. Proces koji sledi je praćen aktiviranjem koagulacione kaskade, tzv. sekundarne hemostaze koja rezultuje stvaranjem stabilnog fibrinskog ugruška. Ovi procesi su čvrsto regulisani fiziološkim antikoagulantnim mehanizmima koji drže aktiviranje sistema koagulacije pod kontrolom i fibrinolitičkim sistemima koji su odgovorni za degradaciju fibrinskog ugruška koji je ispunio svoju funkciju (57). Tokom inflamatornog odgovora, inflamatorni medijatori, naročito proinflamatorni citokini, igraju centralnu ulogu u uticaju na hemostatski sistem. Medijatori zapaljenja okidač su poremećaja u nekoliko mehanizama, uključujući

disfunkciju endotela ćelija, povećanu aktivaciju trombocita, kada posreduje tkivni faktor (TF) čime se pokreće aktivacija plazma kaskade koagulacije i dolazi do poremećaja fizioloških funkcija antikoagulantnih puteva i supresije fibrinolitičke aktivnosti (58). U fiziološkim uslovima, uloga netaknutog endotela je da kao antitrombotska površina sprečava neprikladno aktiviranje koagulacije. Endotelna ćelija je glavni proizvođač komponenti sa proinflamacijskim, prokoagulantnim i antifibrinolitičkim aktivnostima, kao i onih sa suprotnim delovanjem, odnosno antikoagulantnim, antiinflamatornim i profibrinolitičkim svojstvima. Bez obzira na njenu etiologiju, upala dovodi do neravnoteže između proinflamatornih i prokoagulantnih, antiinflamatornih i antikoagulantnih svojstva endotela što će doprineti remećenju hemostatskog sistema. Jednom aktiviran ili povređen, endotel luči u lokalnu sredinu uglavnom prokoagulantne ili antifibrinolitičke komponente, kao što su von Willebrandov faktor (vWF) i tromboksan A2 (TXA2) dok je sekrecija komponenti sa antikoagulantnim i profibrinolitičkim svojstvima značajno smanjena. Pored toga, aktivirani endotel može stvoriti na svojoj površini tkivni faktor (TF) i adhezivne molekule, kao što su P i E selektini, vaskularni ćelijski adhezivni molekul-1 (VCAM-1) i međućelijski ćelijski adhezivni molekul-1 (ICAM-1). Adhezivni molekuli imaju važnu ulogu u posredovanju neutrofila i trombocita sa endotela, a samim tim u napredovanju hemo-inflamatorne reakcije. Fiziološki inhibitor koagulacije, kao što je protein C (PC) je povezan na endotel, tako da endotelne ćelije igraju ključnu ulogu i u održavanju funkcije antikoagulantnih mehanizama. Kao rezultat poremećene ravnoteže usled zapaljenja, funkcija endotela pomera se iz antikoagulantnog, antiinflamatornog i vazodilatatornog na proinflamatorni i prokoagulantni status (59).

Pored važne uloge u hemostazi, trombociti imaju važnu ulogu u upali delujući kao proinflamatorne ćelije. U fiziološkim uslovima, trombociti cirkulišu u stanju mirovanja, zaštićeni od aktivacije inhibitornih medijatora, kao što su azot monoksid (NO) i prostaciklin (PGI2) oslobođeni iz netaknutog endotela. Brojni faktori uzrok su aktivacije trombocita tokom inflamatornog odgovora. Disfunkcija endotela dovodi do povećane reaktivnosti trombocita usled povećane proizvodnje TXA2 i vWF i smanjene proizvodnje PGI2. Trombociti se mogu i direktno aktivirati uz medijatore inflamacije, kao što su proinflamatorni citokini ili aktiviranjem faktora trombocita (PAF). Takođe, trombin generisan aktiviranom kaskadom koagulacije je jedan od najjačih aktivatora

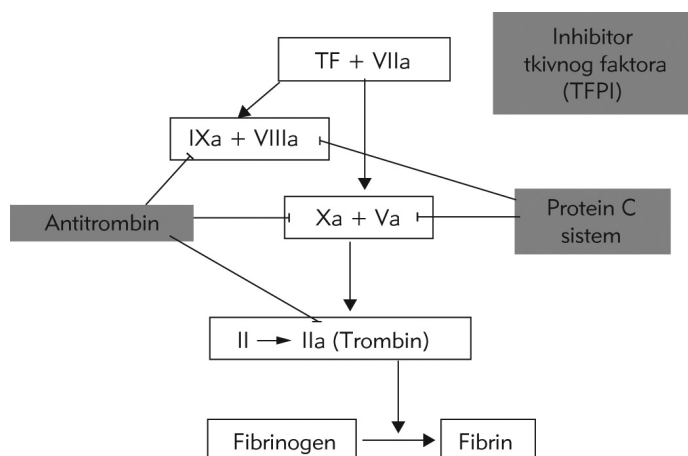
trombocita. Nakon aktiviranja, trombociti će pretrpeti promenu oblika sa diska u sferni oblik ćelije i dalje lučiti u lokalnu sredinu niz proinflamatornih i prokoagulantnih supstanci kao što su adhezivne molekule, faktori rasta, citokini i hemokini (60, 61).

Glavni mehanizam koagulacije u inflamaciji biva aktiviran posredovanjem tkivnog faktora (TF). To je transmembranski protein koga stvaraju ćelije cirkulacije krvi i endotelne ćelije, ali za razliku od ostalih faktora koagulacije obično nije u direktnom kontaktu sa krvlju. Kada je narušen integritet zida krvnog suda oslobađa se TF kao odgovor na različite proinflamacijske nadražaje (62, 63). Pojava tkivnog faktora je indukovana u različitim tipovima ćelija, pre svih kod leukocita (pretežno monocita i makrofaga) i ćelija endotela, što mu omogućava ulaz u cirkulaciju. Pri izlaganju krvi, TF vezuje faktor VII i kompleks TF-FVIIa inicira aktiviranje koagulative kaskade kroz konverziju faktora koagulacije FIX i FX u aktivirane forme (FXa i FIXa) čime se stvara trombin (FIIa) čija je ključna uloga konverzija fibrinogen u fibrin (Slika 7).



Slika 7. Aktivacija sistema koagulacije indukovana inflamacijom (64)

Tri glavna antikoagulantna mehanizma uključena u regulaciju aktivacije koagulacije su antitrombin III (AT III), protein C sistem i inhibitor tkivnog faktora (TFPI). Antitrombin je glavni inhibitor trombina, FXa i FIXa. Protein C proteolitički inaktivira aktivirane koagulative kofaktore FVa i FVIIIa. TFPI je glavni inhibitor TF-FVIIIa kompleksa (slika 8).



Slika 8. Fiziološki antikoagulantni mehanizmi (64)

Glavna funkcija ovih inhibitora koagulacije je da spreči zgrušavanje krvi pod fiziološkim uslovima i da uspori aktivaciju kaskade koagulacije. Fiziološki inhibitori koagulacije pored njihovih antikoagulantnih dejstava imaju i anti-inflamatorno važne funkcije. Ipak, funkcija sva tri puta može biti narušena tokom upale izazivajući poremećaj sistema hemostaze (65).

Hemostaza se dodatno kontroliše fibrinolitičkim sistemom, u kojem je ključni enzim, plazmin koji nastaje iz plazminogena i degradira fibrinski ugrušaki. Inhibicija fibrinolitičkog sistema je još jedna važna komponenta u hemostatskom poremećaju koji nastaje tokom upalnih stanja. Početni akutni fibrinolitički odgovor u inflamaciji je prolazno povećanje fibrinolitičke aktivnosti posredovano hitnim oslobađanjem TPA (tkivni plazminogen aktivator) iz vaskularnog endotela. Povećana aktivacija plazminogena uzrokuje rast glavnog fibrinolitičkog inhibitora PAI-1. To će dovesti do smanjenja fibrinolitičke aktivnosti i kasnijeg neadekvatnog uklanjanja fibrinskog ugruška. Glavni regulatori aktivnosti PAI-1 aktivnosti su proinflamatorni citokini TNF i IL-1b, koji izazivaju produkciju PAI-1 iz ćelija endotela. Osim toga, trombocitne granule sadrže velike količine PAI-1 koji se otpušta njihovom aktivacijom, što može

dodatno povećati nivo PAI-1 i doprineti supresiji fibrinolize u zapaljenskom stanju. Takođe, i disfunkcija endotela izazvana zapaljenjem može rezultirati sa odloženom i smanjenom produkcijom TPA (64).

Sepsa predstavlja prekomerni sistemski odgovor na infekciju praćen nekontrolisanim aktivacijom zapaljenskog odgovora. S obzirom da su hemostaza i imuni sistem tesno povezani, prekomerni inflamatorni odgovor dovešće do sistemske aktivacije hemostaze. Lokalno aktiviranje koagulacije kod septičkih pacijenata je sastavni deo odbrane domaćina kao pokušaj da se iskoreni invazija mikroorganizama. Preterana reakcija na infekciju može da dovede do situacije u kojoj sistemsko aktiviranje samog hemostatskog sistema doprinosi težini bolesti, izazivajući sindrom poznat kao diseminovana intravaskularna koagulacija (DIK). Bolesnici sa teškim oblikom DIK imaju klinički manifestacije tromboembolijske bolesti ili klinički manje očigledne mikrovaskularne fibrinske depozite. Uz napredovanje sepse, napreduju i hemostazni poremećaji što rezultuje u opštem formiranju ugrušaka fibrina, mikrovaskularnom zakrčenju i smanjenju isporuke kiseonika ćelijama i tkivima uz naknadnu organsku disfunkciju (66). Većina septičnih pacijenata ima koagulacione abnormalnosti, rangiranih od suptilnih koje nisu klinički manifestne do teških poremećaja koagulacije, kao što su fulminantni oblik DIK, koga karakteriše istovremeno mikrovaskularna tromboza i obilna krvarenja iz raznih mesta koji su pokretačka snaga u akutnoj disfunkciji organa i smrti (67).

### **1.6.1.3 Metaboliti arahidonske kiseline**

Arahidonska kiselina se oslobađa iz membrana ćelija pomoću fosfolipaze A i u putu cikloksigenaze stvara prostaglandine i tromboksane. Takođe, proizvodi puta lipooksigenaze arahidonantnog metabolizma su leukotrijeni, moćni medijatori ishemije i šoka, gde leukotrijen B podstiče aktivaciju leukocita i učestvuje u lokalnom oštećenju krvnih sudova i trombozi. Oksidovani derivati arahidonske kiseline imaju više značajnih uloga u patofiziologiji te je njihovo učešće u inflamatornim reakcijama samo jedna od njih. Promene koje zahvataju arahidonsku kiselinu poznate su kao arahidonska kaskada. Ova kiselina pripada grupi nezasićenih masnih kiselina sa 20 ugljenikovih atoma koja se oslobađa direktno iz masnih depoa ili konverzijom iz linolne esencijalne

masne kiseline. Arahidonska kiselina ne postoji slobodna u ćeliji već esterifikovana u membranskom fosfolipidu, odakle se oslobađa nakon aktivacije celularnih fosfolipida mehanički, hemijskim ili fizičkim stimulusima ili pak preko npr. C5a komponente komplementa. Nakon aktivacije kaskada arahidonske kiseline ide na dva načina:

1. Putem ciklooksigenaze, u kome arahidonska kiselina prelazi u prostaglandin-endoperoksid i dalje pod dejstvom enzima nastaju tri produkta:

- Tromboksan A<sub>2</sub>(TXA<sub>2</sub>) – koga ima u trombocitima, kratkog je poluživota, potentni agregator trombocita i konstriktor krvnih sudova,
- Prostaciklin (PGI<sub>2</sub>) – nalazi se u zidu krvnih sudova, snažan je inhibitor agregacije trombocita i vazodilatator,
- Stabilni prostaglandini, PGE<sub>2</sub>, PGF<sub>2</sub>α, PGD<sub>2</sub>, koji lokalno dominantno deluju na tonus krvnih sudova i permeabilitet, a odgovorni su i za nastanak bola i groznice u toku inflamatornog procesa.

2. Putem lipooksigenaze koji dovodi do pretvaranja arahidonske kiseline u hidroksi-peroksi derivate eikozatetraenske kiseline (HPETE) i to u 12-HPETE u trombocitima i 5- tj. 15- HPETE u leukocitima. Daljom peroksidacijom 5-HPETE se prevodi u HETE (hidroksi eikozatetraenoična kiselina) koja predstavlja jako hemotaksično sredstvo za leukocite, a daje i leukotrijene. Poznati su leukotrijeni LTC<sub>4</sub>, LTD<sub>4</sub> i LTE<sub>4</sub> koji izazivaju vaskularnu konstrikciju, konstrikciju glatke muskulature digestivnog trakta i vazdušnih puteva, kao i pojačanu bronhijalnu sekreciju, dok je LTB<sub>4</sub> hemoatraktant za neutrofile (46, 47, 54).

#### **1.6.1.4. Lizosomalni konstituenti**

Neutrofili i monociti sadrže lizosomalne granule koje kada oslobode svoj sadržaj mogu doprineti pojačanom inflamatornom odgovoru. Neutrofili sadrže manje specifične granule sa laktoferinom, lizozimom, alkalnom fosfatazom i kolagenazom i veće azurofilne granule sa mijeloperoksidazom, lizozimom i elastazom. Sve ove supstance su izrazita inflamatorna sredstva, koja deluju tako što povećavaju permeabilitet (bilo direktno ili oslobađajući histamin), razlažu kolagen, fibrin, elastin i tako vrše destrukciju tkiva. Monociti i makrofage poseduju kisele hidrolaze, kolagenaze, elastaze i aktivator plazminogena i aktivni su u hroničnim inflamatornim

procesima. Lizosomalni konstituenti imaju veliki broj različitih inflamatornih uloga i pod kontrolom su inhibitora i to alfa-1 antitripsina, koji inhibira neutrofilnu elastazu, a sličnu ulogu vrši i alfa-2-makroglobulin (46, 47).

#### 1.6.1.5. Ostali zapaljenski medijatori

**Kiseonični slobodni radikali** su metaboliti nastali u neutrofilima i makrofagima koji se oslobađaju ekstracelularno nakon izlaganja hemotaksičnim agensima, imunim kompleksima ili u sklopu fagocitne aktivacije. Oni učestvuju u sledećim procesima:

- Oštećenja endotelih ćelija sa povećanom permeabilnošću kapilara,
- Inaktivacija antiproteaza sa posledično povećanom destrukcijom strukturnih komponenti tkiva (npr. elastin),
- Oštećenja drugih (tumorskih) ćelija.

U plazmi i intersticijalnoj tečnosti nalaze se protektivni mehanizmi koji eliminišu delovanje kiseoničnih radikala. To su ceruloplazmin, frakcija transferina koja ne sadrži gvožđe, enzim superoksid-dismutaza, enzim katalaza koji razlaže vodonik-peroksid, enzim glutation peroksidaza. Shodno tome, uticaj slobodnih kiseoničnih radikala u inflamatornim reakcijama zavisi od ravnoteže između produkcije i inaktivacije ovih metabolita od strane ćelija i tkiva.

Gas azot monoksid (NO) ima brojne funkcije u nastanku sepse. Enzim azot oksid sintetaza katalizuje reakciju sinteze azot monoksida. Lipopolisaharid (LPS), citokini i ostali proinflamatorni medijatori su moćni aktivatori ovog enzima. Prevelika produkcija azot monoksida doprinosu razvoju septičnog stanja i progredaciji u septični šok, jer azot monoksid izaziva relaksaciju glatkih mišića krvnih sudova, dovodeći do vazodilatacije i posledično do hipotenzije (47).

Slobodni radikali kao što su superoksid anjon, hidrogen peroksid, hidroksilni radikal i hipohlorna kiselina imaju fiziološku ulogu u neutralizaciji bakterija. Ipak gubitak kontrole vodi oksidativnoj modifikaciji biološki važnih molekula kao što su lipidi, proteini i nukleinske kiseline. Slobodni radikali izazivaju neenzimsku peroksidaciju lipida u ćelijskim membranama i u plazmi, dovodeći do formiranja bioaktivnih lipida, kao što su prostaglandinima slični molekuli. Takođe, dejstvom slobodnih kiseoničnih radikala nastaje i oksidativno oštećenje proteina, koji se nazivaju



uznapredovali produkti oksidacije proteina (tj. AOPPs – *advanced oxidative protein products*). AOPPs su sposobni da izazovu monocitni respiratorni prasak sa oslobađanjem inflamatornih medijatora te stoga predstavljaju novu klasu proinflamatornih medijatora, markera oksidativnog stresa i monocitne aktivacije (68, 69).

**Faktor aktivacije trombocita** (*Platelet Activation Factor–PAF*) je lipid-acetil glicerol etar fosfoholina, dobijen iz antigenski stimulisanih IgE senzitivnih bazofila. Uzrokuje agregaciju trombocita i oslobađanje aktivnih supstanci kao što su histamin i serotonin. Osim stimulacije trombocita, PAF uzrokuje bronhokonstrikciju kao i vazodilataciju i povećanu vensku permeabilnost (veću od histamina). Takođe, PAF uzrokuje povećanu adhezivnost leukocita na zidove endotela kao i hemotaksu pa i ranu leukocitnu infiltraciju. PAF direktno deluje na ciljne ćelije, ali i stimuliše sintezu ostalih medijatora, pre svih prostaglandina i leukotrijena (57, 58).

**Citokini** su polipeptidni proizvodi aktivacije limfocita i monocita, poznatiji kao limfokini i monokini, koji učestvuju u celularnom odgovoru, gde dovode do proliferacije limfocita, ali imaju važnu ulogu i u zapaljenskom procesu. Slični polipeptidi, mogu biti produkovani i od strane nelimfoidnog tkiva. Dva najvažnija citokina, medijatora inflamatornih reakcija, su TNF i grupa interleukina (IL-1, IL-6 i dr.). Kao i mnogi drugi citokini deluju na tri načina: autokrino (na sam limfocit), parakrino (na okolne ćelije) i endokrino (sa sistemskim dejstvom kao i drugi hormoni). IL-1 i TNF utiču na sistemsku akutnu fazu odgovora, udruženu sa infekcijom. Odgovorni su za nastanak groznice, sporotalasno spavanje, otpuštanje neutrofila u cirkulaciju, povećanje nivoa ACTH i kortikosteroida. TNF uzrokuje hemodinamske efekte septičnog šoka: hipotenziju, sniženje perifernog otpora, ubrzanje pulsa i sniženje pH krvi. IL-1 $\beta$  i IL-6 su takođe prisutni u krvi bolesnika sa septičnim šokom i svi oni deluju sinergistički jedan s drugim i s drugim medijatorima. Po principu pozitivne povratne sprege IL-1 i TNF $\alpha$  povećavaju svoju vlastitu sintezu (70).

**Faktor rasta i ostali medijatori** koji imaju hemotaktičnu aktivnost na leukocite proizvodi su razlaganja kolagena ili fibronektina (46, 47). Oni svoju ulogu ispoljavaju u hroničnim zapaljenskim procesima i u procesu zarastanja rana.

Vežano za ulogu inflamatornih medijatora (Tabela VI) treba naglasiti da:

1. Različiti sistemi medijatora svoje dejstvo ispoljavaju isprepletano što za posledicu ima produženu inflamacionu reakciju, i
2. Kod svih medijatora postoji savršen mehanizam ravnoteže između njih i njihovih inhibitora. U suprotnom organizam bi bio u stalnoj inflamatornoj reakciji, a to je inkompatibilno sa životom.
3. Iako su putevi aktivacije medijatora različiti kao i postojanje više kaskadnih sistema, postoji uniformnost njihovog delovanja sa sličnim efektima, izražena kroz pojave hemotakse i/ili promena permeabiliteta.

Tabela VI Medijatori zapaljenske reakcije

MEDIJATOR	IZVOR	DEJSTVO	
		vaskularna permeabilnost	hemotaksa
histamin, serotonin	mastociti, bazofili, trombociti	+	-
bradikinin	plazma	+	-
C3a i C5a	plazma preko jetre makrofagi	+	C5a
prostaglandini	ćelije	+	-
leukotrijen B4	leukociti	-	+
leukotrijen C4, D4 i E4	leukociti, mastociti	+	-
komponente lizozoma katjonski proteini	leukociti	+	+
neutralne proteaze	leukociti	+	-
kiseonični radikali	leukociti	+	/
PAF	leukociti i dr.	+	+
IL-1 i TNF	leukociti i dr.	-	+

## 1.7. Klinička slika i lečenje sepse

Na sepsu se lako posumnja kod bolesnika sa lokalnom infekcijom, koji naglo dobije povišenu temperaturu, groznicu, tahikardiju, tahipneju, poremećaj svesti i hipotenziju. Ipak, septički odgovor se može razvijati mnogo sporije i imati osetljivije pokazatelje. Neki bolesnici mogu imati normalnu telesnu temperaturu ili su čak pothlađeni. Takođe, hiperventilacija je često vrlo koristan oslonac za dijagnozu, kao i dezorijentacija, smetenost i drugi znaci encefalopatije. Hipotenzija i DIK stvaraju sklonost za akrocijanozu i ishemičnu nekrozu perifernih tkiva. Bakterijski toksini mogu se širiti hematogeno i uzrokovati difuzne kožne reakcije. Lezije ovog tipa mogu ukazati i na specifičnog patogena kao što je slučaj kod generalizovane eritrodermije kada je uzročnik sindroma toksičnog šoka *Staphylococcus aureus* ili *Streptococcus pyogenes*. Produžena ili teška hipotenzija može uzrokovati akutno oštećenje jetre ili ishemičnu nekrozu creva. U serumu se laktati rano povećavaju, usled povećane glikolize na periferiji s nepotpunom eliminacijom nastalih laktata i piruvata od strane jetre. Kako se hipoperfuzija razvija, tkivna hipoksija stvara još više laktata, pogoršavajući tako metaboličku acidozu. Koncentracija glukoze u krvi često su povećane, iako oštećena glukoneogeneza i jako oslobađanje insulina mogu dovesti ponekad i do hipoglikemije. Inhibitorno delovanje TNF na lipoproteinsku lipazu usloviće hipertrigliceridemiju. Faza akutnog odgovora izazvana citokinima inhibira i sintezu albumina, dok se pojačava sinteza ostalih proteina akutne faze, dakle C-reaktivnog proteina, fibrinogena, transferina i dr. Poremećen odnos ventilacije i perfuzije u ranoj fazi smanjuje  $pO_2$ , a povećana propustljivost alveolarnih kapilara dovodi do povećanja sadržaja vode u plućima što smanjuje rastegljivost pluća i utiče na izmenu kiseonika. Progresivni difuzni infiltrati, smanjena rastegljivost i arterijska hipoksemija (često otporna na nadoknadu kiseonikom) za posledicu će imati nastanak i razvoj akutnog respiracijskog distres sindroma (ARDS). Patogeneza ARDS-a podrazumeva lezije malih krvnih sudova pluća pod uticajem leukocita koji indukuju oštećenje endotela plućnih kapilara uz smanjenu funkciju respiratornih mišića što će još pogoršati hipoksemiju i hiperkapniju. Septični šok je obično posledica teškog pada sistemskog vaskularnog otpora, sveopšte loše distribucije krvotoka i funkcionalne hipovolemije koja je uzrokovana difuznim prelazom sastojaka krvi kroz kapilare. Minutni volumen je u

početku normalan ili povećan i uz smanjen sistemski vaskularni otpor znak je raspoznavanja između septičnog šoka i ostalih kao što su kardiogeni, opstruktivski i sl. Vrlo su česte i bubrežne komplikacije u obliku oligurije, azotemije, proteinurije i pojave nespecifičnih cilindara u urinu. Najčešće je to rezultat akutne tubularne nekroze koja nastaje usled hipotenzije i oštećenja kapilarnog sistema. Od laboratorijskih nalaza uočljiva je leukocitoza sa skretanjem u levo, trombocitopenija, hiperbilirubinemija i proteinurija. Kod leukocita se mogu uočiti toksične granule ili citoplazmatske vakuole. Kako septični odgovor postaje sve teži, pogoršava se stepen trombocitopenije što će usloviti produžetak trombinskog vremena, povećanje fibrinogena i prisustvo D-dimera što sve sugerše nastanak DIK-a. Hiperventilacija u ranoj sepsi uzrokuje respiracijsku alkalozu. Daljim zamaranjem respiratornih mišića i nakupljanjem laktata nastaje metabolička acidoza. Rezultati acidobaznog statusa u arterijskoj krvi ukazuju na hipoksemiju koja se u početku može ispraviti terapijom čistog kiseonika, ali kasnije ona postaje otporna na ovaj vid terapije (54, 71, 72).

Za **dijagnozu sepse** neophodno je dokazati da je sindrom sistemskog upalnog odgovora tj. SIRS uzrokovan mikrororganizmom. Konačna dijagnoza zahteva izolaciju mikroorganizma iz krvi ili mesta gde je žarište infekcije. Mikrobiološka ispitivanja treba izvesti promišljeno i pažljivo. Naime, gram negativna bakterijemija tipično je niskog stepena, do 10 mikrororganizama/mL krvi, pa je možda potrebno i više hemokultura ili produžena inkubacija da bi se postavila dijagnoza.

Uspešno **lečenje sepse** zahteva hitne mere za lečenje lokalne infekcije, osiguranje hemodinamske i respiratorne podrške i eliminaciju patogenog mikrororganizma. Antimikrobnu terapiju treba započeti odmah nakon što su uzeti kultivisani uzorci krvi i/ili iz odgovarajućih lokalnih žarišta. Dok se čekaju rezultati mikrobioloških ispitivanja empirijsko antimikrobno lečenje obično bi trebalo biti delotorno protiv uzročnika. Kada se saznaju rezultati kultura, lečenje se može pojednostaviti budući da je dovoljan jedan lek za lečenje infekcija s poznatim patogenom. S druge strane kombinacija baktericidnih lekova (npr laktam i aminoglikozid) može biti indicovana za potpuno lečenje sepse kod postojeće neutropenije ili sepse uzrokovane sojevima *Pseudomonas aeruginosa* tj. *Enterococcus* gde je dokazan antimikrobni sinergizam.

Odstranjivanje i drenaža izvora infekcije jako je važna u procesu lečenja naročito kada se otkriju mesta prikrivene infekcije. Tu se pre svega misli na prisustvo katetera, tubusa i njima sličnih medicinskih sredstava.

Hemodinamska podrška ima za cilj ponovno uspostavljanje narušenog obezbeđivanja tkiva kiseonikom i hranljivim materijama. S obzirom na rani pad efektivnog volumena u vaskularnom sistemu početno lečenje podrazumeva intravensku primenu tečnosti npr. fiziološkog rastvora. Neophodno je i stalno praćenje i održavanje centralnog venskog pritiska, a da se izbegne mogući edem pluća i da se održava diureza. Vrlo često se koristi kao presorno sredstvo dopamin, koji u niskim dozama ima beta-adrenergično dejstvo te povećava minutni volumen srca. U većim dozama potreban je oprez jer može doći do stimulacije alfa-adrenergičnih receptora što će dovesti do periferne vazokonstrukcije s ishemijom i gangrenom. Ako su pacijenti hipotenzivni i nakon terapije dopaminom primenjuje se i noradrenalin koji stimulatorno deluje na alfa-1-adrenergične receptore. Vrlo često se koriste niske doze dopamina u kombinaciji sa noradrenalinom, a sve u svrhu održavanja odgovarajuće perfuzije bubrega i creva i postizanja maksimalne presorne podrške. Da bi se osigurala odgovarajuća oksigenacija vrlo često se pristupa i intubaciji. Ako je dostava kiseonika oštećena usled niske koncentracije hemoglobina indikovane su transfuzije krvi tj. svežih eritrocita. U lečenju metaboličke acidoze, kada je pH manji od 7,2, mogu se koristiti i bikarbonati.

Međutim, smrtnost kod sepse je velika uprkos ranoj dijagnozi, hirurškoj drenaži žarišta infekcije i adekvatnoj terapiji. Shodno tome sve veća pažnja usmerena je na moguću primenu sredstva tj. leka koji neutrališe bakterijski endotoksin (naročito kod gram negativne sepse) i/ili leka koji utiče na jedan ili više medijatora inflamatornog odgovora.

Eksperimentalne terapijske intervencije podrazumevaju :

A. Sprečavanje aktivacije ćelije domaćina kroz primenu

- Antiendotoksinskih sredstava – antitela na lipid A, tj. na toksični deo endotoksina u sastavu strukture LPS patogenih gram negativnih bakterija i
- LPS neutrališućih proteina (rastvorljivi rekombinantni CD14)

- B. Inhibiciju medijatora primenom tzv. antimedijatorskih sredstava kao što su npr. glukokortikoidi (blokatori PLA2), anticitokinski lekovi, antagonisti PAF-a, inhibitori NO sintaze, antikoagulansi (AT III, protein C) (54, 71–73).

### 1.7.1 Principi antibiotske terapije

Terapija intraabdominalnih infekcija (IAI) podrazumeva hiruršku intervenciju koja će sanirati infekcijski fokus, ali će se za potpuno uništenje bakterija-uzročnika iz intraperitonealnog prostora morati primeniti i antibiotska terapija. Antibiotsku terapiju treba započeti tek nakon operativnog zahvata tj. nakon uklanjanja sadržaja i uzimanja uzoraka za mikrobiološki pregled. Na ovaj način izbegnuta su dva štetna momenta prevremene primene antibiotika. Prvo, izbegnuta je brza i velika liza bakterijskih ćelija uz posledično oslobađanje endotoksina i drugo, antibiotici kratkotrajno deluju baktericidno što može dati negativne mikrobiološke nalaze iako je uzročnik još prisutan. Da bi se ispoljilo puno antibiotsko delovanje leka u tretmanu IAI, izabrani lek mora imati nisku toksičnost i izraženu efikasnost. Naime, hemijska struktura leka mora biti takva da onemogućava život bakteriji bilo kroz prekid ili poremećaj metabolizma, bilo kroz dezintegraciju određenih bakterijskih struktura. Takođe, za puno antibiotsko delovanje potrebno je savladati i mehanizme bakterijske rezistencije. Najoptimalniji efekat dejstva antibiotici postižu u zoni inflamacije jer je tu prisustvo bakterija najveće. Kada govorimo o toksičnosti tu je neophodan i uslov da lek sam po sebi nije toksičan, ali i da ga organizam ne metabolizuje u toksične produkte. U tom smislu opredeljujući faktori za izbor antibiotske terapije bili bi: antibakterijski spektar, empirijska rezistencija, mehanizam dejstva, farmakološka svojstva, štetne i neželjene pojave i toksičnost.

Glavni odbrambeni mehanizam gram negativnih bakterijskih ćelija je membrana koja je ujedno i put za delovanje antibiotika. Efikasnost leka ogleda se u njegovoj sposobnosti da dostigne ciljno mesto na bakterijskoj ćeliji, a da pri tome ne aktivira njen odbrambeni mehanizam. Relativno mala izmena u strukturi molekula antibiotika može da izmeni njegov stepen ulaska i poveća efikasnost prema bakterijama. Procena farmakokinetičkih osobina odnosi se na postizanje optimalne serumske koncentracije i načine izlučivanja. Kako se veliki broj infekcija odigrava van krvotoka to će serumske

koncentracije morati biti na tom nivou da se postigne adekvatna koncentracija u tkivu, naročito u zoni inflamacije. Idealan antibakterijski lek ispoljiće svoje efekte prema bakterijama, a da pri tome ne ispoljava neželjene pojave i toksičnost. Naime, primarno netoksičan lek može pri velikim koncentracijama u plazmi izazvati toksične efekte. Iz tog razloga je put eliminacije leka veoma značajan, naročito ako postoji hepatorenalna insuficijencija kod bolesnika.

U purulentnom sadržaju najčešće je prisutna polimikrobna mešovita flora što iziskuje adekvatnu antibiotsku terapiju da se pokrije i aerobna i anaerobna bakterijska flora. Prednost pri odluci o kombinaciji antibiotika imaće baktericidni lekovi čiji različiti mehanizmi osiguravaju pozitivan antibakterijski efekat. Potrebno je izabrati one antibiotike koji primarno deluju na vrlo otporne i rezistentne sojeve, ali pokazuju aktivnost i prema ostalim vrstama. Ako takva kombinacija primenjenih lekova pokazuje i efekat sinergizma, uspešnost terapije biće još izraženija. To se najlakše postiže ako se koriste antibiotici sa različitim mehanizmom delovanja npr. sinergizam betalaktamskih antibiotika i aminoglikozida. Beta laktamski antibiotici deluju na ćelijsku membranu, a aminoglikozidi na sintezu proteina. Osim toga, antibakterijski učinak beta laktamskih antibiotika na ćelijski zid pojačava ulaz aminoglikozida u ćeliju čime se postiže sinergističko delovanje kombinacije ova dva leka (7, 74, 75).

## 1.8. Biomarkeri sepse

### 1.8.1 Prokalcitonin

Još 1975. g. Moya i saradnici (76), su u toku ispitivanja biosinteze kalcitonina otkrili prokalcitonin (PCT), peptidni prekursor kalcitonina. Za prokalcitonin se znalo da je važan marker medularnog karcinoma tiroidne žlezde, a zatim su visoki nivoi ovog parametra dobijeni i kod bolesnika sa sepsom i akutnom malarijom. Nivo prokalcitonina u korelaciji je sa sepsom/septičnim šokom. Samo neopterin je sličan prokalcitoninu, ali se stvara i u nebakterijskim inflamatornim oboljenjima.

**Prokalcitonin** je prohormon kalcitonina, molekulske mase 13kDa, sa svim odlikama sekretornog proteina, koji se u normalnim metaboličkim stanjima produkuje i sekretuje samo iz C-ćelija tireoidne žlezde, nakon specifičnog intracelularnog proteolitičkog procesa iz prohormona prokalcitonina. Sinteza prokalcitonina, ali i kalcitonina, počinje translacijom prekursornog peptida tzv. preprokalcitonina, sastavljenog od 141 aminokiseline. Specifičnom intraćelijskom proteolitičkom razgradnjom odvaja se signalni peptid tj. AA 1-25 i nastaje propeptid, prokalcitonin, sa 116 aminokiselina, a zatim i hormonski aktivan 32 aminokiselinski peptid kalcitonin. Nakon odvajanja signalnog peptida od 25 aminokiselina, ostaje u lancu 116 aminokiselina na pozicijama od 26 do 141 tj. prokalcitonin čini N-terminalni region sa 57 aminokiselina, kalcitonin sa 32 AK i katakalcin sa 21 AK na pozicijama 121–141. Daljom transformacijom molekula prokalcitonina tj. odvajanjem katakalcina i N-ProCT kao i cikličnom formacijom, stvaranjem disulfidnih mostova, amidacijom na prolinu 32 i deglikolizacijom na asparaginu 3 nastaje kalcitonin. Nastali aktivni hormon se sekretuje u krv pa je kod zdravih osoba nivo prokalcitoninaa u plazmi veoma nizak ili nemerljiv (77).

Nasuprot tome, kod bolesnika sa bakterijskom infekcijom i sepsom, registrovane su visoke koncentracije intaktnog prokalcitonina. Istraživanja su pokazala da ovako visoki nivoi prokalcitonina ne potiče iz C-ćelija tireoidne žlezde već je prokalcitonin ekstratireoidalnog porekla. Eksperimentalnim studijama *in vitro* potvrđeno je da je makrofagno-monocitni sistem različitih organa mesto sinteze i



oslobađanja prokalcitonina u reakciji na bakterijsku infekciju. Kao glavno mesto sinteze najviše se spominje jetra, ali i neuroendokrine ćelije pluća i tankog creva. Pored prokalcitonina u plazmi bolesnika sa sepsom nađene su i druge komponente tj. fragmenti prohormona kalcitonina, ali je ipak prokalcitonin označen kao glavni proizvod. Prokalcitonin koji cirkuliše kod pacijenata sa sepsom sastoji se samo od 114 amino kiselina kojima nedostaje N-terminalni dipeptid Ala-Pro.

Infekcijom indukovani prokalcitonin oslobođen u cirkulaciju, nije glukolizovan odnosno ne dolazi do proteolitičkog cepanja njegovog molekula, pa se zato u plazmi nalazi kao visoko stabilni intaktni molekul prokalcitonin. Dok god postoji stalna inflamatorna stimulacija za transkripciju mRNA za prokalcitonin pod dejstvom citokina i endotoksina, a to se dešava u bakterijskoj infekciji, smanjena je preteoliza prokalcitonina u Golgi aparatu. Prema tome, visoke koncentracije prokalcitonina u serumu u skladu su sa ovim indukcionim mehanizmima produkcije kao i stabilnosti prokalcitonina. Za razliku od kalcitonina koji ima poluživot 10 minuta, prokalcitonin ima dugačak poluživot, u proseku od 19 do 24 časa (78, 79).

CALC-1 gen iz porodice kalcitonin gena, sa 4 člana, odgovoran je za produkciju kalcitonina i naravno njegovog prekursora – prokalcitonina. Smatra se da je ovaj gen odgovoran i za stvaranje inflamacijom indukovanih prokalcitonina, pri čemu se u toku teških bakterijskih infekcija i sepse u cirkulaciji nalaze mnogo veće količine prokalcitonina (77).

U fiziološkim uslovima ne dolazi do oslobađanja prokalcitonina u cirkulaciju pa su njegove koncentracije u krvi minimalne (ispod 0,05 ng/mL), dok u teškim infektivnim stanjima dostižu vrednosti preko 100 ng/mL. Molekul prokalcitonina pokazuje visoku stabilnost u uzorcima krvi. U plazmi, u *in vitro* uslovima, na sobnoj temperaturi i 24 sata nakon uzorkovanja, koncentracija prokalcitonina se smanjuje prosečno za 12%, a na nižoj temperaturi od 4 °C za oko 6%. Tip uzorka, plazma ili serum, kao ni vrsta antikoagulansa, ne utiču na koncentraciju prokalcitonina što olakšava njegovo određivanje bez dodatnih uslova.

Sinteza prokalcitonina može biti stimulirana unosom male količine bakterijskih endotoksina tj. lipopolisaharida (LPS) kao najpotentnijih stimulatora sinteze. Prokalcitonin se inicijalno detektuje u plazmi 6 do 12 sati nakon unosa, raste i pik dostiže nakon 12 do 24 sata da bi se u formi platoa održavao u sledeća 2–3 dana. Kada

se inflamatorni stimulus prekine ili ako se primeni adekvatna antibiotska terapija, koncentracija prokalcitonina se smanjuje. Dužina trajanja sinteze prokalcitonina i tip indukcije ukazuju da je produkcija prokalcitonina u korelaciji sa inflamatornom aktivacijom i odnosi se na proinflamatorne citokine. TNF $\alpha$  i ostali citokini indukuju prokalcitonin mRNA, ali glavni stimulus su ipak bakterijski endotoksini. Za razliku od prokalcitonina, citokini imaju kratak poluživot u cirkulaciji, te su i njihove fluktuacije veće, pa nivoi prokalcitonina značajno bolje od citokina koreliraju sa ostalim pokazateljima kliničke slike infekcije što prokalcitonin čini korisnim parametrom u kliničkoj praksi.

Indukcija prokalcitonina je vrlo brza. Nivo raste kao odgovor na stimulus u roku od 6 sati. Prateći početni rast, nivo prokalcitonina dalje zavisi od balansa između plazma poluživota prokalcitonina (19–24 sata) i nove produkcije prokalcitonina. Tako, na primer kod bolesnika u septičnom šoku nivo prokalcitonina ostaje visok jer je i produkcija produžena. Kod oporavljenih pacijenata, nakon 60 sati, primetno je smanjenje nivoa prokalcitonina za 50%, dok se kod umrlih nivo prokalcitonina održava jako dugo (nekoliko sedmica) (78).

Smanjenje koncentracije prokalcitonina kod bolesnika sa potvrđenom sepsom za preko 30%, samo 24 sata nakon početka terapije, u odnosu na vrednosti iz prethodnog dana, je u korelaciji sa kliničkim oporavkom. Pokazano je da su promene nivoa prokalcitonina u poređenju sa promenama C-reaktivnog proteina (CRP), mnogo brže, kako na početku tako i nakon prekida inflamatornih stimulusa jer se prokalcitonin brže vraća na bazalne vrednosti što ukazuje da se radi o parametru koji bolje prati klinički tok bolesti (80).

Napred je već navedeno da TNF- $\alpha$  kao i drugi proinflamatorni citokini dovode do porasta koncentracije intracelularne PCT-mRNA kao i da prokalcitonin poseduje imunomodulatorni efekat. Nylén i saradnici (81) su sproveli studiju, na animalnom modelu sepse, i pokazali da i.v. primena humanog prokalcitonina, a u vreme razvoja sepse indukovane unosom *E. coli*, značajno smanjuje preživljavanje eksperimentalnih životinja u odnosu na kontrolnu grupu. Naime, prokalcitonin nije pokrenuo inflamatorni niz, ali je delovao kao medijator koji podržava i povećava inflamatornu reakciju. S druge strane, primena antiseruma sa specifičnim antiPCT antitelima, koji će neutralisati cirkulišući prokalcitonin, povećala je preživljavanje septičnih životinja. Značajno

smanjenje mortaliteta zabeleženo je naročito ako su antitela data pre odnosno 1 sat nakon indukcije infekcije.

Pri vrednosti prokalcitonina manjoj od 0,5 ng/mL moguća je lokalizovana bakterijska infekcija, jer se pri toj vrednosti infekcija ne može isključiti. Poželjno je da se merenje ponovi nakon 6 tj. 24 sata zbog razvoja bolesti naročito ako se radi o početnom stadijumu oboljenja. Kada su vrednosti u opsegu od 0,5 do 2 ng/mL, verovatno je u pitanju sistemska infekcija, naravno, ako su isključena druga stanja koja dovode do sličnih vrednosti. U tom slučaju evidentan je rizik za napredovanje sistemske infekcije i razvoj sepse pa je neophodno pacijenta klinički i laboratorijski pratiti narednih 6 do 24 sata. Ako su vrednosti od 2 do 10 ng/mL, to je siguran pokazatelj sistemske infekcije uz visok stepen rizika za razvoj tzv. teške sepse. I konačno, vrednosti veće od 10 ng/mL ukazuju da je nastupio sistemski inflamatorni odgovor na tešku bakterijsku sepsu ili septički šok (82).

U sepsi nivoi prokalcitonina kreću se u opsegu od 10 do 100 ng/mL, ali u pojedinim slučajevima sepse i preko 1000 ng/mL. Ipak visoke vrednosti prokalcitonina kod bolesnika sa sepsom mogu imati i prognostičke implikacije tj. koristi se za procenu uspeha terapijskog tretmana. Apsolutna koncentracija prokalcitonina u krvi povećava se linearno sa težinom oboljenja. Preporuka je da se vrednost ovog parametra analizira zajedno sa ostalim laboratorijskim nalazima i kliničkim znacima bolesnika (83).

Pitanje o specifičnoj indukciji prokalcitonina u različitim telesnim tečnostima ima negativan odgovor. Nema specifičnog porasta prokalcitonina u specijalnim telesnim tečnostima kao npr. u likvoru u meningitisu, ascitu u peritonitisu ili pleuralnoj tečnosti kod pneumonije. Koncentracija je niska čak i kada je visoka u plazmi. Izuzetak je ascit gde je koncentracija approx 2/3 od koncentracije u plazmi i nikad ne premašuje vrednost plazma koncentracije. U urinu se može detektovati approx 25% plazma koncentracije (77).

Hronične, nebakterijske inflamacije ne indukuju stvaranje prokalcitonina, kao ni autoimuni poremećaji i poremećaji praćeni simptomima inflamacije kao što su vaskulitis, artritis, sistemski lupus eritematosus. Kod bolesnika sa malignim tumorima zabeležene su blago povećane vrednosti prokalcitonina, i to kod medularnog karcinoma tireoidee, karcinoma pluća i bronhijalnog karcinoma. Kod HIV pacijenata nisu registrovani povećani nivoi prokalcitonina osim u slučajevima terminalnog stadijuma

ove bolesti, kada je moguće prisustvo jake infekcije. Slična povećanja nalaze se kod akutnog hepatitisa B kao i infekcije CMV. Kod bolesnika sa malarijom izmerene su povišene vrednosti prokalcitonina. Melioidoza je druga tropska bolest u kojoj su registrovane visoke koncentracije prokalcitonina, što i nije iznenađujuće s obzirom da je uzročnik ove bolesti bakterija iz grupe pseudomonasa tzv. *Burkholderia pseudomallei*. (84). Na polju hematologije i onkologije prokalcitonin se koristi za diferencijalnu dijagnozu groznica izazvanih lizom tumora ili hemoterapijom kod onkoloških pacijenata od onih sa infektivnom etiologijom. Prokalcitonin svoju primenu ima i kod transplatacije organa i to za diferencijalnu dijagnozu između akutnog odbacivanja organa ili između virusne infekcije i bakterijske infekcije. Ipak, danas je najpoznatija primena ovog parametra u pedijatriji i to kao pomoć u diferencijalnoj dijagnozi akutnog meningitisa bakterijske ili virusne etiologije i u akutnim groznicama nedonoščića/odojčadi za dijagnozu sistemske bakterijske infekcije.

Poslednjih godina prokalcitonin je dobio naziv tzv. **SMART** biomarkera sepse i infekcije. SMART su početna slova od karakteristika koje treba da ima jedan marker sepse kao što je prokalcitonin. Prokalcitonin poseduje specifičnost i/ili osetljivost (engl. **S**pecific & **S**ensitive), merljivost (engl. **M**earable) sa visokim stepenom preciznosti, lako je dostupan (engl. **A**available), odgovarajuć i ponovljiv (**R**esponsive & **R**e producible) i naravno blagovremen (engl. **T**imely) parametar za izvođenje dijagnoze i terapije (85).

### 1.8.2 Lipolisaharid vezujući protein (*LBP*)

*Toll like* receptor 4 (TLR4) ne može samostalno da prepozna i pokrene adekvatan odgovor na lipolisaharid (LPS) bakterije uzročnika infekcije. U ovaj proces su uključeni solubilni serumski glikoproteini koji vezuju LPS i to su LBP (engl. *Lipopolisaccharides binding protein*) i membranski receptorski proteini, CD14 i MD2. TLR4 formira kompleks sa MD2 na površini ćelije i zajedno čine glavnu komponentu za vezivanje LPS-a (Slika 4). Finalna multimerna formacija receptora, izgrađena od dve kopije TLR4-MD2-LPS kompleksa, započinje prenos signala aktiviranjem intracelularnih molekula. Prema strukturi i funkciji CD14 je složeni membranski protein sa glikozilfosfatidilinozitolom na ekstracelularnom domenu. Nakon vezivanja

LPS za LBP, nastali kompleks se udružuje sa CD14, pri čemu se LBP odvaja i vraća u cirkulaciju. Mnoge ćelije ne iskazuju CD14 na svojoj membrani. Ovo je slučaj sa epitelnim i endotelnim ćelijama koje su među prvima izložene napadu infektivnih mikroorganizama. Stoga, solubilna forma CD14 služi kao posrednik u aktivaciji TLR4 i TLR2 (86, 87).

LBP je rastvorljivi serumski glikoprotein koji pripada porodici lipid-vezujućih proteina koji uključuje i BPI protein (engl. *Bactericidal Permeability-Increasing protein*), fosfolipidni estar protein i holesterol estar protein. Sastoji se od 456 ostataka aminokiselina, sintetise se u hepatocitima i ćelijama crevnog epitela (88). U fiziološkim uslovima u serumu se nalazi u koncentracijama od 2 do 10 µg/mL, a nakon akutne faze inflamatornog odgovora vrednosti rastu i do 200 µg/mL za 24 sata. Ovaj porast u nivou LBP je izazvan transkripcionom aktivacijom gena za LBP posredovanog dejstvom citokina, interleukina 1 i interleukina 6 (89).

Niske koncentracije LBP poboljšavaju lipopolisaharidom infekta (LPS) indukovanu aktivaciju mononuklearnih ćelija, dok porast koncentracija LBP inhibira LPS indukovanu ćelijsku stimulaciju. LBP ima sposobnost vezivanja raznih lipopolisaharida tj. endotoksina, različitih sojeva gram-negativnih bakterija, pa i lipid A, lipidni ostatak lipopolisaharida. LPS molekuli koji predstavljaju komponente spoljašnje membrane gram negativnih bakterija su važni medijatori u patogenezi gram-negativne sepsse i septičnog šoka. S obzirom da je lipid A odgovoran za biološke aktivnosti LPS u većini *in vivo* i *in vitro* testovima, termin je nazvan endotoksični princip LPS (90).

LBP posreduje u prenosu LPS do lipoproteina velike gustine (HDL) čime se ukazuje na proinflamatornu aktivnost HDL, a ujedno i smanjuje aktivnost LBP. Dakle, nativni HDL (nHDL) odgovara na LPS u prisustvu inhibitornih koncentracija LBP. Ova aktivnost može biti inhibirana dejstvom tripsina na HDL. Za razliku od nHDL, lipoproteini male gustine (LDL) ne poseduju ovu aktivnost (91).

Povećani nivoi LBP mogu se detektovati nakon prodora gram pozitivnih tj. negativnih bakterija, ali i pojedinih gljivičnih patogena što znači kod bolesnika sa sepsom, abdominalnom infekcijom, meningokoknom infekcijom, kod ulcerativnog kolitisa i nekih drugih oboljenja. Vrednosti LBP iznad gornje granice referentnog opsega ukazuju na mogućnost teške lokalne infekcije i sistemske bakterijske ili

gljivične infekcije, pa se može koristiti i u diferencijaciji ovih vrsta infekcija od ostalih uzročnika inflamacije kao što su virusi, paraziti i slično (92, 93).

### 1.8.3. Interleukin 6

Interleukin 6 (IL-6) je citokin sa širokim spektrom bioloških aktivnosti, u procesima akutne faze inflamacije, onkogeneze i hematopoeze. Proizvode ga limfne i nelimfne ćelije, od jednog gena kao proizvod od 212 aminokiselina, koji cepanjem N-terminalnog dela gradi peptid od 184-aminokiselina molekulske mase u rasponu od 22 do 27 kDa (zavisno od stepena glikozilacije na pozicijama 73 i 172). Ima dvojaku ulogu tj. može da deluje proinflamatorno, ali i antiinflamatorno. Proinflamatorno deluje inicirajući imuni odgovor u organizmu, jer endotoksin izaziva i pojačava njegovu produkciju u monocitima i fibroblastima, dok ga glukokortikoidi inhibiraju (94).

Uloga interleukina 6 kao antiinflamatornog faktora je posredovana njegovim inhibitornim delovanjem na tumor nekroza faktor (TNF) i interleukin 1(IL-1) i aktiviranjem interleukina 10 (antinflamatorni citokin).

IL-6 je i rani indikator i posrednik sepse. Njegova proizvodnja je vrlo brzo indukovana u toku akutne inflamatorne reakcije povezane sa infekcijom, povredom, traumom i sličnim stanjima. Oslobođanje IL-6 je stimulirano tumor nekroza faktorom (TNF) i IL-1, ali i dalje postoji u plazmi mnogo duže nego ovi drugi proinflamatorni citokini. Kao takav, IL-6 je koristan marker proinflamatorne i citokinske aktivacije. Sa vremenom poluzivota od 45 minuta koristi se za praćenje bolesnika nakon operativnih zahvata, kod trauma i teških infekcija (sepse). Nekoliko manjih studija su pokazale pozitivnu korelaciju između koncentracije IL-6 u plazmi na prijemu i posledičnog mortaliteta. Koncentracija IL-6 u plazmi je bila direktno povezana sa rizikom od smrti kod pacijenata sa intra-abdominalnom sepsom (95–97). Kao medijator sepse, IL-6 pokazuje i stepen povezanosti upale i tromboze u sepsi, jer učestvuje u stvaranju trombogenih fragmenata von Willebrandovog faktora. Interleukin 6 inhibira cepanje proteaza plazme, povećavajući time dodatno koncentraciju ovih fragmenata u plazmi (98).

Konačno, merenje IL-6 u plazmi može biti korisno u stratifikaciji rizika kod kritično obolelih pacijenata. Koncentracije plazmatskog IL-6 su veće kod bolesnika sa

sepsom indukovanom organskom disfunkcijom u poređenju sa pacijentima sa sepsom bez organske disfunkcije (MODS). Povišeni nivoi interleukina 6 mogu se pored stanja sepse detektovati i u slučaju autoimunih oboljenja, limfoma, AIDS-a, oštećenja jetre uzrokovanih alkoholom kao i kod transplantiranih bolesnika koji odbijaju organ (99).

#### **1.8.4. C-reaktivni protein**

C-reaktivni protein je serumski protein iz porodice pentraksina. Prvi put je opisan još 1930. g. nakon istraživanja koje su sproveli Tillett i Francis (100), kada se smatralo da je C reaktivni protein "sekret patogenog tipa", jer mu se količina povećavala kod bolesnika u različitim patološkim stanjima. Otkrićem da se sintetise u jetri (i masnim ćelijama, adipocitima) pokazano je da je ipak prirodni protein. Po sastavu je glikoprotein, prema obliku prstenasti pentamer i pripada grupi proteina akutne faze. Kao reaktant akutne faze upale C-reaktivni protein se razvija u širokom opsegu akutnih i hroničnih zapaljenja kao što su bakterijske, virusne ili gljivične infekcije, reumatska i druga zapaljenska stanja, malignitet i povrede tkiva praćene nekrozom. Ova stanja uzrokuju oslobađanje interleukina 6 i drugih citokina koji pokreću sintezu C-reaktivnog proteina od strane jetre. U akutnoj upalnoj reakciji količina C-reaktivnog proteina može se povećati i do 2 000 puta. Tokom akutne faze nivo C-reaktivnog proteina se povećava za 6 do 9 sati, vrhunac dostiže nakon 48 sati, a kako mu je vrijeme poluživota konstantno, nivo C-reaktivnog proteina određen je količinom stvaranja.

Određivanje nivoa C-reaktivnog proteina je ključno za otkrivanje infektivnih i inflamatornih bolesti. S obzirom da postoji veliki broj različitih stanja koja mogu povećati nivo, to povećani nivo C-reaktivnog protein ne ukazuje na tačno određenu bolest, nego ukazuje da sigurno postoji zapaljenska bolest kao što je u slučaju teške infekcije (sepse), ali i reumatodnog artritisa, upale krvnih sudova ili mišića.

C-reaktivni protein je i važan imunološki protein. Imunološki učinci su mu brojni: aktivacija komplementa, supresija ili aktivacija određenih tipova T-limfocita i proizvodnje nekih citokina, mogućnost vezivanja bakterijskih polisaharida i fosfolipida iz tkiva oštećenih upalom, traumom ili infekcijom. On prepoznaje potencijalno toksične

autogene materije koje se oslobađaju iz oštećenih tkiva, vezuje ih, a zatim ih detoksikuje i oslobađa iz organizma. On može da inicira opsonizaciju, fagocitozu i lizu invazivnih ćelija (101, 102).

### 1.8.5. Markeri sistema hemostaze

**Antitrombin III** (AT III) je glikoprotein iz grupe  $\alpha_2$ -globulina koji sadrži jednostruki peptidni lanac sa 432 aminokiseline. U svom molekulu ima 3 disulfidne veze i 4 karbohidratna lanca. Molekulska masa lanca je oko 60 kDa. AT III se sintetiše u jetri i endotelnim ćelijama. Koncentracija AT III u plazmi iznosi od 125–300  $\mu\text{g/mL}$  što odgovara normalnom području aktivnosti od 80–120%. Od ukupne količine AT III u organizmu, 40% se nalazi u plazmi, 10% u vaskularnom endotelu i 50% u ekstravaskularnom prostoru (pluća, bubrezi). Ekstravaskularni AT III verovatno je rezervoar za dopunu koncentracije u krvi u situacijama povećane potrošnje. Nedostatak AT III može biti urođen ili stečen. Kod slučajeva sa urođenim nedostatkom nivo AT III je iznosio 50–60% normalnih vrednosti i svi su bili heterozigoti. Iako u plazmi postoji još nekoliko inhibitora serin proteaza, njihova kvantitativna uloga u inhibiciji trombina je minimalna i pretpostavlja se da je u slučaju potpunog nedostatka AT III (homozigoti) život nemoguć. Stečeni poremećaj AT III je stanje koje sa sobom nosi iste rizike kao i urođeni deficit AT III tako da njegovo pravovremeno prepoznavanje može efikasno sprečiti nastajanje venske tromboze ili plućne embolije. Stečeni nedostatak se javlja kao posledica smanjene sinteze, povećane eliminacije ili povećane potrošnje (103, 104). Značajan pad vrednosti AT III u plazmi potvrđen je kod pacijenata s cirozom jetre, karcinomom prostate, gastrointestinalnim oboljenjem i nefrotskim sindromom kao i kod žena koje koriste oralne kontraceptive. AT III je najjači inhibitor serin proteaze jer inhibira trombin, faktore koagulacije IXa, Xa, XIa, XIIa, kalikrein i plazmin. Mehanizam inhibicije je za sve serin proteaze sličan i podrazumeva stvaranje stabilnih ireverzibilnih kompleksa. AT III reaguje sa trombinom u odnosu 1:1 i dovodi do stvaranja enzimski inaktivnog i stabilnog kompleksa. U odsustvu heparina, reakcija se odigrava relativno sporo, dok u prisustvu heparina dolazi do drastičnog ubrzanja reakcije i inaktivacija je skoro momentalna. Nagrađeni kompleks trombin-antitrombin



III (TAT) eliminiše se iz organizma pre nego što dođe do razgradnje. Disocijacijom kompleksa oslobađa se aktivni trombin, ali se AT III otpušta u modifikovanoj formi koja nema sposobnost neutralizacije trombina. Za faktore koagulacije IXa, Xa, XIa i XIIa mehanizam inhibicije je isti kao za trombin (104).

U inflamaciji, funkcija antitrombina III može biti narušena usled povećane potrošnje (usled aktiviranja kaskade koagulacije), smanjene sinteze (kao rezultat negativnog odgovora akutne faze) i povećane degradacije dejstvom proteolitičkih enzima (elastaze iz aktiviranih neutrofila). Antiupalno svojstvo antitrombin III iskazuje tako što posreduje svojim antikoagulantnim delovanjem u kaskadi koagulacije. Vezivanjem trombina, antitrombin III doprinosi smanjenoj aktivaciji proinflamatornih ćelija (leukociti, trombociti i endotel). Pored toga, sve je više dokaza da je antiinflamatorno delovanje nezavisno od njegovog antikoagulantne aktivnosti. Naime, antitrombin III se direktno u interakciji sa leukocitima vezuje za svoje receptore i na taj način blokira interakciju leukocita sa endotelnim ćelijama, odnosno migraciju leukocita i prijanjanje na endotel. Pored toga, antitrombin III podstiče oslobađanje prostaglandina iz ćelija endotela koji deluje kao inhibitor agregacije trombocita i blokira adherenciju neutrofila na krvne sudove čime doprinosi smanjenju proizvodnje proinflamatornih citokina i hemokina u neutrofilima i ćelijama endotela (105).

**Protein C** je vitamin K zavisni glikoprotein, sačinjen od dva polipeptidna lanca međusobno povezana disulfidnim vezama. Laki lanac sadrži 155 aminokiselina, molekulske mase 21 kDa, a teški lanac 260 aminokiselina, molekulske mase 41 kDa. Pored jetre kao glavnog mesta sinteze, protein C se sintetisuje i u Leydingovim ćelijama testisa i epididimisu (103). Protein C se nalazi u plazmi u obliku proenzima tako da svoje dejstvo ispoljava tek nakon aktivacije koja se odvija pod dejstvom trombina i u prisustvu jona kalcijuma. Trombin odvaja peptid aktivacije od proteina C i nastaje aktivirani protein C (APC). U procesu aktivacije trombin se vezuje za trombomodulin, sa površine endotelne ćelije, čime gubi sposobnost delovanja na fibrinogen i trombocite ali se povećava njegova aktivnost prema antitrombinu III (106). Svoju inhibicijsku aktivnost protein C ostvaruje proteoliznom razgradnjom arginilskih veza u aktivisanom Va i VIIIa činiocu, nakon čega oni gube svoje prokoagulantno dejstvo kao kofaktori u aktivaciji IX odnosno X činioca koagulacije (107, 108). Da bi APC delovao neophodno

je prisustvo proteina S (PS) koji je vezan za trombocite ili endotelne ćelije i tek tada kompleks APC/PS vrši inaktivaciju F Va i F VIIIa. Pored prisustva proteina S kao kofaktora neophodno je prisustvo i fosfolipidnih čestica i jona kalcijuma. Zbog svoje antikoagulacijske specifičnosti i efikasnosti, aktivirani protein C je značajan regulatorni enzim procesa koagulacije krvi. APC ispoljava i profibrinoliznu aktivnost jer sa inhibitorom aktivatora plazminogena stvara kompleks čineći ga pri tome neaktivnim. Protein C se nalazi u koncentraciji od 3 do 5 mg/L, što odgovara aktivnosti od 70 do 100%. U naslednom ili stečenom nedostatku proteina C ili poremećaju njegove funkcije postoji izražena sklonost za nastanak tromboembolijskih komplikacija, te su poremećaji njegove normalne aktivnosti važni etiološki činioci u nastanku trombofilije i pretromboznog stanja.

Od tri ključna prirodna antikoagulantna mehanizma, Protein C sistem je najvažniji u regulisanju inflamatornog odgovora i ujedno na njega najviše negativno utiče inflamatorno stanje. Protein C sistem ima važne funkcije u modulaciji inflamatornog odgovora (109), svojim antiinflamatornim i profibrinolitičkim delovanjem (110). Anti-inflamatorno dejstvo APC uključuje inhibiciju citokina (TNF-a, IL-1, IL-6) produkovanih od monocita/makrofaga i inhibiciju hemotakse i adhezije leukocita za endotel. Smatra se da je antiinflamatorni efekat APC posredovan od strane endotel-protein C receptora jer se njihovim vezivanjem ograničava genska ekspresija ćelija i produkcija proinflamatornih citokina iz ćelija endotela. Osim toga, APC ima profibrinolitičko dejstvo jer posreduje neutralizaciju PAI-1 aktivnosti. Pored ovih antiinflamatornih dejstava, pojedine komponente protein C sistema mogu da doprinesu slabljenju inflamatornog odgovora. Pored suštinske uloge trombomodulina u aktivaciji protein C sistema, on vezivanjem za trombin posredovano slabi njegov proinflamatorni efekat tj. smanjuje aktiviranje trombocita i hemotaksu monocita i neutrofila (111). Kao u slučaju antitrombina III, funkcija protein C sistema može biti smanjena zbog smanjene sinteze ili povećane potrošnje i degradacije u inflamatornim stanjima. Osim toga, trombomodulin i protein C receptori na površini endotela izazvani delovanjem proinflamatornih citokina (TNF-a, IL-1b) i neutrofilne elastaze iz aktiviranih neutrofila mogu dodatno negativno uticati na funkciju protein C sistema. Smanjena funkcija protein C sistema igra važnu ulogu u patogenezi sepse i pripadajuće organske disfunkcije (112).

**Plazminogen** je glikoprotein molekulske mase 92 kDa, izgrađen iz polipeptidnog lanca sa 790 aminokiselina. Njegova sinteza se odvija u jetri. Pod dejstvom aktivatora plazminogena raskida se u molekulu plazminogena peptidna veza, te nastaju teški A-lanac i laki B-lanac koji su i dalje međusobno vezani dvostrukom disulfidnom vezom. Na ovaj način se proenzim plazminogen pretvara u aktivnu serinsku proteazu, plazmin. Svoju proteoliznu aktivnost plazmin ispoljava razlaganjem veza u molekulima fibrina i fibrinogena, ali izaziva i proteoliznu razgradnju V i VIII činioca koagulacije, činilaca sistema komplementa, adrenokortikotropnog hormona (ACTH), glukagona i hormona rasta.

Tkivni aktivator plazminogena (t-PA) je glikoprotein koji ima osobine serinske proteaze. t-PA je izdvojen iz endotelskih ćelija, fibroblasta, glatkih mišićnih ćelija, makrofaga, leukocita kao i iz malignih ćelija. Najvećim delom t-PA je vezan za PAI-1, pa u slobodnom obliku cirkuliše samo nešto ispod 5% njegove ukupne količine u plazmi. Pod uticajem fizičkog opterećenja, venske staze, mentalnog stresa, hipoksije, acidoze ili intravenske primene vazopresina, histamina ili adrenalina, endotelske ćelije oslobađaju t-PA i njegova koncentracija u plazmi se višestruko povećava. U prisustvu fibrina t-PA je vrlo aktivan i vezujući se zajedno sa plazminogenom za fibrin pretvara plazminogen u plazmin. Pored tkivnog izolovan je mokraćni aktivator plazminogena (urokinaza, u-PA). Dok t-PA ima ulogu u sprečavanju nastanka i širenja intravaskulnog tromba, mokraćni aktivator plazminogena je pretežno uključen u aktivnost međućelijskih proteoliznih mehanizama u različitim tkivima (103).

Proteoliznim delovanjem plazmina na fibrin ili fibrinogen, nastaju rastvorljivi proteinski fragmenti fibrina ili fibrinogena, poznati kao **fibrin-fibrinogen degradacioni produkti**. Za razliku od vrlo malog razlaganja fibrinogena u toku njegovog pretvaranja u fibrin, proteolizno razlaganje fibrina i fibrinogena pod dejstvom plazmina je znatno agresivniji proces. Plazmin cepa fibrin i fibrinogen u fragmente poznate kao X, Y, D i E. Fragmenti D i E su terminalni fragmenti, rezistentni na dalje proteolitičko delovanje plazmina. Intermedijarni fragmenti X i Y mogu dalje da se degradiraju do D i E fragmenata. Neki fragmenti imaju biološku aktivnost. Fragmenti D i E inhibiraju koagulaciju. Fragment X zadržava sposobnost intaktne molekule fibrinogena da potpomogne ADP-om izazvanu agregaciju trombocita i sedimentaciju eritrocita i može da se koaguliše trombinom. Terminalni fragmenti D i E mogu da

stimulišu sintezu i otpuštanje fibrinogena iz jetre, da utiču na električnu aktivnost srca, povećavaju kapilarnu propustljivost i da potenciraju vazoaktivne efekte bradikina i angiotenzina II. U fiziološkim uslovima razgradni proizvodi fibrina i fibrinogena se vrlo brzo uklanjaju iz krvotoka putem mononukleusnofagocitnog sistema, u čemu jetra ima posebno istaknutu ulogu (103).

Razgradnjom fibrina koji nije povezan peptidnim vezama, stvaraju se po građi potpuno isti proizvodi razgradnje kao i pri razlaganju fibrinogena. Kada se pod uticajem aktivisanog faktora XIIIa stvore unakrsne peptidne veze između fibrinskih polimera, nastali proizvodi plazminske razgradnje imaju drugačiju građu. U ovim proteoliznim reakcijama mogu se pojaviti pojedinačni E-fragmenti, ali D-fragmenti su uvek povezani kovalentnom unakrsnom vezom i nalaze se kao dvostruki D-fragment odnosno **D-dimer**. D-dimer nastaje kao rezultat liziranja stabilizovanog fibrina pod uticajem plazmina i siguran je znak postojanja fibrinskih naslaga odnosno tromba negde u cirkulaciji. Novije laboratorijske tehnike omogućile su detektovanje produkata koji nastaju u procesu aktiviranja koagulacije krvi čak i pre nego što dođe do stvaranja krvnog ugruška odnosno tromboze. Na taj način je postalo moguće utvrditi postojanje i kvantitativno izraziti hiperkoagulabilno stanje u krvi. Visoka koncentracija ovih molekulskih markera hiperkoagulabilnosti prisutna je u stanjima kod kojih postoji povećano aktiviranje koagulacionog sistema kao što je DIK, sepsa, hematološki maligniteti, trudnoća i sl. (113, 114).

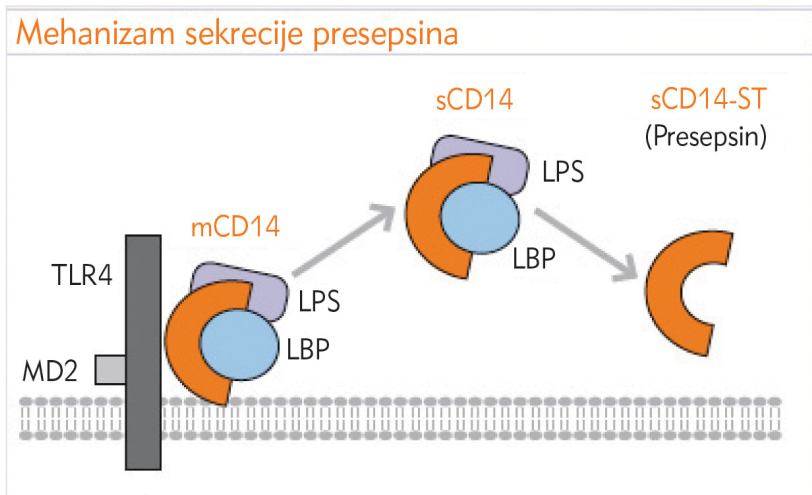
### 1.8.6. Presepsin (sCD14-ST)

Poslednjih nekoliko godina kao marker sepse pominje se i presepsin. Prvi radovi o značaju određivanja ovog jedinjenja prvi put su objavljeni 2005. godine. Metoda (EIA) kojom je tada određivan presepsin zahtevala je dosta vremena, najmanje 4 sata, što je usporilo i umanjilo dalje ispitivanje njegove korisnosti (115). U poslednje tri godine sa razvojem tehnologije i metode određivanja broj ispitivanja o značaju presepsina se povećavao što je rezultiralo većim brojem rezultata studija širom sveta. No, i pored toga presepsin se i dalje ubraja u nove za istraživanje raspoložive biomarkere.

Klaster diferencijacije (klaster dezinacije) (što se često skraćuje sa CD) je protokol korišćen za identifikaciju i ispitivanje molekula prisutnih na ćelijskoj površini belih krvnih ćelija. CD molekuli mogu da deluju kao receptori ili ligandi. Jedan od njih je i CD14 marker protein koji se nalazi na površini mononuklearnih ćelija i služi kao specifičan receptor visokog afiniteta za lipolisaharid gram negativne bakterije.

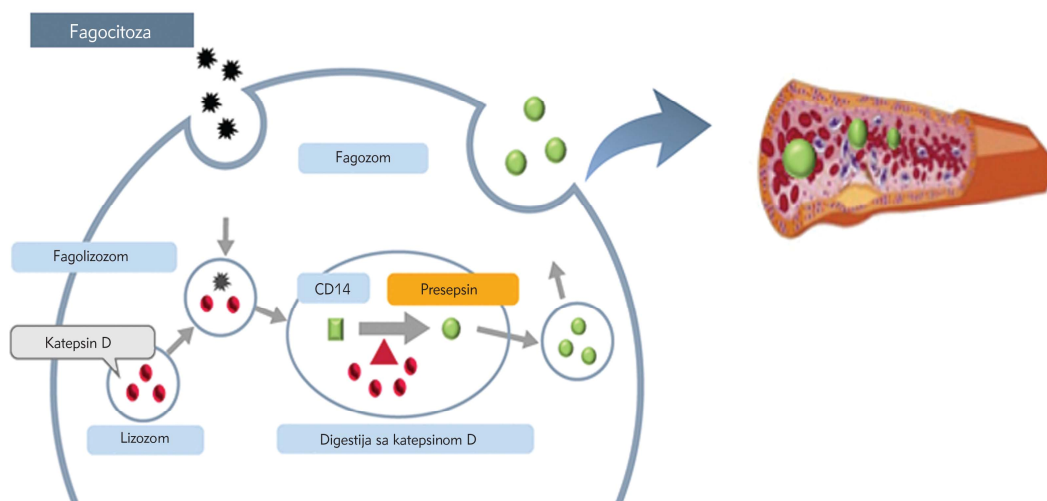
Poznato je da kod pacijenata sa noćnom paroksizmalnom hemoglobinurijom CD14 nije vezan za membranu, dok se rastvorljiva frakcija (sCD14) ovog molekula može naći kod bolesnika sa ovom dijagnozom (116), i to u vrlo niskim, mikrogramskim, koncentracijama i kao molekul sa 49 kDa tj. 55kDa. Povišeni nivoi sCD14 u plazmi odlika su sepse, AIDS-a, sindroma akutnog respiratornog distresa (ARDS) i sistemskog lupus eritematodusa (115).

CD14 kao glikoprotein na membrani monocita/makrofaga služi kao receptor za stvoreni kompleks lipolisaharida (LPS) i LBP (*Lipopolisaccharide Binding Protein*), koji započinje aktivaciju *toll-like* receptora 4 (TLR4) nakon kontakta sa infektivnim agensom. Istovremeno se i molekul CD14 (117) oslobađa sa membrane u cirkulaciju kao rastvorljivi oblik (sCD14) od koga se pod dejstvom plazma proteaze stvara fragment sCD14 tj. podtip (*subtype*) koji se naziva sCD14-ST i to je **presepsin** (Slika 9).



Slika 9. Mehanizam sekrecije presepsina

*In vitro* studije (118) pokazale su da produkcija i lučenje presepsina zavisi isključivo od procesa fagocitoze uzrokovane bakterijskom infekcijom, a ne samo od prisustva endotoksina, kako se očekivalo. Naime, iste studije pokazale su i da inhibitori fagocitoze suzbijaju stvaranje presepsina. U lizozomima leukocita, katepsin D razara ne samo delove bakterije uzročnika infekcije, već i CD14 molekul. Tako "rastvoren" CD14 prelazi u presepsin koji se oslobađa u cirkulaciju (Slika 10).



Slika 10. Mehanizam indukcije presepsina (118)

Presepsin ima molekulsku masu od 13kDa i nalazi se na N-terminalnom delu sekvence CD14 molekule (119, 120). Presepsin nema sposobnost vezivanja lipopolisaharida (LPS) i ne može se otkriti anti-CD14 antitelima. Karakteristike CD14 receptora i sCD14-ST tj. presepsina uporedno su prikazane u Tabeli VII.

Tabela VII Karakteristike CD14 i presepsina (sCD14-ST)

Parametar	Presepsin (sol.CD14-ST)	CD14
Molekulska masa	approx. 13 kDa	approx. 55 kDa
Oblik	rastvorljiv	membranski i rastvorljiv
Peptidna struktura	Fragment CD14	356 aminokiselina
Mogućnost vezivanja za LPS	NE	DA
Biološka sposobnost	nepoznata	receptor za endotoksin
Vezivanje za antiCD14antitela	NE	DA
Vezivanje za antipresepsin antitela	DA	NE
Normalna koncentracija u krvi čoveka	0,048 – 0,171ng/mL (95% CI) <sup>1</sup>	1200-3100 ng/mL <sup>2</sup>
Specifičnost – bolesti	Infekcija i sepsa	Sepsa i druge bolesti
Mehanizam indukcije	Enzimaska degradacija CD14 molekula	Sinteza proteina
<p>1. <i>Internal data of Mitsubishi Chemical Medience</i></p> <p>2. <i>Data from R&amp;D Systems catalog</i></p>		

S obzirom da su prva istraživanja ovog parametra pokazala značajno povećanje njegovih vrednosti kod bolesnika u sepsi u odnosu na zdrave osobe ili bolesnike sa sistemskim inflamatornim odgovorom to je i ostala njegova prvobitna namena, da bude marker sepse (115). Indukcija presepsina je veoma brza i u cirkulaciji se može naći već nakon 2 sata od jakog infektivnog prodora, što je mnogo brže u odnosu na neke druge parametre infekcije (npr. prokalcitonin ili interleukin 6). U poređenju sa nekim drugim

parametrima kao što je potvrđeni marker sepse prokalcitonin, presepsin pokazuje veću osetljivost i specifičnost prilikom postavljanja dijagnoze sepse (121).

Pored primene kao dijagnostičkog markera presepsin ima namenu i u proceni stepena težine stanja bolesnika kao i prognozi bolesti.

Vrednosti presepsina pokazale su dobru korelaciju sa kliničkim znacima, izraženu kroz APACHE skor, koji predstavlja indeks težine stanja bolesnika. Ova činjenica sugerše da presepsin tačno odražava stanje pacijenta (122).

Studija u kojoj je ispitivana povezanost vrednosti presepsina i smrtnosti (u periodu od 30 dana) ukazala je da postoji jaka korelacija između ovih parametara. Naime, kod bolesnika čije su vrednosti presepsina bile u opsegu od 177 do 512 pg/mL udeo smrtnosti iznosio je 2,7%. Kod grupe bolesnika sa izrazito povišenim vrednostima, opseg od 1850 do 15757 pg/mL smrtnost je bila 39,4% (117).

I pored toga što presepsin pripada grupi markera sepse novijeg datuma, postavljene su vrednosti za odlučivanje i postavljanje dijagnoze i trenutnog stanja bolesnika (123) (Tabela VIII).

Tabela VIII Nivoi odlučivanja za vrednosti presepsina

<b>Presepsin (pg/mL )</b>	<b>Dijagnoza</b>
< 200	Isključena sepsa (sistemska infekcija) (osetljivost 96%, specifičnost 81%)
< 300	Sistemska infekcija (mala mogućnost)
< 500	Moguća sistemska infekcija
< 1000	Umeren rizik od napredovanja sistemske infekcije (teška sepsa) Povećanje rizika od nepovoljnog ishoda
> 1000	Visok rizik od napredovanja sistemske infekcije (teška sepsa / septički šok) Visok rizik mortaliteta u 30 dana uporediv sa APACHE II skorom > 25



## 2. CILJ RADA

Sepsa je klinička manifestacija generalizovane inflamatorne reakcije domaćina na infekciju, čije su komplikacije jedan od najčešćih uzročnika smrti. Povišena telesna temperatura ili pothlađenost, groznica, ubrzano disanje i ubrzan rad srca najavljuju početak sistemskog upalnog odgovora na invaziju mikroorganizma, nazvanog *sepsa*. Sepsa je obično ograničena regulatornim mehanizmima. Kada ovi mehanizmi budu nadjačani, kada mikroorganizam krene iz lokalnog žarišta u cirkulaciju, homeostaza može zatajiti i tada nastaje stanje *teške sepse*. Dalje zatajivanje regulacije vodi u *septički šok* koji je obeležen hipotenzijom i disfunkcijom organa (MODS – *Multiple Organ Dysfunction Syndrome*). Sepsu i septični šok izazivaju brojne gram-pozitivne i gram-negativne bakterije koje pokreću imuno-metaboličku reakciju organizma poznatu kao "sistemski inflamatorni odgovor" tj. SIRS. Ipak, ovakav odgovor organizma mogu da izazovu i neka neinfektivna patološka stanja kao npr. maligne bolesti, trauma, metabolički poremećaji i sl. Prema ACCP/SCCM sepsa se definiše kao sistemski odgovor organizma na infekciju sa najmanje dve manifestacije karakteristične za SIRS i potvrđenim prisustvom infektivnog agensa.

Pojam sepse u abdominalnoj hirurgiji podrazumeva postojanje intraabdominalnog septičnog fokusa, kao glavnog pokretača niza patofizioloških zbivanja. Direktna resorpcija i oslobađanje endotoksina započinje disfunkciju respiratornog, metaboličkog, koagulacionog i fibrinolitičkog sistema.

Ovakav koncept sepse poznat je već poslednjih 20 godina i u tom periodu shvatanje patofiziologije ovako kompleksne situacije se razvijalo kao i nova dijagnostička i terapijska sredstva. Novi model poznat kao **PIRO** model podrazumeva, ranu i objektivniju ocenu kliničkog stanja pacijenta. Model PIRO ujedinjuje važne i dostupne parametre, koji opisuju sklonost (engl. *Predisposition*), infekciji (engl. *Infection*), odgovor organizma (engl. *Response*) i organsku disfunkciju (engl. *Organ dysfunction*). Bolesnici sa sistemskom infekcijom kojoj je pridodata i organska disfunkcija ili stanje šoka klinički se teško razlikuje od sličnih stanja, ali bez infekcije. Zato su od izuzetnog značaja laboratorijski parametri koji bi omogućili

efikasno razlikovanje infektivne etiologije opšteg inflamatornog odgovora od drugih sličnih stanja.

Kao "zlatni standard" u dijagnozi sepse podrazumeva se mikrobiološko ispitivanje uzorka krvi izolacijom i identifikacijom patogena. Za dobijanje mikrobiološkog rezultata i tumačenje potrebno je najmanje 48 sati, vrlo često i do 7 dana. To je dosta dug period i zato su biomarkeri sepse koji se mogu ispitati u dosta kraćem vremenskom intervalu mnogo podesniji za postavljanje dijagnoze i praćenje terapije.

Cilj ovog rada je da se ukaže na dijagnostički i prognostički značaj određivanja vrednosti biomarkera sepse kod pacijenata sa intraabdominalnim infekcijama, pre i posle hirurške intervencije. Savremene preporuke nalažu određivanje vrednosti presepsina i prokalcitonina u toku infekcija kao i njihovu usklađenost sa već pouzdanim parametrima kao što su C-reaktivni protein, broj leukocita, brzina sedimentacije eritrocita i metabolički parametri. U disertaciji će se ispitati dijagnostička tačnost navedenih parametara kao biomarkera sepse u stanjima intraabdominalne infekcije uz primenu ROC analize, gde se u formi dijagrama prikazuje odnos osetljivosti i specifičnosti pri različitim nivoima odlučivanja.

Kliničke poteškoće u tretmanu abdominalne sepse odnose se na ograničene kliničke znake kao i na sistemsku propagaciju koja se odvija znatno pre ispoljavanja kliničke simptomatologije. Ove poznate činjenice ističu značaj ispitivanja bioloških markera sepse, najpre u dijagnostičkom, ali i u prognostičkom smislu.

Poznavanjem vrednosti ispitivanih parametara i njihovim tumačenjem uveliko bi se olakšao i ubrzao proces dijagnoze septičnih stanja, a njihovim redovnim praćenjem i smanjenjem komplikacija koja ova teška stanja izazivaju. Kod pacijenata sa intraabdominalnom infekcijom očekivane povišene vrednosti će postepeno opadati sa smanjenjem stepena infekcije. Adekvatnom antibiotskom terapijom i praćenjem kroz dane nakon hirurškog zahvata očekuje se normalizacija vrednosti, što će i ujedno biti dobar prognostički znak i potvrda efikasnosti terapije.

Takođe, ispitivanjem i dosad primenjivanih rutinskih parametara, pokazaćemo njihovu veliku korisnost i primenu, naročito u stanjima sepse koja je uznapredovala do MODS-a (*multiple organ dysfunction syndrome*) kao i značajnu korelaciju između njih.

## **3. MATERIJALI I METODE**

### **3.1. KOMERCIJALNI REAGENSI**

U eksperimentalnom radu su korišćeni sledeći komercijalni test-reagensi:

1. Presepsin test PATHFAST®, kit, Cat No PF1201-K, Mitsubishi Chemical Medience Corp., Tokyo, Japan
2. PCT BRAHMS LIA, Cat No 54.1, BRAHMS Aktiengesellschaft, Henningsdorf, Germany
3. PCT Brahms Elecsys, cobas e, kit, Cat No 05056888200, Elecsys BRAHMS, Roche Diagnostics, Mannheim, Germany
4. Universal Diluent Elecsys, cobas e, Cat No 03183971122, Elecsys, Roche Diagnostics, Mannheim, Germany
5. Probe Wash M Elecsys, cobas e, Cat No 03005712190, Elecsys, Roche Diagnostics, Mannheim, Germany
6. Immulite® 2000 LBP (Lipopolysaccharide binding protein), kit, Cat No L2KLB2, Siemens Healthcare Diagnostics Products GmbH, Marburg, Germany
7. Immulite® LBP Control Module, Cat No LLBCM, Siemens Healthcare Diagnostics Products GmbH, Marburg, Germany
8. Immulite® 2000 IL-6, kit, Cat No L2K6P2, Siemens Healthcare Diagnostics Products GmbH, Marburg, Germany
9. Immulite® Cytokine Control Module, Cat No LILCM, Siemens Healthcare Diagnostics Products GmbH, Marburg, Germany
10. Immulite® Multi Diluent 2, Cat No L2M2Z4, Siemens Healthcare Diagnostics Products GmbH, Marburg, Germany
11. Immulite® Chemiluminescent Substrate, Cat No L2SUBM, Siemens Healthcare Diagnostics Products GmbH, Marburg, Germany
12. Immulite® Probe Wash, Cat No L2PWSM, Siemens Healthcare Diagnostics Products GmbH, Marburg, Germany

13. N Latex hsCRP mono, Cat No OQIY21, Siemens Healthcare Diagnostics Products GmbH (ranije Dade Behring), Marburg, Germany
14. N Rheumatology Standard SL, Cat No OQKZ13, Siemens Healthcare Diagnostics Products GmbH (ranije Dade Behring), Marburg, Germany
15. N/T Rheumatology Control SL/1, Cat No OQDB13, Siemens Healthcare Diagnostics Products GmbH (ranije Dade Behring), Marburg, Germany
16. N/T Rheumatology Control SL/2, Cat No OQDC13, Siemens Healthcare Diagnostics Products GmbH (ranije Dade Behring), Marburg, Germany
17. Cleaner SCS, Cat No OQUB19, Siemens Healthcare Diagnostics Products GmbH (ranije Dade Behring), Marburg, Germany
18. N Supplementary Reagent P, Cat No OUMU15, Siemens Healthcare Diagnostics Products GmbH (ranije Dade Behring), Marburg, Germany
19. N Diluent, Cat No OUMT65, Siemens Healthcare Diagnostics Products GmbH (ranije Dade Behring), Marburg, Germany
20. N Reaction Buffer, Cat No OUMS65, Siemens Healthcare Diagnostics Products GmbH (ranije Dade Behring), Marburg, Germany
21. Berichrom Antithrombin III, kit, Cat No OWWR15, Siemens Healthcare Diagnostics Products GmbH (ranije Dade Behring), Marburg, Germany
22. D-Dimer PLUS, kit, Cat No OQWW11, Siemens Healthcare Diagnostics Products GmbH (ranije Dade Behring), Marburg, Germany
23. Berichrom Plasminogen, kit, Cat No OUCA17, Siemens Healthcare Diagnostics Products GmbH (ranije Dade Behring), Marburg, Germany
24. Berichrom Protein C, kit, Cat No OUVV17, Siemens Healthcare Diagnostics Products GmbH (ranije Dade Behring), Marburg, Germany
25. Standardna humana plazma, liofilizovana, Cat No ORKL17, Siemens Healthcare Diagnostics Products GmbH (ranije Dade Behring), Marburg, Germany
26. D-Dimer Standard Plasma, liofilizovana, Cat No OQXA11, Siemens Healthcare Diagnostics Products GmbH (ranije Dade Behring), Marburg, Germany
27. Kontrolna plazma N, liofilizovana, Cat No ORKE41, Siemens Healthcare Diagnostics Products GmbH (ranije Dade Behring), Marburg, Germany
28. Kontrolna plazma P, liofilizovana, Cat No OUPZ17, Siemens Healthcare Diagnostics Products GmbH (ranije Dade Behring), Marburg, Germany

29. D-Dimer Kontrollplasma, Cat No OQKA11, Siemens Healthcare Diagnostics Products GmbH (ranije Dade Behring), Marburg, Germany
30. Imidazol pufer, Cat No OQAA 33, Siemens Healthcare Diagnostics Products GmbH (ranije Dade Behring), Marburg, Germany
31. Rastvor kalcijum-hlorida 0.025 mol/L, Cat No ORHO37, Siemens Healthcare Diagnostics Products GmbH (ranije Dade Behring), Marburg, Germany
32. Rastvor za ispiranje, Washing solution, Cat No OWZC39, Siemens Healthcare Diagnostics Products GmbH (ranije Dade Behring), Marburg, Germany
33. HMX Pack, Cat No 8448466, Beckman Coulter, Beckman Coulter, Inc., Brea, CA, USA
34. Isoton III Diff, Cat No 8448044, Beckman Coulter, Inc., Brea, CA, USA
35. Lyse III Diff, Cat No 8448155, Beckman Coulter, Inc., Brea, CA, USA
36. Clenz, Cat No 8448222, Beckman Coulter, Inc., Brea, CA, USA
37. Control: 5C Tri-Pack, Cat No 7547001, Beckman Coulter, Inc., Brea, CA, USA
38. TOTAL PROTEIN, Cat No OSR6232, Beckman Coulter, Inc., Brea, CA, USA
39. ALBUMIN, Cat No OSR6202, Beckman Coulter, Inc., Brea, CA, USA
40. INORGANIC PHOSPHORUS, Cat No OSR6122, Beckman Coulter, Inc., Brea, CA, USA
41. System Calibrator, Cat No OE66300, Beckman Coulter, Inc., Brea, CA, USA
42. ISE SELECT CHECK, Cat No OE66313, Beckman Coulter, Inc., Brea, CA, USA
43. ISE REF INT solution, Cat No OE66314, Beckman Coulter, Inc., Brea, CA, USA
44. ISE STD high, Cat No OE66316, Beckman Coulter, Inc., Brea, CA, USA
45. ISE STD low, Cat No OE66317, Beckman Coulter, Inc., Brea, CA, USA
46. ISE REFERENCE solution, Cat No OE66318, Beckman Coulter, Inc., Brea, CA, USA
47. ISE MID STD, Cat No OE66319, Beckman Coulter, Inc., Brea, CA, USA
48. ISE BUFFER, Cat No OE66320, Beckman Coulter, Inc., Brea, CA, USA
49. ITA Control L, Cat No ODC0014, Beckman Coulter, Inc., Brea, CA, USA
50. ITA Control M, Cat No ODC0015, Beckman Coulter, Inc., Brea, CA, USA
51. ITA Control H, Cat No ODC0016, Beckman Coulter, Inc., Brea, CA, USA
52. Control Sera level 1, Cat No ODC0003, Beckman Coulter, Inc., Brea, CA, USA
53. Control Sera level 2, Cat No ODC0004, Beckman Coulter, Inc., Brea, CA, USA

54. Cleaning solution, Cat No OE66039, Beckman Coulter, Inc., Brea, CA, USA

55. Wash solution, Cat No OSR0001, Beckman Coulter, Inc., Brea, CA, USA

## **3.2. PRIBOR I APARATI**

### **3.2.1. Pribor**

U eksperimentalnom radu korišćen je sledeći pribor:

1. *Vacutainer* sistem za uzorkovanje krvi (*Vacutainer*, BD, Franklin Lakes, NJ, USA)

*Vacutainer* epruveta serumska CAT/gel - 5 mL, Cat No 367955

*Vacutainer* epruveta sa Li-heparinom - 6 mL, Cat No 368886

*Vacutainer* epruveta za koagulaciju - 2,7 mL, Cat No 363048

*Vacutainer* epruveta za krvnu sliku - 2 mL, Cat No 368841

*Vacutainer* epruveta za sedimentaciju - 5 mL, Cat No 366666

2. *Seditainer* stalak – za određivanje vrednosti brzine sedimentacije eritrocita

3. Plastične i staklene epruvete sa odgovarajućim stalkom

4. Automatske pipete firme "Oxford" sa odgovarajućim nastavcima

5. Staklene obične i trbušaste pipete

6. Signalni sat

### **3.2.2. Aparati**

U eksperimentalnom radu korišćeni su sledeći aparati:

1. PATHFAST® Analyzer, Mitsubishi Chemical Medience Corp., Tokyo, Japan

2. Luminometar Berthold LB 952, BRAHMS Aktiengesellschaft, Henningsdorf, Germany

3. Elecsys 2010, Elecsys, Roche Diagnostics, Mannheim, Germany

4. BN II nefelometar, Siemens Healthcare Diagnostics Products GmbH (ranije Dade Behring), Marburg, Germany

5. BCS XP System, Siemens Healthcare Diagnostics Products GmbH (ranije Dade Behring), Marburg, Germany
6. IMMULITE 2000, Siemens Healthcare Diagnostics Products GmbH, Marburg, Germany
7. Olympus AU 400, Olympus Diagnostica, Hamburg, Germany
8. Brojač krvnih elemenata HmX, Beckman Coulter, Inc., Brea, CA, USA
9. Digifuga GL centrifuga, Heraeus, Germany
10. Mikser "Vortex Genie 2 TM", Lighting, Switzerland
11. Horizontalni rotator, Thermo Scientific, USA
12. Zamrzivač, Gorenje, Velenje, Slovenija

### **3.3. MATERIJAL**

U ovom radu ispitivanja su vršena kod pacijenata Centra za urgentna zbrinjavanja Kliničkog centra Srbije u periodu od 2008. do 2012. godine. Istraživanje je sprovedeno u dve studije, gde su rezultati prve studije dali smernice za izvođenje druge etape istraživanja. Laboratorijske analize su određene u laboratorijama Centra za medicinsku biohemiju Kliničkog centra Srbije u Beogradu. Ispitivanje je odobreno odlukom Etičkog odbora Kliničkog centra Srbije br. 4815/9.

Celokupno istraživanje obuhvatilo je pacijente sa akutnim abdominalnim bolom koji su pri dolasku u Centar za zbrinjavanje urgentnih stanja ispunjavali najmanje dva od prihvaćenih dijagnostičkih kriterijuma za SIRS (*Systemic Inflammation Response Syndrom*) prema dokumentu ACCP/SCCM (11,12).

Indikacije za prijem i hitnu hiruršku intervenciju zasnovani su na kliničkim pokazateljima stanja akutnog abdominalnog bola kao i na osnovu radioloških i ultrazvučnih nalaza i laboratorijskih rezultata. Svi primljeni pacijenti podvrgnuti su hirurškoj intervenciji nakon uspostavljanja dijagnoze akutnog abdomena (*Abdomen acuta*, lat). Kriterijumi koji su se koristili za postavljanje dijagnoze abdominalne sepse su bili očigledni ili je postojala sumnja na izvor infekcije unutar abdomena što je potvrđeno mikrobiološkim nalazom uzorka iz peritonealne šupljine. Uzorci

peritoenalnog sadržaja uzimani su tokom prve hirurške intervencije. Kriterijumi za isključivanje iz istraživanja su bili trudnoća, dojenje, progresivne bolesti, terapija citostaticima ili imunosupresivnim lekovima, malignitet, primarne imunodeficijencije i ostale infekcije čiji je žarište van abdomena. Pacijenti koji su primali profilaktičku i/ili preoperativno antibiotsku terapiju isključeni su iz ispitivanja.

Ispitivani pacijenti podeljeni su u grupe. Nakon operativnog zahvata definisane su grupe pacijenata u zavisnosti od pozitivnog tj. negativnog mikrobiološkog nalaza koji je koristio kao dokaz postojanja intraabdominalne infekcije. Dijagnoza sepse i SIRS su postavljene i potvrđene u skladu sa kriterijumima utvrđenim u referentnom dokumentu u ovoj oblasti, donetim od strane *American College of Chest Physicians/Society of Critical Care Medicine (ACCP/SCCM)* (11).

Pacijenti su podeljeni u 3 grupe:

Grupa A – kontrolna grupa, sastavljene od zdravih osoba, koji su doborovoljno učestvovali u ovom istraživanju.

Grupa B – pacijenti koji su tokom lečenja razvili SIRS, i

Grupa C – pacijenti koji su tokom lečenja razvili sepsu.

Prvi deo istraživanja obuhvatio je 98 pacijenata sa akutnim abdominalnim bolom koji su pri dolasku u Urgentni centar ispunjavali kriterijume za SIRS (*Systemic Inflammation Response Syndrome*). Nakon hirurške intervencije, potvrde laboratorijskih ispitivanja i pozitivnog mikrobiološkog nalaza 58 pacijenata svrstano je u grupu pacijenata sa dijagnozom sepse (grupa C1), dok je ostalih 40 pacijenata svrstano u grupu pacijenata koji su razvili SIRS (grupa B1). Kod pacijenata uzorci krvi za određivanje ispitivanih parametara uzimani su u vreme prijema kao i u sledećih pet dana nakon intervencije.

U ispitivanje je bilo uključeno i 90 zdravih osoba, 49 žena i 41 muškarac, starosne dobi od 27 do 84 godine (grupa A1). Na osnovu upitnika odabrane su osobe bez prisustva hroničnog ili akutnog inflamatornog oboljenja koje nisu uzimale farmakološke supstance koje bi uticale na parametre ispitivanja. Krv je uzimana prilikom dolaska na redovni kontrolni pregled. Demografske i kliničke karakteristike ispitivanih lica prikazani su u Tabeli IX i Tabeli X.



Tabela IX Demografske i kliničke karakteristike ispitivanih osoba

Grupa	A1	B1	C1
Broj ispitivanih	90	40	58
Godine ( $\bar{x} \pm SD$ )	56,9 $\pm$ 12,5	51,5 $\pm$ 19,1	56,9 $\pm$ 17,1
Muškarci / Žene ( <i>ratio</i> )	41/49	28/12	41/17
Trajanje simptoma ( $\bar{x} \pm SD$ )/h	-	46 $\pm$ 37	53 $\pm$ 33
Broj dana hospitalizacije, ( $\bar{x}$ )/dan	-	12	19
Ponovljen hirurški zahvat, N (%)	-	6 (15)	5 (9)

Tabela X Operativne dijagnoze i organski poremećaji kod ispitanika u grupi pacijenata sa sepsom (C1) i SIRS (B1)

Dijagnoza	B1 (N=40)	C1 (N=58)
<i>Mesenterial infarction</i>	8	/
<i>Intestinal perforation</i>	15	49
<i>Pancreatitis acuta</i>	4	2
<i>Biliary peritonitis</i>	6	3
<i>Pelvi-peritonitis</i>	5	2
<i>Urinary peritonitis</i>	/	2
<i>Internal bowel incarceration</i>	2	/
Organski poremećaj	Broj pacijenata iz grupe (%)	
Poremećaji u funkciji bubrega	19 (48)	23 (40)
Respiratorna insuficijencija	21 (53)	35 (60)
MODS(Sindrom disfunkcije više organa)	18 (45)	25 (43)
Stanje šoka	15 (38)	27 (47)
Smrtnost	7 (18)	15 (26)

Kod ove tri grupe ispitivanih osoba određivani su sledeći parametri: prokalcitonin, C-reaktivni protein (CRP), antitrombin III, plazminogen, D-dimer, protein C, hemoglobin, trombociti, leukociti, ukupni proteini, albumin, kalijum i neorganski fosfor.

Drugi deo istraživanja obuhvatio je 60 pacijenata sa akutnim abdominalnim bolom koji su pri dolasku u Urgentni centar ispunjavali kriterijume za SIRS (*Systemic Inflammation Response Syndrom*). Nakon hirurške intervencije, potvrde laboratorijskih ispitivanja i pozitivnog mikrobiološkog nalaza 30 pacijenata svrstano je u grupu pacijenata sa dijagnozom sepse (grupa C2), dok je ostalih 30 pacijenata svrstano u grupu pacijenata koji su razvili SIRS (grupa B2). U skladu sa dokumentom "*Definitions for sepsis and organ failure and guidelines for the use of innovative therapies in sepsis*" kod pacijenata sa potvrđenom sepsom razlikovali smo i stanja teške sepse i septičkog šoka od sepse. Kod pacijenata uzorci krvi za određivanje ispitivanih parametara uzimani su u vreme prijema na lečenje kao i prvog, trećeg i petog dana nakon zahvata. U ispitivanje je bilo uključeno i 70 zdravih osoba, 36 žena i 34 muškarca, starosne dobi od 27 do 84 godine (grupa A2). Na osnovu upitnika odabrane su osobe bez prisustva hroničnog ili akutnog inflamatornog oboljenja i koje nisu uzimale farmakološke supstance koje bi uticale na parametre ispitivanja. Krv je uzimana prilikom dolaska na redovni kontrolni pregled. Demografske i kliničke karakteristike ispitivanih lica prikazani su u Tabeli XI i Tabeli XII.

Tabela XI Demografske i kliničke karakteristike ispitivanih osoba

Grupa	A2	B2	C2
Broj ispitivanih	70	30	30
Godine (mean ± SD)	56,2 ± 12,71	52,7 ± 13,46	56,0 ± 17,4
Muškarci/Žene ( <i>ratio</i> )	36 / 34	18 / 12	17 / 13
Smrtnost	–	–	5 / 30
Grupa C2			
Broj pacijenata	Sepsa n = 20	Teška sepsa n = 5	Septični šok n = 5

Tabela XII Operativne dijagnoze i organski poremećaji kod pacijenata sa sepsom (A2)

<b>Dijagnoza</b>	<b>Broj pacijenata</b>
<i>Cholecystitis acuta calc.gangrenosa perforativa</i>	6
<i>Pancreatitis acuta</i>	9
<i>Abscessus subhepatis</i>	1
<i>Ileus</i>	5
<i>Perforatio ulcus ventriculi</i>	1
<i>Thrombosis mesenterialis</i>	1
<i>Apendicitis acuta perforativa</i>	1
<i>Peritonitis difusa fibrinosa purulenta</i>	6
<b>Organski poremećaj</b>	<b>Broj pacijenata iz grupe</b>
Laktična acidoza	2
Hipoksemija	4
Poremećaji koagulacije	6
Hipotenzija	10
Edemi	4
Poremećaj pulsa	6
Respiratorna insuficijencija	3
Promene u mentalnom statusu	1

Kod ove tri grupe ispitivanih osoba određivani su sledeći parametri: presepsin, prokalcitonin, LBP, IL-6, C-reaktivni protein (CRP), antitrombin III, protein C, hemoglobin, trombociti, leukociti, leukocitarna formula, brzina sedimentacije eritrocita, ukupni proteini, albumin, kalijum i neorganski fosfor.

Krv je uzorkovana u ranim jutarnjim satima (osim na dan prijema kod pacijenata), iz kubitalne vene u *Vacutainer* epruvete uz poštovanje procedure za uzorkovanje venske krvi. Uzorci krvi za ispitivanje biohemijskih i koagulacionih parametara su centrifugirani 10 min na approx. 3 000 rpm (1 500g). Ispitivani

parametri su određivani odmah po odvajanju seruma tj. plazme. Ostaci seruma tj. plazme su podeljeni u porcije i čuvani na -20 °C, u skladu sa prihvaćenim vremenskim intervalom za stabilnost uzorka za pojedine parametre, a najduže 3 meseca. Uzorci su čuvani zbog potrebe za ponavljanjem nekog od određivanja. Nakon odležavanja uzorci su recentrifugirani, kako bi se bilo koji nerastvorljivi materijal uklonio.

## 3.4. METODE

### 3.4.1. Određivanje koncentracije presepsina

Koncentracije presepsina određivane su kombinovanom metodom hemiluminescencije i Magtration® tehnologije na aparatu PATHFAST® Analyzer (Mitsubishi Chem Med, Japan).

*Princip metode:* Određivanje se zasniva na metodi koja kombinuje prednosti nekompetitivne hemiluminescencije (CLEIA) i Magtration® tehnologije. Za vreme inkubacije uzorka (u kome se određuje koncentracija presepsina) sa antipresepsin poliklonskim antitelima (obeležnim alkalnom fosfatazom) i antipresepsin monoklonskim antitelima (obloženih magnetnim česticama), presepsin iz uzorka se vezuje za antipresepsin antitela gradeći imunokompleks. Posle uklanjanja nevezanih supstanci Magtration® tehnologijom, dodaje se hemiluminescentni supstrat. Nakon kratke inkubacije, meri se intenzitet luminescencije generisan enzimskom reakcijom. Intenzitet luminescencije direktno je proporcionalan koncentraciji presepsina u uzorku. Magtration® je tehnologija razdvajanja, za *Bound/Free (B/F)* separaciju u nekoliko koraka u toku reakcije, pri čemu se magnetne čestice "ispiraju" u vrhu pipete aparata. Znak tehnologije je registrovan od "*Precision System Science*".

*Izvođenje:* Za određivanje presepsina u hepariniziranoj plazmi korišćen je reagens Presepsin test PATHFAST®, kit, Cat No PF1201-K. Pakovanje PATHFAST® sadrži 10 traka i u svakoj 6 kaseti, što znači da se iz jednog pakovanja može uraditi 60 testova. Svaka kaseti sadrži sledeće komponente:

1. Antipresepsin poliklonska antitela (zečija) obeležena alkalnom fosfatazom (50  $\mu$ L) i MES (2-morfolinoetansulfonska kiselina, monohidrat) pufer
2. Antipresepsin monoklonska antitela (mišja) obložena magnetnim česticama (50  $\mu$ L) i MES (2-morfolinoetansulfonska kiselina, monohidrat) pufer
3. Hemiluminescentni supstrat (100  $\mu$ L)
4. Tris pufer / pufer za diluciju uzorka (25  $\mu$ L)
5. MOPS (3-morfolinopropan sulfonska kiselina) pufer (400  $\mu$ L).

U pakovanju se nalaze i kalibratori poznate koncentracije za parametar presepsin.

Za kontrolu kvaliteta rada koriste se kontrolni uzorci poznatih koncentracija u dva nivoa (QC1/ QC2 *Presepsin Quality Control Materials*).

Postupak je automatizovan i izvodi se na aparatu PATHFAST® Analyzer (Mitsubishi, Japan).

Kao ispitivani uzorak koriste se puna krv ili plazma uzorkovana sa heparinom ili EDTA kao antikoagulansom. Serum se ne može koristiti za određivanje presepsina. Određivanje presepsina iz pune krvi mora se uraditi u roku od 4 sata od uzorkovanja, zato je preporučeni uzorak plazma. Uzorak plazme stabilan je 3 dana na 2–8 °C i 9 meseci na –20 °C.

*Izračunavanje:* Primenom kalibratora priprema se standardna kriva iz koje aparat mereći intenzitet luminescencije, koji je direktno proporcionalan koncentraciji presepsina u uzorku, automatski izračunava koncentraciju presepsina i rezultat ispisuje na ekranu aparata.

Metoda je linearna u opsegu 20 – 20 000 pg/mL

*Referentne vrednosti:* < 160 pg/mL

### **3.4.2. Određivanje prokalcitonina (PCT)**

Koncentracije prokalcitonina (PCT) određivane su imunohemijskom metodom na aparatima Luminometar Berthold LB 952 (BRAHMS, Germany) i Elecsys 2010 (Roche, Germany).

*Princip metode:* Određivanje na luminometru se zasniva na imunoluminometrijskoj tzv. LIA metodi, testu sa dva položaja po "sandwich" principu. Dva različito visoko specifična monoklonska antitela se koriste za oblaganje čvrste faze i obeleživača i

usmereni su na C-terminalni i mid-regionalne sekvence prokalcitonina. Anti-PCT antitela su vezana za obložene zidove epruveta i obeležena luminescentnim akridin derivatom. Nakon inkubacije uzorak se postavlja u luminometar. U reakciju se uvode vodonik peroksid i natrijum hidroksid, koji reaguju sa akridin derivatom vezujući se za anti-PCT antitela, pri čemu se emituje svetlost i nastaje akridon. Intenzitet emitovane svetlosti direktno je proporcionalan koncentraciji prokalcitonina u uzorku.

*Izvođenje:* Za određivanje prokalcitonina u serumu korišćen je reagens PCT BRAHMS LIA, kit, Cat No 54.1. koji sadrži:

1. *Tracer* (monoklonska mišja anti-PCT antitela obeležena luminescentnim akridin derivatom), 29 mL nakon rekonstituisanja sa puferom,
2. PCT standardi (S1-S6) poznate koncentracije; rekonstituišu se sa 0,25 mL *zero* seruma (po sastavu je humani serum),
3. PCT kontrole (K1 i K2); definisan opseg koncentracija; rekonstituišu se sa 0,25 mL *zero* seruma (po sastavu je humani serum),
4. Washing sol. Universal, 11 mL, rekonstituiše se destilovanom vodom do 550 mL
5. Epruvete obložene anti-PCT antitelima

Uzorak seruma stabilan je 24 sata na 2–8 °C i 3 meseca na –20 °C.

*Izračunavanje:* Primenom kalibratora priprema se standardna kriva iz koje aparat mereći intenzitet luminescencije, koji je direktno proporcionalan koncentraciji prokalcitonina u uzorku, automatski izračunava koncentraciju i rezultat ispisuje na ekranu aparata.

Metoda je linearna u opsegu 0,1 – 500 ng/mL.

*Referentne vrednosti:* < 0,5 ng/mL

*Princip metode:* Metoda kojom se prokalcitonin određuje na aparatu Elecsys 2010 se zasniva na elektrohemioluminescentnom imunoodređivanju (ECLIA) po "sandwich" principu. Elektrohemioluminiscencija je tip luminiscencije u kome je ekscitacija posledica elektrohemijske reakcije. Rutenijum (II) tris (bipiridil) helat je najčešće korišćen elektrohemioluminiscentni obeleživač, a elektrohemioluminiscencija se stvara na elektrodi u reakciji tipa oksido-redukcije sa riropilaminom. Princip reakcije je sledeći: u prvoj inkubaciji, antigen iz uzorka, biotinom obeležena antitela i antitela obeležena rutenijum kompleksom (rutenijum (II) tris (bipiridil) formiraju kompleks "sendvič".

Nakon dodatka streptavidinom obloženih mikročestica kompleks se vezuje za čvrstu fazu interakcijom biotina i streptavidina. Nakon inkubacije reakciona smeša se aspirira u mernu ćeliju gde mikro čestice oblažu površinu elektrode. Nevezane supstance se uklanjaju sa puferom. Promenom napona na elektrodi dolazi do indukcije hemiluminiscentne emisije koja se meri pomoću fotomultiplikatora.

*Izvođenje:* Za određivanje prokalcitonina u serumu korišćen je reagens PCT Brahms Elecsys, kit, Cat No 05056888200 koji sadrži:

1. R1: anti-PCT mišja monoklonska antitela obeležena biotinom, fosfatni pufer, konzervans (spreman za upotrebu),
2. R2: anti-PCT mišja monoklonska antitela obeležena rutenijum kompleksom, fosfatni pufer, konzervans (spreman za upotrebu),
3. Kalibratori: Elecsys Brahms PCT Cal1 i Cal2 – rekombinantni PCT (dva opsega koncentracija: oko 0,1 ng/mL i oko 54 ng/mL) u humanom serum matriksu; kalibratore je potrebno rastvoriti u 4 mL destilovane vode,
4. Kontrolni uzorak: Elecsys PreciControl PCT 1 i 2; kontrolni uzorak je potrebno rastvoriti u 4 mL destilovane vode.
5. Reagens M: streptavidinom obložene mikropartikule.

Za nesmetan rad analizatora Elecsys neophodni su i reagensi Universal Diluent Elecsys, Cat No 03183971122 i Probe Wash M Elecsys, Cat No 03005712190.

Uzorak seruma stabilan je 24 sata na 2–8 °C i 3 meseca na –20 °C.

*Izračunavanje:* Rezultati se određuju pomoću odgovarajućeg softvera poređenjem elektroheminiscentnog signala dobijenog iz uzorka sa granicom odlučivanja prethodno dobijenom kalibracijom sa pripremljenim kalibratorima.

Metoda je linearna u opsegu 0,02 – 100 ng/mL

*Referentne vrednosti:* < 0,5 ng/mL

Napomena: Poređenjem metoda za određivanje prokalcitonina, ECLIA BRAHMS PCT i BRAHMS PCT LIA, linearnom regresijom dobijeni su sledeći podaci:

$$y = 1,184x - 0,326; r = 0,975, n = 447$$

### 3.4.3. Određivanje LBP (*Lipopolysaccharide binding protein*)

Koncentracije LBP u serumu određivane su metodom imunohemiluminescencije na aparatu IMMULITE 2000 (Siemens, Germany).

*Princip metode:* Metoda predstavlja dvostepeni imunoesej zasnovan na CLIA (*Chemiluminescent Immuno Assay*) tehnologiji. Prvi korak podrazumeva mešanje uzorka i perli koje su obložene monoklonskim anti-LBP antitelima murine. LBP iz uzorka se vezuje za anti-LBP obložene čestice. Nakon inkubacije dodaje se konjugat poliklonalnih zečijih anti-LBP antitela i alkalne fosfataze. Nevezani materijal se uklanja ispiranjem. Nakon dodavanja hemiluminescentnog supstrata dolazi do hemiluminescentne reakcije koja se meri optičkim sistemom kao vrednost relativnih svetlosnih jedinica. Intenzitet reakcije je proporcionalan količini LBP u uzorku.

*Izvođenje:* Za određivanje LBP u serumu korišćeni su sledeći reagensi:

1. Immulite® 2000 LBP (Lipopolysaccharide binding protein), kit, Cat No L2KLB2; sadrži LBP Pack sa 200 perli obloženih monoklonskim anti-LBP antitelima murine, 11,5 mL konjugata poliklonalnih zečijih anti-LBP antitela i alkalne fosfataze, 2 kalibratora i 50mL *LBP-free protein* pufera (za razblaživanje uzoraka);
2. Immulite® LBP Control Module, Cat No LLBCM;
3. Immulite® Chemiluminescent Substrate, Cat No L2SUBM;
4. Immulite® Probe Wash, Cat No L2PWSM.

Postupak je automatizovan i izvodi se na prema uputstvu proizvođača na aparatu IMMULITE 2000 (Siemens, Germany).

Prema uputstvu proizvođača uzorak seruma stabilan je 3 dana na 2–8 °C tj. 30 dana na –20 °C.

*Izračunavanje:*

Primenom kalibratora priprema se standardna kriva iz koje aparat automatski izračunava koncentraciju LBP i rezultat ispisuje na ekranu aparata.

Metoda je linearna u opsegu 1,2 – 126 µg/mL

*Referentne vrednosti:* 2,2 – 11,4 µg/mL



#### 3.4.4. Određivanje interleukina 6 (IL-6)

Koncentracije IL-6 u serumu određivane su metodom imunohemiluminescencije na aparatu IMMULITE 2000 (Siemens, Germany).

*Princip metode:* Metoda predstavlja dvostepeni imunoesej zasnovan na CLIA (*Chemiluminescent Immuno Assay*) tehnologiji. Prvi korak podrazumeva mešanje uzorka i perli koje su obložene monoklonskim anti-IL-6 antitelima murine. IL-6 iz uzorka se vezuje za anti-IL-6 obložene čestice. Nakon inkubacije dodaje se konjugat poliklonalnih zečijih anti-IL-6 antitela i alkalne fosfataze. Nevezani materijal se uklanja ispiranjem. Nakon dodavanja hemiluminescentnog supstrata dolazi do hemiluminescentne reakcije koja se meri optičkim sistemom kao vrednost relativnih svetlosnih jedinica. Intenzitet reakcije je proporcionalan količini IL-6 u uzorku.

*Izvođenje:* Za određivanje IL-6 u serumu korišćeni su sledeći reagensi:

1. Immulite® 2000 IL-6, kit, Cat No L2K6P2; sadrži IL-6 Pack sa 200 perli obloženih monoklonskim anti-IL-6 antitelima murine, 18,5 mL konjugata poliklonalnih ovčijih anti-IL-6 antitela i alkalne fosfataze i 2 kalibratora;
2. Immulite® Cytokine Control Module, Cat No LILCM;
3. Immulite® Chemiluminescent Substrate, Cat No L2SUBM;
4. Immulite® Multi Diluent 2, Cat No L2M2Z4;
5. Immulite® Probe Wash, Cat No L2PWSM.

Postupak je automatizovan i izvodi se na prema uputstvu proizvođača na aparatu IMMULITE 2000 (Siemens, Germany).

Prema uputstvu proizvođača uzorak seruma stabilan je 1 dan na 2–8 °C tj. 6 meseci na –20 °C.

*Izračunavanje:*

Primenom kalibratora priprema se standardna kriva iz koje aparat automatski izračunava koncentraciju IL-6 i rezultat ispisuje na ekranu aparata.

Metoda je linearna u opsegu 0 – 280 pg/mL

*Referentne vrednosti:* 0 – 5,9 pg/mL

### 3.4.5. Određivanje koncentracije C-reaktivnog proteina (CRP)

Koncentracije C-reaktivnog proteina (CRP) u serumu određivane su imunonefelometrijskom metodom na laserskom nefelometru (BN II, Dade Behring).

*Princip metode:* Određivanje CRP se zasniva na imunoheмиjskoj reakciji u toku koje polistirenske čestice obložene sa antitelima na humani CRP aglutiniraju kada se pomešaju sa uzorkom koji sadrži CRP (antigen). Propuštanjem snopa svetlosti (infracrveni deo spektra  $\lambda=840$  nm) kroz nastalu suspenziju antigen-antitelo kompleksa dolazi do njenog rasipanja. Intenzitet rasute svetlosti proporcionalan je količini formiranih imunokompleksa i upoređuje se sa odgovarajućim vrednostima iz standardne krive, predhodno odrađene sa razblaženjima standarda poznate koncentracije za CRP.

*Izvođenje:* Za određivanje CRP u serumu korišćeni su sledeći reagensi:

1. N Latex hsCRP mono, Cat No OQIY21; liofilizat; sadrži polistirenske čestice obložene mišjim monoklonalnim anti-CRP antitelima;
2. N Rheumatology Standard SL, Cat No OQKZ13; gotov za upotrebu, sadrži proteine humanog porekla i koristi se za kalibraciju;
3. N/T Rheumatology Control SL/1, Cat No OQDB13; sadrži proteine humanog porekla i koristi se za kontrolu kvaliteta rada;
4. N/T Rheumatology Control SL/2, Cat No OQDC13; sadrži proteine humanog porekla i koristi se za kontrolu kvaliteta rada;
5. Cleaner SCS, Cat No OQUB19; sadrži natrijum hidroksid (< 2%) i deterdžent i koristi se za ispiranje igala na aparatu;
6. N Diluent, Cat No OUMT65; koristi se za razblaživanje uzoraka (pri određivanju) i standarda (pri kalibraciji);
7. N Reaction Buffer, Cat No OUMS65; zajedno sa diluentom obezbeđuje optimalne reakcione uslove i povećava brzinu formiranja imunih kompleksa.

Postupak je automatizovan i izvodi se na nefelometru.

Prema uputstvu proizvođača uzorak seruma stabilan je 8 dana na 2–8 °C.

*Izračunavanje:*

Primenom kalibratora priprema se standardna kriva iz koje aparat automatski izračunava koncentraciju CRP i rezultat ispisuje na ekranu aparata.

Metoda je linearna u opsegu 0,2 – 55 mg/L.

Referentne vrednosti: odrasli < 2,87 mg/L

### 3.4.6. Određivanje aktivnosti antitrombina III

Aktivnost antitrombina III određivana je spektrofotometrijski, primenom komercijalnih reagenasa firme Siemens (ranije Dade Behring) (kataloški broj OWWR15) na aparatu BCS XP System.

*Princip metode:* Trombin i heparin u višku inkubiraju se sa plazmom pacijenta razblaženom imidazol puferom kada se stvara kompleks AT III-heparin. Ostatak trombina određuje se kinetičkim testom merenjem povećanja apsorpcije nastalog p-nitroanilina na 405 nm.

*Izvođenje:* Za određivanje korišćeni su sledeći reagensi:

1. Trombin regens, liofilizat; sadrži heparin i aprotinin kao aditiv;
2. Supstrat regens, liofilizat; koncentracija u radnom rastvoru: tos-gly-pro-arg-ANBA-IPA (4 mmol/L);
3. Tris pufer (100 mmol/L, pH 8,2).

Materijal za analizu je citratna plazma.

Postupak je automatizovan i izvodi se na sledeći način u kivetama aparata:

Citratna plazma	3 $\mu$ L
Trombin regens	175 $\mu$ L
Promešati i inkubirati 3 min na 37 °C	
Supstrat regens	33 $\mu$ L
Merenje $\Delta A/\text{min}$ na 405 nm	

*Izračunavanje:* Primenom standardne humane plazme priprema se standardna kriva iz koje aparat automatski izračunava aktivnost antitrombina III i rezultat ispisuje na ekranu aparata.

Referentne vrednosti: 75 – 120 % aktivnosti od normale

### 3.4.7. Određivanje aktivnosti proteina C

Aktivnost proteina C određivana je spektrofotometrijski, primenom komercijalnih reagenasa firme Siemens (ranije Dade Behring) (kataloški broj OUVV17) na aparatu BCS XP System.

*Princip metode:* Protein C iz uzorka plazme se aktivira specifičnim aktivatorom iz zmijskog otrova. Nagrađeni aktivirani protein C se određuje kinetičkim testom u kome se meri povećanje apsorbancije na 405 nm stvorenog metoksi-nitroanilina koji se oslobađa dejstvom aktiviranog proteina C na supstrat.

*Izvođenje:* Reagensi koji se koriste u testu:

1. Protein C aktivator: Ekstrakt zmijskog otrova *Agkistrodon contortrix*, liofilizat;
2. Hepes pufer: HEPES (25 mmol/L), polietilen-glikol (25 g/L), cezijum-hlorid (5 g/L), pH 8,253;
3. Supstrat reagens: Piro-glutaminska kiselina-prolin-arginin-metoksi-nitroanilid (p-glu-pro-arg-MNA), liofilizat, koncentracija u radnom rastvoru 4 mmol/L.

Postupak je automatizovan i izvodi se na sledeći način u kivetama aparata:

Uzorak plazme	25 $\mu$ L
Protein C aktivator	250 $\mu$ L
Promešati i inkubirati 5 min na 37 °C	
Supstrat reagens	50 $\mu$ L
Merenje $\Delta A/\text{min}$ na 405 nm	

*Izračunavanje:* Primenom standardne humane plazme priprema se standardna kriva iz koje aparat automatski izračunava aktivnost proteina C i rezultat ispisuje na ekranu aparata.

*Referentne vrednosti:* 70 – 140 % aktivnosti od normale

### 3.4.8. Određivanje aktivnosti plazminogena

Aktivnost plazminogena određivana je spektrofotometrijski, primenom komercijalnih reagenasa firme Siemens (ranije Dade Behring) (kataloški broj OUCA17) na aparatu BCS XP System.

*Princip metode:* Plazminogen u uzorku plazme stvara kompleks sa streptokinazom u kiveti. Koncentracija ovog kompleksa određuje se u kinetičkoj reakciji mereći povećanje apsorbancije na 405 nm od stvorenog p-nitroanilina, koji se oslobađa iz supstrata dejstvom kompleksa plazminogen-streptokinaza.

*Izvođenje:* Reagensi koji se koriste u testu su streptokinaza i plazmin supstrat (koncentracija u radnom rastvoru je 3 mmol/L HD-norvalil-ciklo-heksilalanil-lizil-p-nitroanilid (HD-Nva-CHA-lys-pNA)). Kao materijal za analizu koristi se citratna plazma.

Postupak je automatizovan i izvodi se na sledeći način u kivetima aparata:

Uzorak plazme	20 $\mu$ L
Streptokinaza reagens	1000 $\mu$ L
Promešati i inkubirati 5 min na 37 °C	
Plazmin supstrat	100 $\mu$ L
Merenje $\Delta A/\text{min}$ na 405 nm	

*Izračunavanje:* Primenom standardne humane plazme priprema se standardna kriva iz koje aparat automatski izračunava aktivnost plazminogena i rezultat ispisuje na ekranu aparata.

*Referentne vrednosti:* 75 – 120 % aktivnosti od normale

### 3.4.9. Određivanje koncentracije D-dimera

Koncentracija D-dimera određivana je metodom latex-turbidimetrije, primenom komercijalnog reagensa D-dimer firme Siemens (ranije Dade Behring) (kataloški broj OQWW11) na aparatu BCS XP System.

*Princip metode:* Polistirenske čestice koje su kovalentno vezane za monoklonalna antitela na D-dimeru ukrštaju se sa fibrin-degradacionom proizvodima tj. D-dimerom. Aglutinirajuća reakcija se detektuje turbidimetrijski kroz povećanje turbiditeta. Kao materijal za analizu koristi se citratna plazma. Test se izvodi automatski po programu za aparat BCS XP System .

*Izračunavanje:* Primenom D-dimer standardne plazme priprema se standardna kriva iz koje aparat automatski računa nepoznatu koncentraciju i rezultat ispisuje na ekranu aparata.

*Referentne vrednosti:* < 246 µg/L

#### **3.4.10. Određivanje hematoloških parametara na brojaču**

Vrednosti hemoglobina, brojčane koncentracije trombocita i leukocita i njihovo diferenciranje određivane su na automatskom hematološkom protočnom citometru HmX (Beckman Coulter) koji koristi 3D VCS tehnologiju.

*Princip metode:* Krvne ćelije slabije provode električnu struju od elektrolita u kojem su suspendovane. Određivanje brojčane koncentracije leukocita i trombocita zasniva se na merenju promena u električnom otporu koji stvaraju krvne ćelije prolazeći kroz pukotinu određenog promera. Vrednost hemoglobina određuje se spektrofotometrijskom metodom jer se dejstvom lizirajućeg sredstva oslobađa hemoglobin iz eritrocita koji se određuje kao cijanmethemoglobin. Diferencijacija pojedinih populacija leukocita zasniva se na tipičnim morfološkim karakteristikama leukocita posle dejstva lizirajućeg reagensa. Lizirajući reagens deluje na membranu limfocita tako da je smežura i obavije oko jedra; kod monocita jedro je kompaktno i ono se tako može registrovati, dok segmentirani granulociti bivaju zaštićeni od lizirajućeg reagensa. Na ovaj način, brojanjem 500 do 1000 ćelija, moguće je leukocite izdiferencirati u grupe ćelija – limfocite, mononukleusne ćelije, eozinofilne, bazofilne i segmentirane granulocite.

*Izvođenje:* Postupak je automatizovan i izvodi se primenom komercijalnih reagenasa Isoton III Diff, Cat No 8448044, Lyse III Diff, Cat No 8448155 i Clenz, Cat No 8448222 (Beckman Coulter, Inc., Brea, CA, USA). Kontrola kvaliteta rada obezbeđuje

se primenom komercijalnih kontrolnih uzoraka proizvođača opreme i reagensa, sa definisanim opsegom vrednosti u 3 nivoa Control: 5C Tri-Pack, Cat No 7547001.

*Izračunavanje:* Aparat meri, očitava i automatski ispisuje na ekranu koncentraciju hemoglobina u krvi, brožanu koncentraciju leukocita i trombocita, kao i procentualni udeo svake populacije leukocita i njihov apsolutni broj.

*Referentne vrednosti:*

Hemoglobin	132 – 175 g/L
Trombociti	150 – 400 × 10 <sup>9</sup> /L
Leukociti	4,0 – 10,0 × 10 <sup>9</sup> /L
Neutrofilni granulociti (segmentirani)	44 – 72%
Limfociti	20 – 46%
Mononukleusne ćelije	2 – 12%
Eozinofilni granulociti	0 – 7%
Bazofilni granulociti	0 – 2%

#### **3.4.11. Određivanje koncentracije ukupnih proteina**

Koncentracija ukupnih proteina u serumu određivana je spektrofotometrijski primenom komercijalnih reagenasa na višekanalnom biohemijskom analizatoru- spektrofotometru sa jon-selektivnim elektrodama (Olympus AU 400, Olympus, Hamburg, Germany).

*Princip metode:* Za određivanje ukupnih proteina u serumu korišćena je spektrofotometrijska metoda sa biuret reagensom gde kupri joni u alkalnoj sredini reaguju sa peptidnim vezama proteina gradeći ljubičasto obojeni kompleks sa maksimalnom apsorbancom na 546 nm. Intenzitet apsorbancije ovog kompleksa direktno je proporcionalan koncentraciji proteina u uzorku.

Prema uputstvu proizvođača uzorak seruma stabilan je 7 dana na sobnoj temperaturi tj. 30 dana na 2–8 °C.

*Izvođenje:* Postupak je automatizovan i izvodi se u kivetama aparata primenom komercijalnog reagensa Olympus TOTAL PROTEIN, Cat No OSR6232. Reagens je pripremljen za upotrebu i sadrži natrijum hidroksid (200 mmol/L), natrijum-kalijum-tartarat (32 mmol/L), kupri sulfat (18,8 mmol/L) i kalijum jodid (30 mmol/L).

Za kalibraciju se koristi Olympus System Calibrator Cat No 66300 slediv prema Olympus Master Calibratoru.

Za kontrolu kvaliteta rada koriste se komercijalni kontrolni uzorci firme proizvođača reagensa i to su Control Sera level 1, Cat No ODC0003 i Control Sera level 2, Cat No ODC0004, koji su već pripremljeni za upotrebu.

*Izračunavanje:*

Primenom kalibratora priprema se standardna kriva iz koje aparat automatski izračunava koncentraciju ukupnih proteina i rezultat ispisuje na ekranu aparata.

Metoda je linearna u opsegu 30 – 120 g/L.

*Referentne vrednosti:* odrasli 62 – 81 g/L

### **3.4.12 Određivanje koncentracije albumina**

Koncentracija albumina u serumu određivana je spektrofotometrijskom metodom primenom komercijalnih reagenasa na višekanalnom biohemijskom analizatoru – spektrofotometru sa jon-selektivnim elektrodama (Olympus AU 400, Olympus, Hamburg, Germany).

*Princip metode:* Za određivanje albumina u serumu korišćena je spektrofotometrijska metoda koja se zasniva na vezivanju serumskog albumina za boju brom krezol zeleno (BCG) pri čemu nastaje zeleno obojeni kompleks sa maksimalnom apsorbancom na 578 nm. Intenzitet apsorbancije ovog kompleksa direktno je proporcionalan koncentraciji albumina u uzorku.

Prema uputstvu proizvođača uzorak seruma stabilan je 7 dana na sobnoj temperaturi tj. 30 dana na 2–8 °C.

*Izvođenje:* Postupak je automatizovan i izvodi se u kivetama aparata primenom komercijalnog reagensa Olympus ALBUMIN, Cat No OSR6202. Reagens je pripremljen za upotrebu i sadrži sukcinat pufer (pH 4,2) i brom krezol zeleno (0,2 mmol/L).

Za kalibraciju se koristi Olympus System Calibrator Cat No 66300 slediv prema Olympus Master Calibratoru.



Za kontrolu kvaliteta rada koriste se komercijalni kontrolni uzorci firme proizvođača reagensa i to su Control Sera level 1, Cat No ODC0003 i Control Sera level 2, Cat No ODC0004, koji su već pripremljeni za upotrebu.

*Izračunavanje:*

Primenom kalibratora priprema se standardna kriva iz koje aparat automatski izračunava koncentraciju albumina i rezultat ispisuje na ekranu aparata.

Metoda je linearna u opsegu 15 – 60 g/L.

*Referentne vrednosti:* odrasli 34 – 55 g/L

### **3.4.13 Određivanje koncentracije kalijuma**

Koncentracija kalijuma u serumu određivana je metodom indirektno potencijometrije primenom jon selektivnih elektroda koje su sastavni deo višekanalnog biohemijškog analizatora sa ISE modulom (Olympus AU 400, Olympus, Hamburg, Germany).

*Princip metode:* ISE modul sadrži jon-selektivne elektrode za  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  i  $\text{Cl}^-$  i tu nastaje električni potencijal prema Nernstovoj jednačini za specifični jon. Kada se potencijal uporedi sa potencijalom referentne elektrode, prevodi se u napon, a zatim u koncentraciju jona u uzorku.

Prema uputstvu proizvođača uzorak seruma stabilan je 7 dana na temperaturi od 2–8 °C.

*Izvođenje:* Postupak je automatizovan i izvodi se primenom sledećih komercijalnih reagenasa čiji sastav je sledeći:

- OE 66313 ISE  $\text{Na}^+$  /  $\text{K}^+$  Selectivity Check ( $\text{Na}^+$  150 mmol/L i  $\text{K}^+$  5 mmol/L),
- OE 66314 ISE Internal Reference (KCl 3,3 mmol/L, AgCl saturated),
- OE 66316 ISE High Serum Standard ( $\text{Na}^+$  160 mmol/L,  $\text{K}^+$  6 mmol/L i  $\text{Cl}^-$  120 mmol/L),
- OE 66317 ISE Low Serum Standard ( $\text{Na}^+$  130 mmol/L,  $\text{K}^+$  3,5 mmol/L i  $\text{Cl}^-$  85 mmol/L),
- OE 66318 ISE Reference (KCl 1,0 mmol/L),
- OE 66319 ISE Mid-Standard ( $\text{Na}^+$  4,3 mmol/L,  $\text{K}^+$  0,13 mmol/L i  $\text{Cl}^-$  3,1 mmol/L),
- OE 66320 ISE Buffer (Triethanolamine 0,1 mol/L).

Za kontrolu kvaliteta rada koriste se komercijalni kontrolni uzorci firme proizvođača reagensa i to u dva nivoa.

*Izračunavanje:*

Primenom kalibratora priprema se standardna kriva iz koje aparat automatski izračunava koncentraciju kalijuma i rezultat ispisuje na ekranu aparata.

Metoda je linearna u opsegu 1,0 – 10,0 mmol/L

*Referentne vrednosti:* odrasli 3,5 – 5,1 mmol/L

#### **3.4.14 Određivanje koncentracije neorganskog fosfora**

Koncentracija neorganskog fosfora u serumu određivana je spektrofotometrijskom metodom primenom komercijalnih reagenasa na višekanalnom biohemijskom analizatoru – spektrofotometru sa jon-selektivnim elektrodama (Olympus AU 400, Olympus, Hamburg, Germany).

*Princip metode:* Za određivanje koncentracije neorganskog fosfora korišćena je spektrofotometrijska metoda koja se zasniva na reakciji serumskog neorganskog fosfora sa molibdatom pri čemu nastaje heteropoliacidni kompleks. Intenzitet apsorbancije ovog kompleksa izmeren na 340/380 nm direktno je proporcionalan koncentraciji neorganskog fosfora u uzorku.

Prema uputstvu proizvođača uzorak seruma stabilan je 8 sati na sobnoj temperaturi tj. 7 dana na 2–8 °C.

*Izvođenje:* Postupak je automatizovan i izvodi se u kivetama aparata primenom komercijalnog reagensa Olympus INORGANIC PHOSPHORUS, Cat No OSR6122. Reagens je pripremljen za upotrebu i sadrži amonijumheptamolibdat (0,35 mmol/L), sumpornu kiselinu (200 mmol/L) i glicin (50 mmol/L).

Za kalibraciju se koristi Olympus System Calibrator Cat No 66300 slediv prema Olympus Master Calibrator.

Za kontrolu kvaliteta rada koriste se komercijalni kontrolni uzorci firme proizvođača reagensa i to su Control Sera level 1, Cat No ODC0003 i Control Sera level 2, Cat No ODC0004, koji su već pripremljeni za upotrebu.

*Izračunavanje:*

Primenom kalibratora priprema se standardna kriva iz koje aparat automatski izračunava koncentraciju neorganskog fosfora i rezultat ispisuje na ekranu aparata.

Metoda je linearna u opsegu 0,3 – 6,4 mmol/L.

*Referentne vrednosti:* odrasli 0,81 – 1,55 mmol/L

### **3.4.15. Mikrobiološka ispitivanja**

Uzorci peritonealnog sadržaja uzimani su tokom prve hirurške intervencije. Mikrobiološka ispitivanja uzoraka peritonealnog sadržaja obavljena su u laboratorijama Službe za mikrobiologiju Kliničkog centra Srbije. Kod ispitivanih bolesnika sa sepsom izolovani su sledeći mikrobiološki uzročnici infekcije: *E. coli*, *Proteus mirabilis*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella*, *Enterococcus*, *Enterobacter* i *Pseudomonas*. Najveću frekvencu pojavljivanja imale su gram negativne bakterije, pre svih *E. Coli* i *Pseudomonas*. Prvenstveno su to bile polimikrobne infekcije, što je jako važno znati s gledišta primenjene antibiotske terapije, ali i zbog velikog stepena toksičnog oštećenja. Antibiotska terapija podrazumevala je kombinovanu primenu većeg broja lekova različitog načina delovanja i širine bakterijskog spektra. Korišćeni su:

- Ciprofloksacin (*Marocen, Ciprocinal*) iz grupe fluorohinilona
- Cefalosporini III generacije (*Ceftriaxon, Longacef*)
- Karbapanemi (*Tienam, Invans, Maronem*)
- Metronidazol (*Orvagil, Efloran*)
- Penicilin (*Piptaz, Tazobaktam*).

### 3.5. ANALIZA PODATAKA

U radu su izračunavani sledeći statistički parametri:

- srednja vrednost ( $\bar{x}$ ) i standardna devijacija (Sd)
- najniža i najviša vrednost (min i max)
- medijana (Me) i percentilne vrednosti
- interval pouzdanosti (CI, *Confidence interval*)
- Spearmanov koeficijent korelacije
- Površina ispod ROC krive (AUC) i *cutt-off* vrednost

U radu su korišćene sledeće statističke metode:

- Kolmogorov Smirnov test
- Neparametarski t-test (Mann-Whitney U test)
- Neparametarska korelaciona analiza (Spearman-ova korelacija)
- Analiza ROC (*Receiver Operating Characteristic*) krive

Za statističku analizu i dobijanje dijagrama korišćeni su sledeći statistički i kompjuterski programi: SPSS Statistics ver. 20, IBM Software, NY, USA i Excel 2007.

## 4. REZULTATI

### 4.1. Značaj preoperativnog i postoperativnog određivanja biomarkera sepsa

Sepsa podrazumeva pojavu opšte inflamatorne reakcije organizma na infekciju. Povišena telesna temperatura ili pothlađenost, groznica, ubrzano disanje i ubrzan rad srca najavljuju početak sistemskog upalnog odgovora na invaziju mikroorganizma, nazvanog *sepsa*. Sepsa je obično ograničena regulatornim mehanizmima. Kada ovi mehanizmi bivaju nadjačani, i to onda kada mikroorganizam krene iz lokalnog žarišta u cirkulaciju, homeostaza može zatajiti i tada nastaje stanje *teške sepsa*. Dalje zatajivanje regulacije vodi u *septički šok* koji je obeležen hipotenzijom i disfunkcijom organa. Sepsu i septični šok izazivaju brojne gram-pozitivne i gram-negativne bakterije koje pokreću imuno-metaboličku reakciju organizma poznatu kao "sistemski inflamatorni odgovor" tj. SIRS.

U toku stanja inflamacije, koncentracije i aktivnost pojedinih parametara se menjaju te se ova činjenica koristi kako za dijagnostiku tako i dalje u praćenju bolesti tokom lečenja.

Iako su prva istraživanja parametara hemostaze ukazivala na značaj određivanja antitrombina III u septičnim stanjima, praćenjem proteina C i nekih drugih parametara hemostaze dobijena su vrlo značajna saznanja. Smanjena aktivnost ovih parametara, a time i njihovo antikoagulantno delovanje pravovremeno upozorava na opasnost od razvoja DIK-a.

Dugogodišnji osnovni markeri sepsa koji se određuju i prate kod svih pacijenata su brzina sedimentacije eritrocita i hematološki parametri, pre svih broj trombocita i leukocita kao i diferencijacija leukocitarne formule. Samo "sistemski inflamatorni odgovor" tj. SIRS, za posledicu će imati povećanje broja leukocita i to polimorfonuklearnih leukocita sa pojavom nezrelih formi u perifernoj cirkulaciji. Smanjene vrednosti ukupnih proteina i albumina i promena u elektrolitnom statusu kao posledica septičnih stanja potencijalni su uzrok renalne i dalje respiratorne insuficijencije tj. razvoja tzv. MODS-a (*multiple organ dysfunction syndrome*).

Najčešće korišćen biomarker sepse je C-reaktivni protein (CRP) koji ima visoku osetljivost, ali malu specifičnost. Poslednjih godina se prokalcitonin preporučuje kao dobar biomarker sepse. Ima visoku specifičnost i osetljivost i pokazuje vrlo brzu indukciju jer nivo raste kao odgovor na stimulus u roku od 6 sati. Kao najnoviji u nizu biomarkera sepse određuje se presepsin. Pojavljuje se u krvi kao odgovor na bakterijsku infekciju sa koncentracijama visokim već u ranoj fazi razvoja sepse i ispoljava visoku osetljivost i specifičnost.

Da bi se procenila klinička vrednost određivanih parametara u stanju inflamacije odnosno njihova uloga i promene kojima podležu, određivane su koncentracije i aktivnost parametara tj. biomarkera sepse kod zdravih osoba i pacijenata sa intraabdominalnom infekcijom kod kojih je potvrđena sepsa ili samo "sistemski inflamatorni odgovor" tj. SIRS.

Svi određivani parametri su upoređeni kod sve tri grupe, u danima lečenja, čime je omogućeno da se utvrdi da li njihovo određivanje može da posluži za pravovremeno otkrivanje sepse i da, uz adekvatan terapijski postupak, njihovim praćenjem može doći do poboljšanja i konačno izlečenja.

## **4.2. Klinička vrednost biomarkera sepse u prvoj studiji**

Prvi deo istraživanja obuhvatio je 98 pacijenata sa akutnim abdominalnim bolom koji su pri dolasku u Urgentni centar ispunjavali kriterijume za SIRS (*Systemic Inflammation Response Syndrom*). Nakon hirurške intervencije, potvrde laboratorijskih ispitivanja i pozitivnog mikrobiološkog nalaza 58 pacijenata svrstano je u grupu pacijenata sa dijagnozom sepse (grupa C1), dok je ostalih 40 pacijenata svrstano u grupu pacijenata koji su razvili SIRS (grupa B1). Kod pacijenata uzorci krvi za određivanje ispitivanih parametara uzimani su u vreme prijema kao i u sledećih pet dana nakon intervencije. U ispitivanje je bilo uključeno i 90 zdravih osoba, 49 žena i 41 muškarac, starosne dobi od 27 do 84 godine (grupa A1).

#### 4.2.1. Biomarkeri sepse preoperativno i postoperativno kod ispitivanih osoba

U prvoj studiji su određivani sledeći parametri: prokalcitonin, C-reaktivni protein (CRP), antitrombin III (AT III), protein C (PC), plazminogen (PLG), D-Dimer, hemoglobin (HGB), leukociti i trombociti (PLT). Određivanje je obuhvatilo sve tri grupe ispitanika i to zdrave osobe (grupa A1), pacijente sa "sistemski inflamatornim odgovorom" tj. SIRS (grupa B1) i pacijente sa potvrđenom sepsom (grupa C1). Pacijenti primljeni u Urgentni centar su podvrgnuti hitnoj hirurškoj intervenciji. Vrednosti markera su izmerene na dan prijema, preoperativno, i u sledećih pet dana postoperativnog lečenja. Rezultati određivanih parametara za grupe ispitanika preoperativno i u danima postoperativnog lečenja prikazani su u Tabelama XIII – XXI.

U grupi pacijenata sa "sistemski inflamatornim odgovorom" tj. SIRS (grupa B1), uočeno je sledeće:

- vrednost koncentracije prokalcitonina na dan prijema, preoperativno, kao i prvog, drugog, trećeg, četvrtog i petog dana lečenja postoperativno je statistički značajno viša u odnosu na grupu zdravih osoba (Tabela XIII)
- unutar grupe prvog, drugog i trećeg dana lečenja postoperativno zabeležene su statistički značajno povišene vrednosti koncentracija prokalcitonina u odnosu na preoperativne vrednosti (na dan prijema)
- četvrtog i petog dana unutar grupe statistički značajno je sniženje vrednosti koncentracije prokalcitonina u odnosu na prvi i drugi dan lečenja postoperativno.

Kod pacijenata sa potvrđenom sepsom (C1) vrednosti koncentracije prokalcitonina (Tabela XIII) su bile:

- na dan prijema, preoperativno, statistički značajno više u odnosu na grupu zdravih (A1) i pacijente sa SIRS (B1), kao i
- prvog, drugog, trećeg i četvrtog dana postoperativnog lečenja statistički značajno više u odnosu na grupu zdravih (A1) i pacijente sa SIRS (B1),
- unutar grupe svih dana postoperativnog lečenja statistički značajno više u odnosu na preoperativne vrednosti (na dan prijema),
- unutar grupe trećeg i četvrtog dana postoperativnog lečenja statistički značajno niže vrednosti u odnosu na vrednosti prvog i drugog dana postoperativnog lečenja.

- petog dana postoperativnog lečenja statistički značajno niže u odnosu na vrednosti prvog, drugog i trećeg dana lečenja, ali statistički značajno više u odnosu na grupu zdravih osoba (A1).

Koncentracije prokalcitonina po danima nakon prijema u grupi pacijenata sa sepsom i SIRS su prikazani na Slici 11.

Koncentracija CRP povećana je kod svih pacijenata na lečenju, i sa "sistemski inflamatornim odgovorom" tj. SIRS i sa sepsom. Vrednosti ovog parametra su statistički značajno više u svim danima postoperativnog lečenja u odnosu na vrednosti zdravih osoba (Tabela XIV).

Kod pacijenta sa sepsom vrednosti su statistički značajno više prvog, drugog i trećeg dana postoperativnog lečenja u odnosu na dan prijema, preoperativno. Nakon tri dana lečenja, dakle trećeg, četvrtog i petog dana, vrednosti CRP bile su statistički značajno niže u odnosu na prvi i drugi dan postoperativno. Takođe, četvrtog i petog dana CRP je statistički značajno niži u odnosu na prethodne dane (treći i četvrti dan postoperativno). Izmerene vrednosti za CRP kod bolesnika sa sepsom ni u jednom danu praćenja (ni preoperativno, ni postoperativno) nisu pokazale statističku značajnost u odnosu na vrednosti CRP kod bolesnika sa dijagnozom SIRS.

Kod pacijenata sa "sistemski inflamatornim odgovorom" tj. SIRS, vrednosti CRP su, takođe, bile statistički značajno više prvog i drugog dana postoperativno u odnosu na dan prijema (preoperativno). Statistički značajno niže vrednosti evidentne su trećeg postoperativnog dana u odnosu na drugi tj. četvrtog i petog dana u odnosu na prvi, drugi i treći dan postoperativno.

Koncentracije CRP po danima nakon prijema u grupi pacijenata sa sepsom i SIRS su prikazani na Slici 12.

Na Slici 13. su prikazane koncentracije prokalcitonina i CRP kod zdravih osoba (A), i preoperativno kod pacijenata sa "sistemski inflamatornim odgovorom" tj. SIRS (B) i sepsom (C).



Tabela XIII Klinička evaluacija prokalcitonina po danima od prijema kod zdravih osoba (A1), bolesnika sa dijagnozom SIRS (B1) i sa potvrđenom sepsom (C1)

Dan	Grupa	Statistički parametri – prokalcitonin (ng/mL)				
		N	$\bar{x}$	Sd	Min	Max
prijem	A1	90	0,21	0,14	0,02	0,97
	B1	40	0,45* <sup>A1</sup>	2,62	0,11	2,75
	C1	58	2,32* <sup>A1/*B1</sup>	7,41	0,10	11,30
I	B1	40	4,84* <sup>0/*A1</sup>	8,80	0,10	33,60
	C1	58	18,48* <sup>0/*A1/*B1</sup>	52,63	0,30	389,60
II	B1	40	3,68* <sup>0/*A1</sup>	7,23	0,09	27,33
	C1	58	14,42* <sup>0/*A1/*B1</sup>	36,61	0,30	252,60
III	B1	40	2,15* <sup>0/*A1</sup>	4,37	0,08	16,72
	C1	58	7,74* <sup>0/*1/*2/*A1/*B1</sup>	21,68	0,30	143,10
IV	B1	40	0,72* <sup>1/*2/*A1</sup>	0,55	0,12	2,09
	C1	58	4,95* <sup>0/*1/*2/*A1/*B1</sup>	14,89	0,20	96,90
V	B1	40	0,60* <sup>1/*2/*A1</sup>	0,42	0,20	1,79
	C1	58	2,39* <sup>0/*1/*2/*3/*A1</sup>	5,81	0,20	28,70

\*<sup>0</sup> statistički značajna razlika (p<0,05) u odnosu na dan prijema u okviru grupe

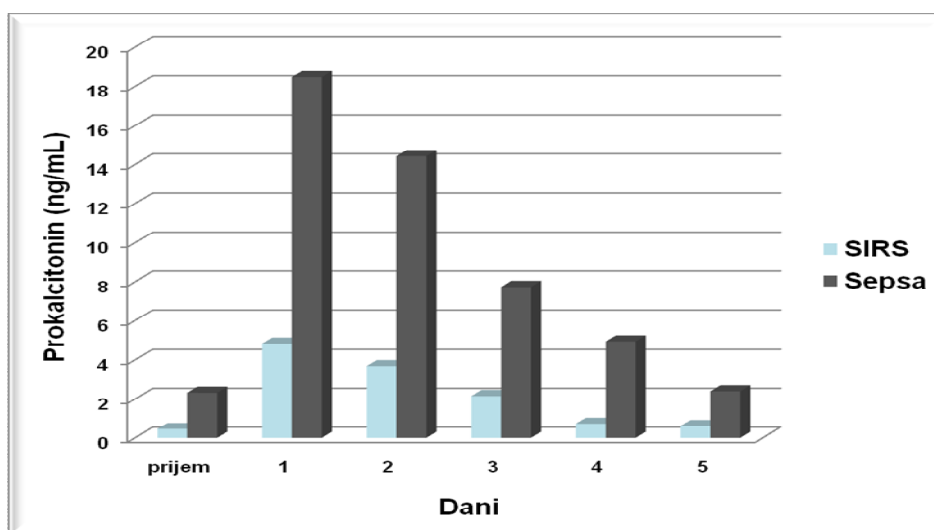
\*<sup>1</sup> statistički značajna razlika (p<0,05) u odnosu na prvi dan u okviru grupe

\*<sup>2</sup> statistički značajna razlika (p<0,05) u odnosu na drugi dan u okviru grupe

\*<sup>3</sup> statistički značajna razlika (p<0,05) u odnosu na treći dan u okviru grupe

\*<sup>A1</sup> statistički značajna razlika (p<0,05) u odnosu na grupu A1

\*<sup>B1</sup> statistički značajna razlika (p<0,05) u odnosu na grupu B1



Slika 11. Srednje vrednosti koncentracija prokalcitonina po danima nakon prijema u grupi pacijenata sa SIRS (B1) i sepsom (C1)

Tabela XIV Klinička evaluacija CRP po danima od prijema kod zdravih osoba (A1), bolesnika sa dijagnozom SIRS (B1) i sa potvrđenom sepsom (C1)

Dan	Grupa	Statistički parametri – CRP (mg/L)				
		N	$\bar{x}$	Sd	Min	Max
prijem	A1	90	3,98	2,03	0,6	11,2
	B1	40	143,50* <sup>A1</sup>	121,20	10,0	375,5
	C1	58	153,50* <sup>A1</sup>	123,4	0,6	519,4
I	B1	40	186,08* <sup>0/*A1</sup>	103,29	20,0	426,5
	C1	58	217,00* <sup>0/*A1</sup>	82,20	37,2	432,1
II	B1	40	205,85* <sup>0/*A1</sup>	67,67	105,8	371,6
	C1	58	224,65* <sup>0/*A1</sup>	75,06	68,9	396,2
III	B1	40	157,9* <sup>2/*A1</sup>	68,83	71,1	277,0
	C1	58	182,74* <sup>0/*1/*2/*A1</sup>	66,72	39,37	352,0
IV	B1	40	110,0* <sup>1/*2/*3/*A1</sup>	56,78	34,8	195,2
	C1	58	133,31* <sup>1/*2/*3/*A1</sup>	60,17	20,6	302,0
V	B1	40	86,89* <sup>1/*2/*3/*A1</sup>	53,48	20,5	186,0
	C1	58	102,55* <sup>0/*1/*2/*3/*4/*A1</sup>	45,63	9,0	201,5

\*<sup>0</sup> statistički značajna razlika (p<0,05) u odnosu na dan prijema u okviru grupe

\*<sup>1</sup> statistički značajna razlika (p<0,05) u odnosu na prvi dan u okviru grupe

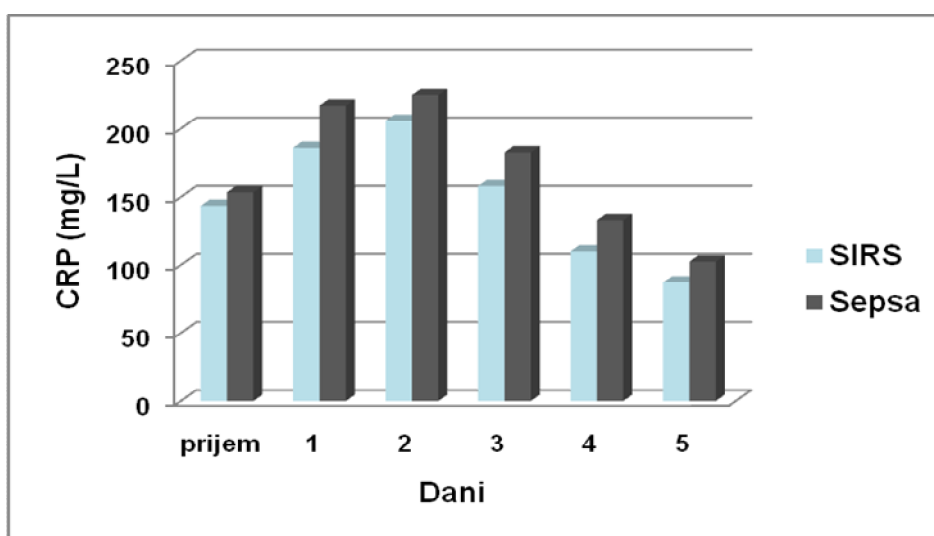
\*<sup>2</sup> statistički značajna razlika (p<0,05) u odnosu na drugi dan u okviru grupe

\*<sup>3</sup> statistički značajna razlika (p<0,05) u odnosu na treći dan u okviru grupe

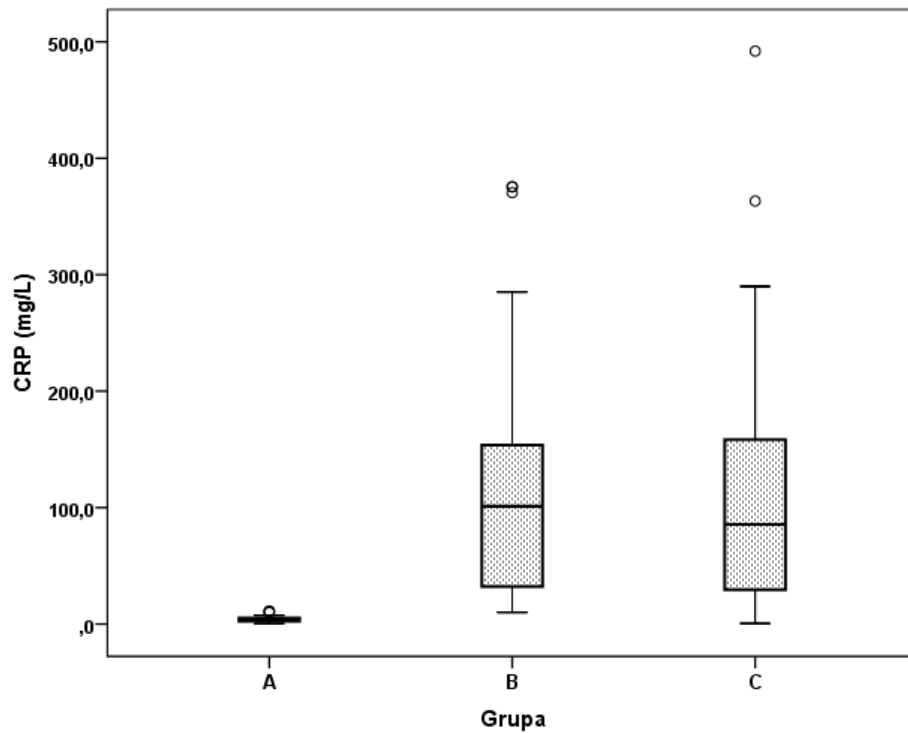
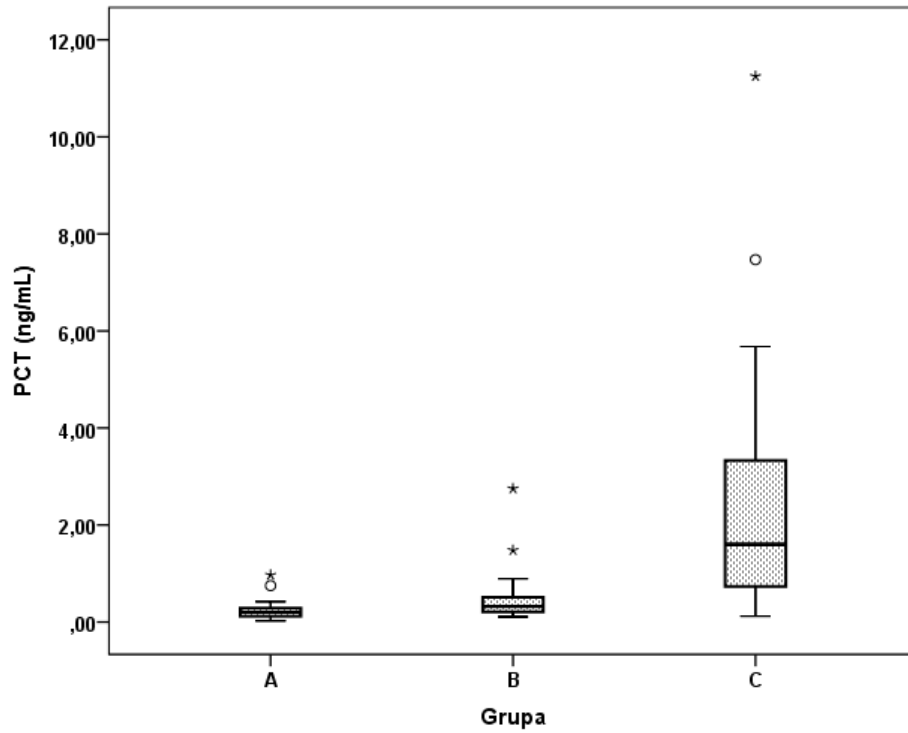
\*<sup>4</sup> statistički značajna razlika (p<0,05) u odnosu na četvrti dan u okviru grupe

\*<sup>A1</sup> statistički značajna razlika (p<0,05) u odnosu na grupu A1

\*<sup>B1</sup> statistički značajna razlika (p<0,05) u odnosu na grupu B1



Slika 12. Srednje vrednosti koncentracija CRP po danima nakon prijema u grupi pacijenata sa SIRS (B1) i sepsom (C1)



Slika 13. Koncentracije prokalcitonina i CRP kod zdravih osoba (A), i preoperativno kod pacijenata sa SIRS (B) i sepsom (C) u prvoj studiji; podaci su prikazani kao *box-plots* grafici

Parametri hemostaze, antitrombin III (AT III), protein C (PC), plazminogen (PLG) i D-dimer menjaju vrednost svojih aktivnosti u stanju inflamacije. Rezultati određivanja parametara hemostaze kod zdravih osoba (A), pacijenata sa "sistemski inflamatornim odgovorom" tj. SIRS (B) i sepsom (C), preoperativno i postoperativno, prikazani su u Tabelama XV – XVIII i na Slikama 14–19.

U grupi pacijenata sa "sistemski inflamatornim odgovorom" tj. SIRS (B) vrednosti antitrombina III, proteina C, plazminogena i D-dimera se tokom prvih pet dana postoperativnog lečenja statistički značajno razlikuju od grupe zdravih osoba. Isti rezultati su dobijeni i kod pacijenata sa potvrđenom sepsom, gde su evidentne i statistički značajno niže vrednosti antitrombina III i proteina C ne samo u odnosu na zdrave osobe, već i na pacijente sa "sistemski inflamatornim odgovorom" tj. SIRS. Unutar grupe pacijenata sa potvrđenom sepsom statistički značajne razlike su zabeležene u odnosu na preoperativne vrednosti ili postoperativno prvog dana lečenja.

Vrednosti izabranih hematoloških parametara, koncentracije hemoglobina, leukocita i trombocita, su bile izmenjene kod ispitivanih osoba u stanju inflamacije. Vrednosti hemoglobina se tokom infekcije snižavaju (Tabela XIX). Svi bolesnici iz grupe B1 (SIRS) i grupe C1 (sepsa) imali su statistički niže vrednosti u odnosu na zdrave osobe, i preoperativno i postoperativno. Najniže vrednosti kod bolesnika izmerene su drugog postoperativnog dana. Pored toga evidentna je i statistički značajna razlika vrednosti unutar grupe pacijenata sa SIRS (B1) tj. grupe pacijenata sa sepsom (C1), postoperativno u danima lečenja u odnosu na preoperativne vrednosti. Kod obe grupa pacijenata, i sa sepsom i sa "sistemski inflamatornim odgovorom" tj. SIRS, izračunate su statistički značajno više vrednosti koncentracija leukocita preoperativno (na dan prijema) kao i u danima postoperativnog lečenja u odnosu na zdrave osobe, a trećeg dana i u odnosu na grupu B1 (SIRS) (Tabela XX). Koncentracija trombocita kod ispitivanih bolesnika opada do drugog dana, kada su izmerene minimalne vrednosti, a od trećeg dana zapažamo porast vrednosti (Tabela XXI).

Vrednosti hematoloških parametara, koncentracije hemoglobina, leukocita i trombocita kod zdravih osoba (A), pacijenata sa "sistemski inflamatornim odgovorom" tj. SIRS(B) i sepsom (C), preoperativno i postoperativno, prikazani su u Tabelama XIX –XXI i na Slikama 20–23.

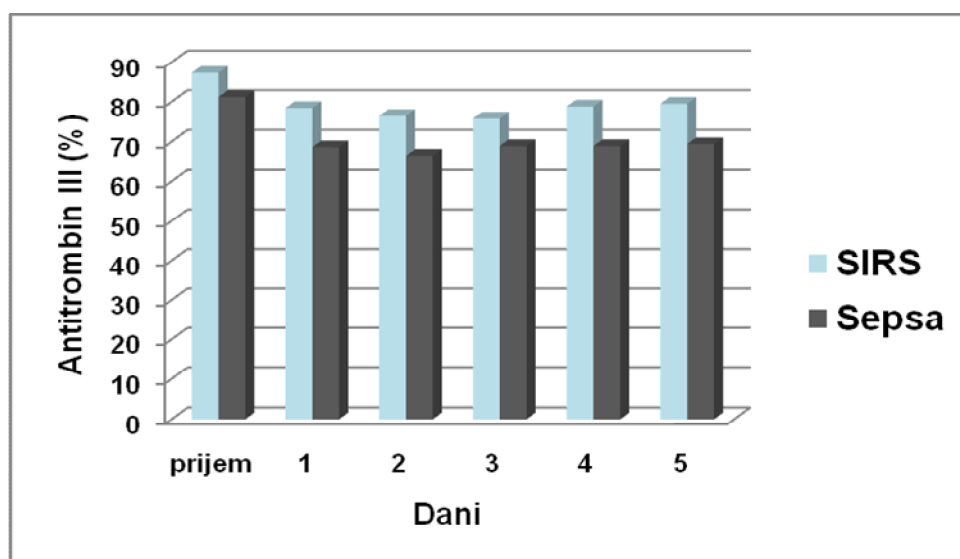
Tabela XV Klinička evaluacija antitrombina III po danima od prijema kod zdravih osoba (A1), bolesnika sa dijagnozom SIRS (B1) i sa potvrđenom sepsom (C1)

Dan	Grupa	Statistički parametri – antitrombin III (% aktivnosti)				
		N	$\bar{x}$	Sd	Min	Max
prijem	A1	90	100,3	10,89	80	120
	B1	40	87,3* <sup>A1</sup>	19,5	47	125
	C1	58	81,2* <sup>A1</sup>	20,8	39	118
I	B1	40	78,4* <sup>A1</sup>	18,65	27	126
	C1	58	68,6* <sup>0/A1/B1</sup>	15,38	35	98
II	B1	40	76,4* <sup>0/A1</sup>	15,87	51	126
	C1	58	66,46* <sup>0/A1/B1</sup>	15,77	31	102
III	B1	40	75,7* <sup>0/A1</sup>	16,38	49	119
	C1	58	68,9* <sup>0/A1/B1</sup>	16,87	32	98
IV	B1	40	78,8* <sup>A1</sup>	16,09	45	110
	C1	58	68,9* <sup>0/A1/B1</sup>	17,06	38	104
V	B1	40	79,5* <sup>A1</sup>	18,71	48	111
	C1	58	69,4* <sup>0/A1/B1</sup>	13,99	44	100

\*<sup>0</sup> statistički značajna razlika ( $p < 0,05$ ) u odnosu na dan prijema u okviru grupe

\*<sup>A1</sup> statistički značajna razlika ( $p < 0,05$ ) u odnosu na grupu A1

\*<sup>B1</sup> statistički značajna razlika ( $p < 0,05$ ) u odnosu na grupu B1



Slika 14. Srednje vrednosti aktivnosti antitrombina III po danima nakon prijema u grupi pacijenata sa SIRS (B1) i sepsom (C1)

Tabela XVI Klinička evaluacija proteina C po danima od prijema kod zdravih osoba (A1), bolesnika sa dijagnozom SIRS (B1) i sa potvrđenom sepsom (C1)

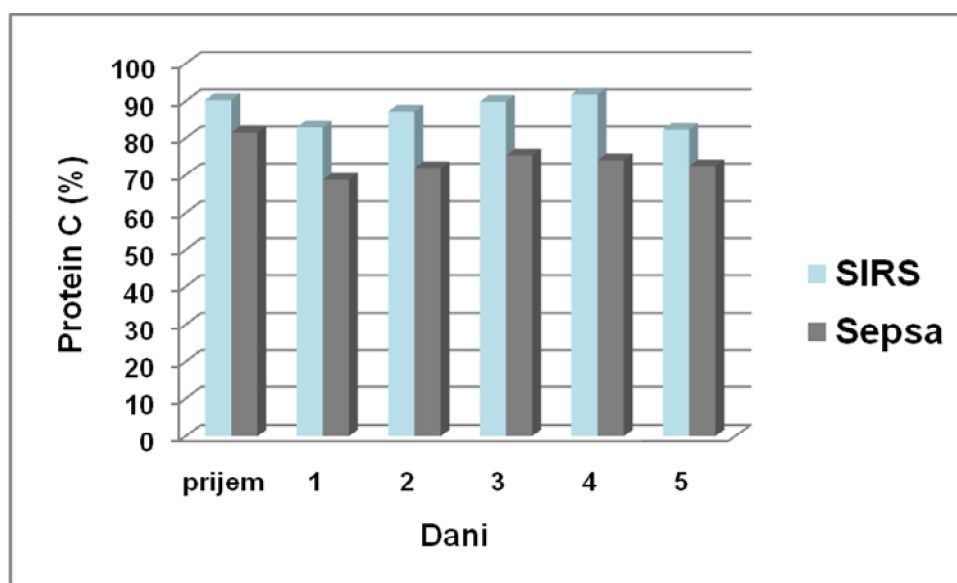
Dan	Grupa	Statistički parametri – protein C (% aktivnosti)				
		N	$\bar{x}$	Sd	Min	Max
prijem	A1	90	105,0	13,21	75	134
	B1	40	90,3* <sup>A1</sup>	26,6	32	150
	C1	58	81,5* <sup>A1</sup> / <sup>B1</sup>	26,2	39	173
I	B1	40	82,9* <sup>A1</sup>	27,38	13	128
	C1	58	68,8* <sup>0</sup> / <sup>A1</sup> / <sup>B1</sup>	21,57	32	120
II	B1	40	87,3* <sup>A1</sup>	25,08	33	134
	C1	58	72,0* <sup>A1</sup> / <sup>B1</sup>	21,37	21	125
III	B1	40	89,9* <sup>A1</sup>	25,29	40	130
	C1	58	75,4* <sup>A1</sup> / <sup>B1</sup>	22,83	21	127
IV	B1	40	91,8* <sup>A1</sup>	23,77	34	129
	C1	58	74,1* <sup>A1</sup> / <sup>B1</sup>	20,02	22	115
V	B1	40	82,3* <sup>4</sup> / <sup>A1</sup>	20,60	34	104
	C1	58	72,5* <sup>A1</sup> / <sup>B1</sup>	18,34	38	120

\*<sup>0</sup> statistički značajna razlika ( $p < 0,05$ ) u odnosu na dan prijema u okviru grupe

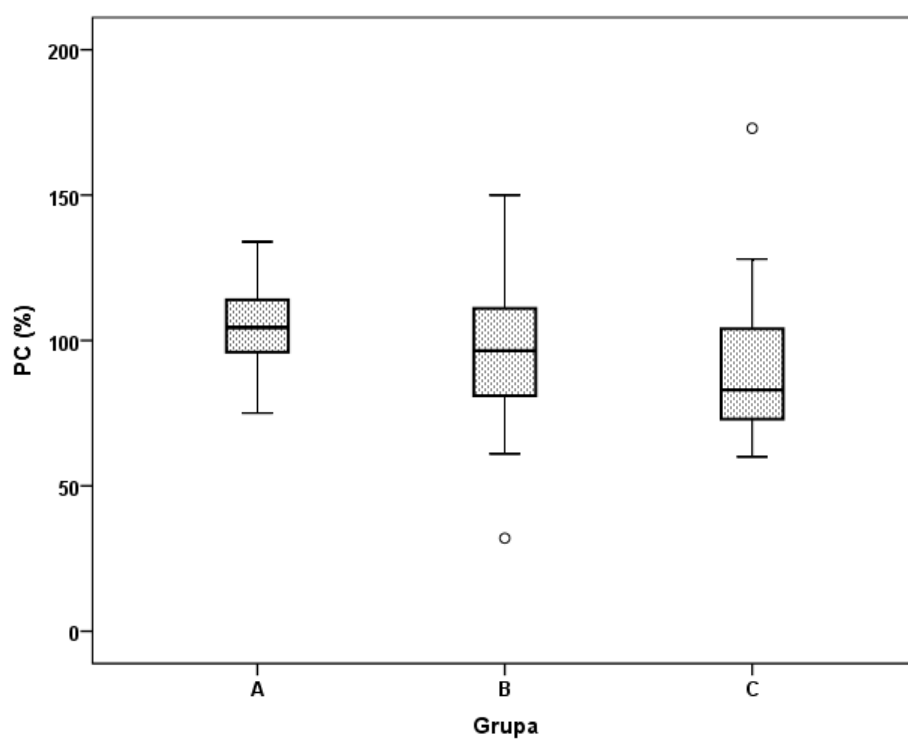
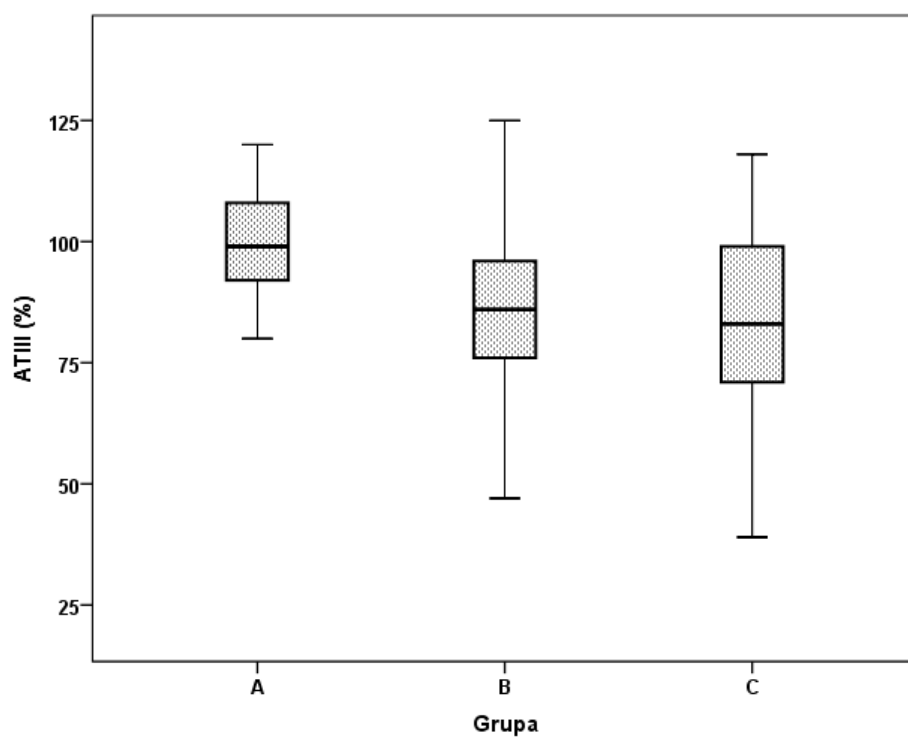
\*<sup>4</sup> statistički značajna razlika ( $p < 0,05$ ) u odnosu na četvrti dan u okviru grupe

\*<sup>A1</sup> statistički značajna razlika ( $p < 0,05$ ) u odnosu na grupu A1

\*<sup>B1</sup> statistički značajna razlika ( $p < 0,05$ ) u odnosu na grupu B1



Slika 15. Srednje vrednosti aktivnosti proteina C po danima nakon prijema u grupi pacijenata sa SIRS (B1) i sepsom (C1)



Slika 16. Aktivnosti antitrombina III (AT III) i proteina C (PC) kod zdravih osoba (A), i preoperativno kod pacijenata sa SIRS(B) i sepsom (C) u prvoj studiji; podaci su prikazani kao *box-plots* grafici

Tabela XVII Klinička evaluacija plazminogena po danima od prijema kod zdravih osoba (A1), bolesnika sa dijagnozom SIRS (B1) i sa potvrđenom sepsom (C1)

Dan	Grupa	Statistički parametri – plazminogen (% aktivnosti)				
		N	$\bar{x}$	Sd	Min	Max
prijem	A1	90	104,5	14,54	75	134
	B1	40	92,9* <sup>A1</sup>	22,1	49	138
	C1	58	88,6* <sup>A1</sup>	21,5	48	140
I	B1	40	82,6* <sup>A1</sup>	21,90	32	139
	C1	58	75,7* <sup>0/A1</sup>	16,99	39	116
II	B1	40	83,8* <sup>A1</sup>	18,77	51	132
	C1	58	78,1* <sup>0/A1</sup>	22,50	46	158
III	B1	40	93,1* <sup>1/A1</sup>	23,36	50	151
	C1	58	83,2* <sup>1/A1</sup>	17,24	50	112
IV	B1	40	96,2* <sup>1/2</sup>	23,07	57	135
	C1	58	85,4* <sup>1/2/A1/B1</sup>	18,29	53	120
V	B1	40	101,7* <sup>1/2</sup>	22,83	66	145
	C1	58	83,7* <sup>A1/B1</sup>	20,07	54	130

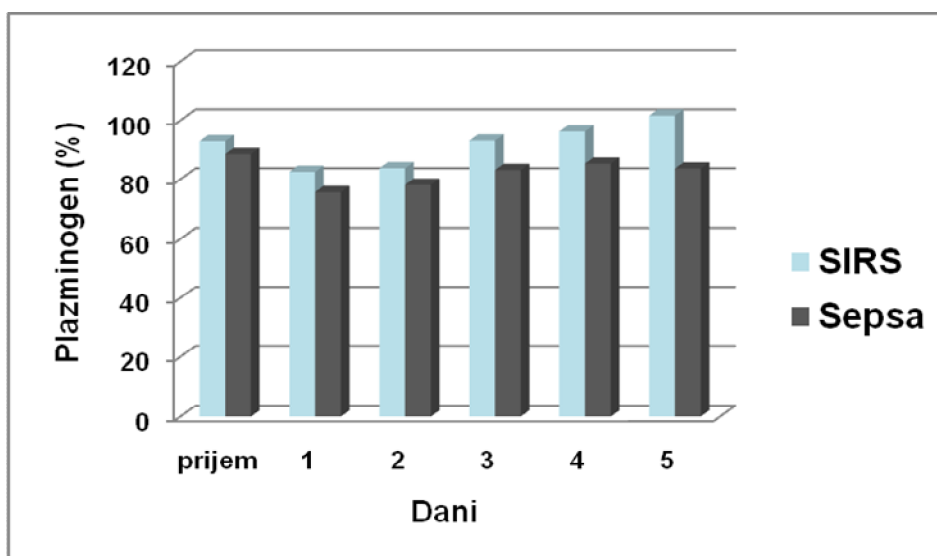
\*<sup>0</sup> statistički značajna razlika ( $p < 0,05$ ) u odnosu na dan prijema u okviru grupe

\*<sup>1</sup> statistički značajna razlika ( $p < 0,05$ ) u odnosu na prvi dan u okviru grupe

\*<sup>2</sup> statistički značajna razlika ( $p < 0,05$ ) u odnosu na drugi dan u okviru grupe

\*<sup>A1</sup> statistički značajna razlika ( $p < 0,05$ ) u odnosu na grupu A1

\*<sup>B1</sup> statistički značajna razlika ( $p < 0,05$ ) u odnosu na grupu B1



Slika 17. Srednje vrednosti aktivnosti plazminogena po danima nakon prijema u grupi pacijenata sa SIRS (B1) i sepsom (C1)



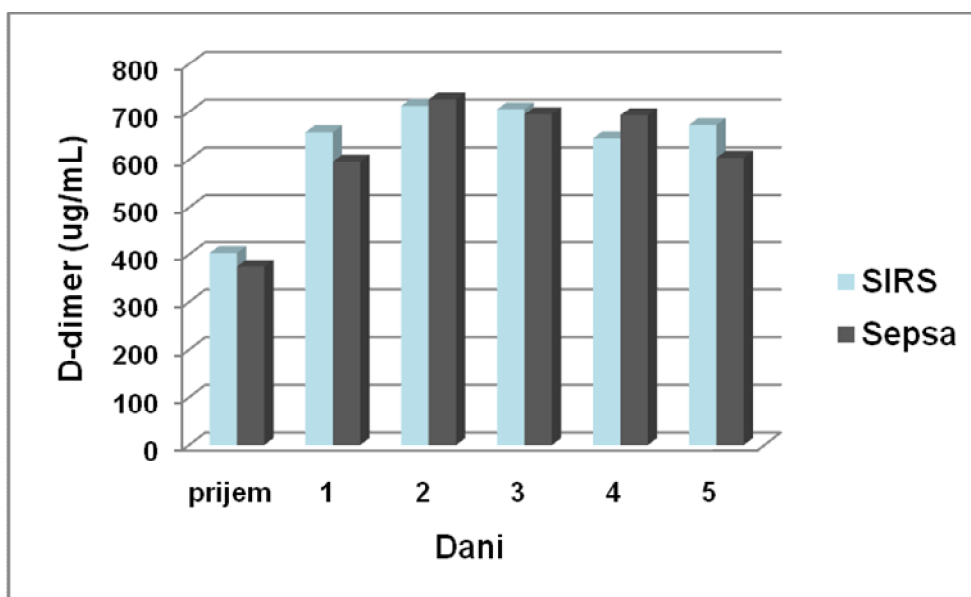
Tabela XVIII Klinička evaluacija D-dimera po danima od prijema kod zdravih osoba (A1), bolesnika sa dijagnozom SIRS (B1) i sa potvrđenom sepsom (C1);

Dan	Grupa	Statistički parametri – D-dimer (µg/L)				
		N	$\bar{x}$	Sd	Min	Max
prijem	A1	90	139,87	51,025	12	261
	B1	40	403,0* <sup>0</sup> * <sup>A1</sup>	366,2	15	855
	C1	58	373,0* <sup>0</sup> * <sup>A1</sup>	399,2	25	835
I	B1	40	657,9* <sup>0</sup> * <sup>A1</sup>	438,66	12	1744
	C1	58	595,9* <sup>0</sup> * <sup>A1</sup>	421,58	22	2291
II	B1	40	713,1* <sup>0</sup> * <sup>A1</sup>	404,35	12	1551
	C1	58	726,4* <sup>0</sup> * <sup>A1</sup>	475,94	175	1966
III	B1	40	705,7* <sup>0</sup> * <sup>A1</sup>	478,28	20	1596
	C1	58	695,0* <sup>0</sup> * <sup>A1</sup>	489,12	224	1874
IV	B1	40	644,4* <sup>0</sup> * <sup>A1</sup>	354,16	20	1316
	C1	58	693,2* <sup>0</sup> * <sup>A1</sup>	498,50	170	2335
V	B1	40	672,0* <sup>0</sup> * <sup>A1</sup>	296,29	15	1137
	C1	58	603,9* <sup>0</sup> * <sup>A1</sup>	502,16	181	2268

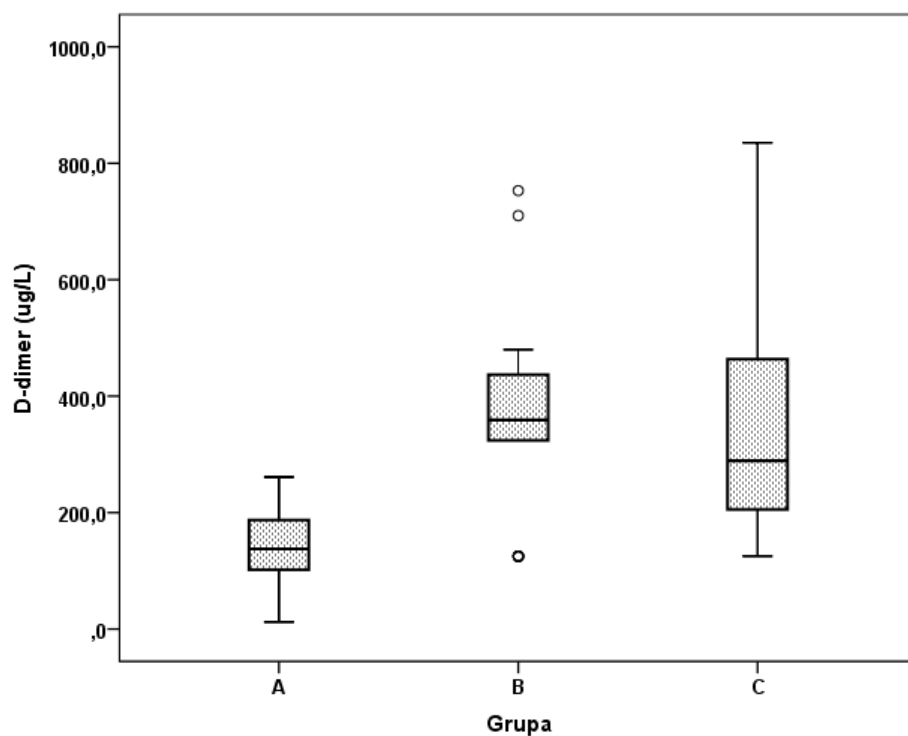
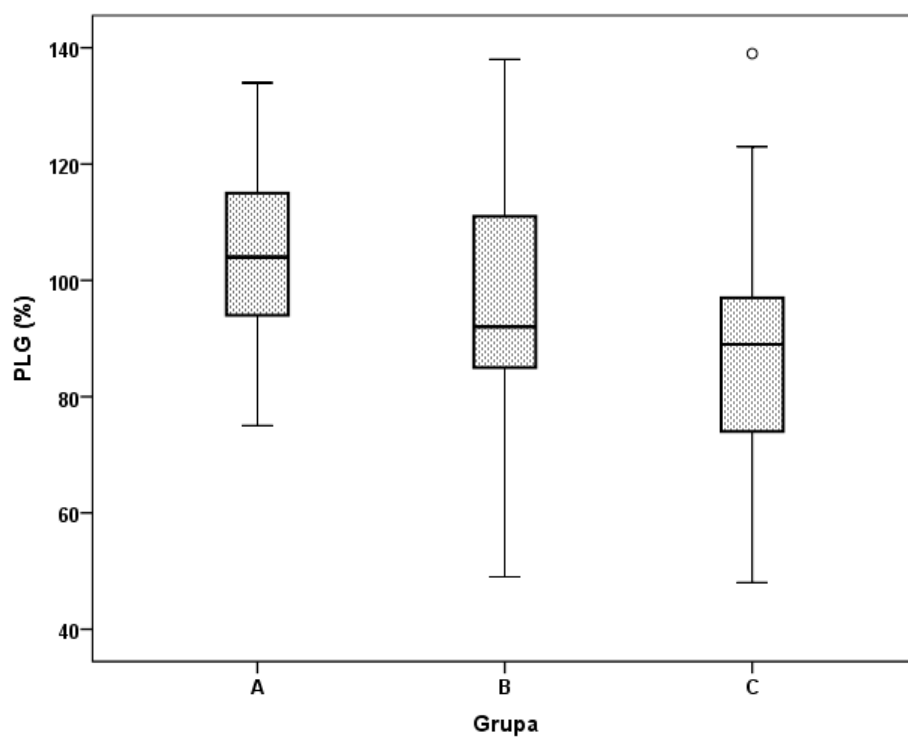
\*<sup>0</sup> statistički značajna razlika ( $p < 0,05$ ) u odnosu na dan prijema u okviru grupe

\*<sup>1</sup> statistički značajna razlika ( $p < 0,05$ ) u odnosu na prvi dan u okviru grupe

\*<sup>A1</sup> statistički značajna razlika ( $p < 0,05$ ) u odnosu na grupu A1



Slika 18. Srednje vrednosti koncentracija D-dimera po danima nakon prijema u grupi pacijenata sa SIRS (B1) i sepsom (C1)



Slika 19. Vrednosti plazminogena (PLG) i D-dimera kod zdravih osoba (A), i preoperativno kod pacijenata sa SIRS (B) i sepsom (C) u prvoj studiji; podaci su prikazani kao *box-plots* grafici

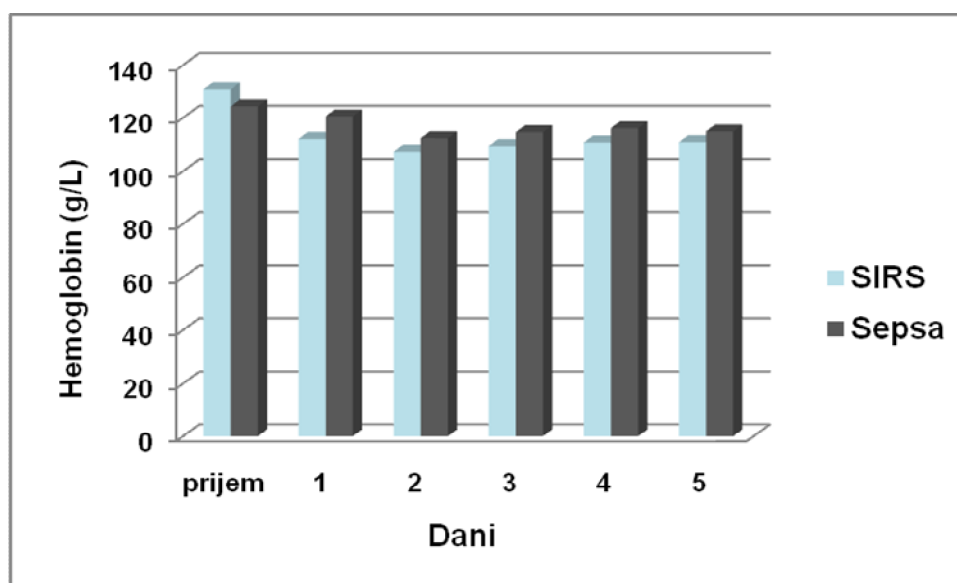
Tabela XIX Klinička evaluacija hemoglobina po danima od prijema kod zdravih osoba (A1), bolesnika sa dijagnozom SIRS (B1) i sa potvrđenom sepsom (C1)

Dan	Grupa	Statistički parametri – hemoglobin (g/L)				
		N	$\bar{x}$	Sd	Min	Max
prijem	A1	90	144,26	8,031	122	160
	B1	40	130,8* <sup>A1</sup>	17,6	90	172
	C1	58	124,4* <sup>A1</sup>	28,15	54	169
I	B1	40	112,0* <sup>0</sup> * <sup>A1</sup>	21,36	74	164
	C1	58	120,6* <sup>A1</sup>	23,75	63	156
II	B1	40	107,3* <sup>0</sup> * <sup>A1</sup>	20,03	72	154
	C1	58	112,3* <sup>0</sup> * <sup>1</sup> * <sup>A1</sup>	18,22	81	151
III	B1	40	109,34* <sup>0</sup> * <sup>A1</sup>	17,56	78	153
	C1	58	114,5* <sup>0</sup> * <sup>A1</sup>	15,78	82	141
IV	B1	40	110,71* <sup>0</sup> * <sup>A1</sup>	18,48	85	144
	C1	58	116,0* <sup>A1</sup>	17,44	79	149
V	B1	40	110,78* <sup>0</sup> * <sup>A1</sup>	19,02	91	149
	C1	58	114,8* <sup>A1</sup>	15,91	91	154

\*<sup>0</sup> statistički značajna razlika ( $p < 0,05$ ) u odnosu na dan prijema u okviru grupe

\*<sup>1</sup> statistički značajna razlika ( $p < 0,05$ ) u odnosu na prvi dan u okviru grupe

\*<sup>A1</sup> statistički značajna razlika ( $p < 0,05$ ) u odnosu na grupu A1



Slika 20. Srednje vrednosti koncentracija hemoglobina (HGB) po danima nakon prijema u grupi pacijenata sa SIRS (B1) i sepsom (C1)

Tabela XX Klinička evaluacija leukocita po danima od prijema kod zdravih osoba (A1), bolesnika sa dijagnozom SIRS (B1) i sa potvrđenom sepsom (C1)

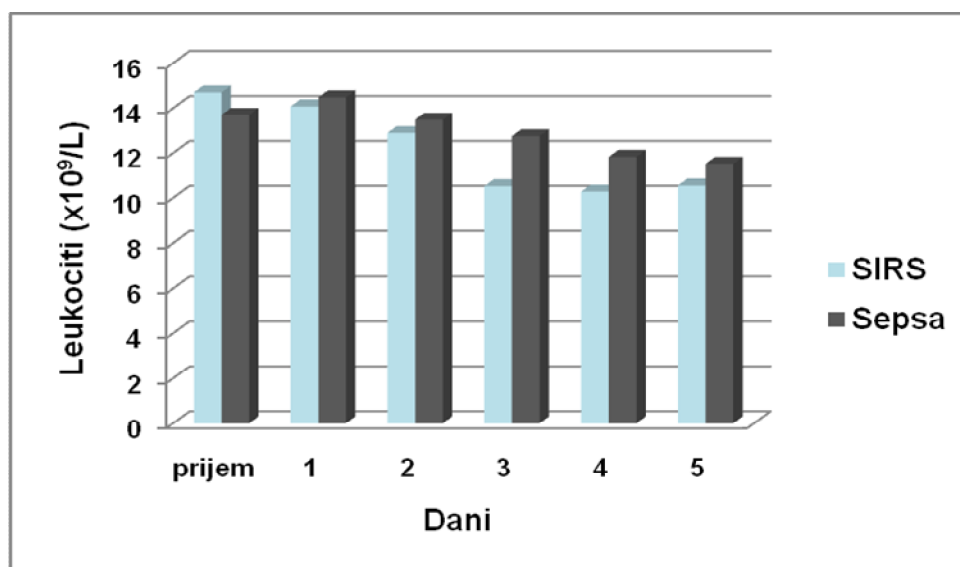
Dan	Grupa	Statistički parametri – leukociti ( $\times 10^9/L$ )				
		N	$\bar{x}$	Sd	Min	Max
prijem	A1	90	7,778	2,581	3,8	15,1
	B1	40	14,7* <sup>A1</sup>	7,2	6,2	28,9
	C1	58	13,7* <sup>A1</sup>	7,7	2,0	31,3
I	B1	40	14,08* <sup>A1</sup>	7,98	5,1	30,8
	C1	58	14,48* <sup>A1</sup>	8,14	2,2	40,1
II	B1	40	12,89* <sup>A1</sup>	7,93	5,5	37,2
	C1	58	13,48* <sup>A1</sup>	6,75	2,7	33,3
III	B1	40	10,52* <sup>0/1/A1</sup>	5,81	5,9	31,3
	C1	58	12,75* <sup>A1/B1</sup>	7,41	4,0	42,9
IV	B1	40	10,28* <sup>0/1/A1</sup>	5,05	4,6	22,5
	C1	58	11,83* <sup>1/A1</sup>	7,19	2,0	37,9
V	B1	40	10,55* <sup>0/A1</sup>	4,98	4,5	20,8
	C1	58	11,52* <sup>1/A1</sup>	5,49	3,8	28,5

\*<sup>0</sup> statistički značajna razlika ( $p < 0,05$ ) u odnosu na dan prijema u okviru grupe

\*<sup>1</sup> statistički značajna razlika ( $p < 0,05$ ) u odnosu na prvi dan u okviru grupe

\*<sup>A1</sup> statistički značajna razlika ( $p < 0,05$ ) u odnosu na grupu A1

\*<sup>B1</sup> statistički značajna razlika ( $p < 0,05$ ) u odnosu na grupu B1



Slika 21. Srednje vrednosti koncentracija leukocita po danima nakon prijema u grupi pacijenata sa SIRS (B1) i sepsom (C1)

Tabela XXI Klinička evaluacija trombocita po danima od prijema kod zdravih osoba (A1), bolesnika sa dijagnozom SIRS (B1) i sa potvrđenom sepsom (C1)

Dan	Grupa	Statistički parametri – trombociti ( $\times 10^9/L$ )				
		N	$\bar{x}$	Sd	Min	Max
prijem	A1	90	284,1	65,512	158	412
	B1	40	277,5* <sup>A1</sup>	126,6	118	625
	C1	58	297,4	128,6	68	643
I	B1	40	228,68* <sup>A1</sup>	102,916	95	519
	C1	58	262,3* <sup>A1</sup>	100,65	42	524
II	B1	40	223,00* <sup>A1</sup>	92,323	104	484
	C1	58	249,2* <sup>0/A1</sup>	11,14	29	532
III	B1	40	237,37* <sup>A1</sup>	103,19	48	480
	C1	58	262,2	107,88	28	508
IV	B1	40	301,13* <sup>1/*2/*3</sup>	88,195	145	512
	C1	58	264,52	100,45	21	482
V	B1	40	328,2* <sup>0/*1/*2/*3</sup>	108,19	149	528
	C1	58	282,53	107,41	67	519

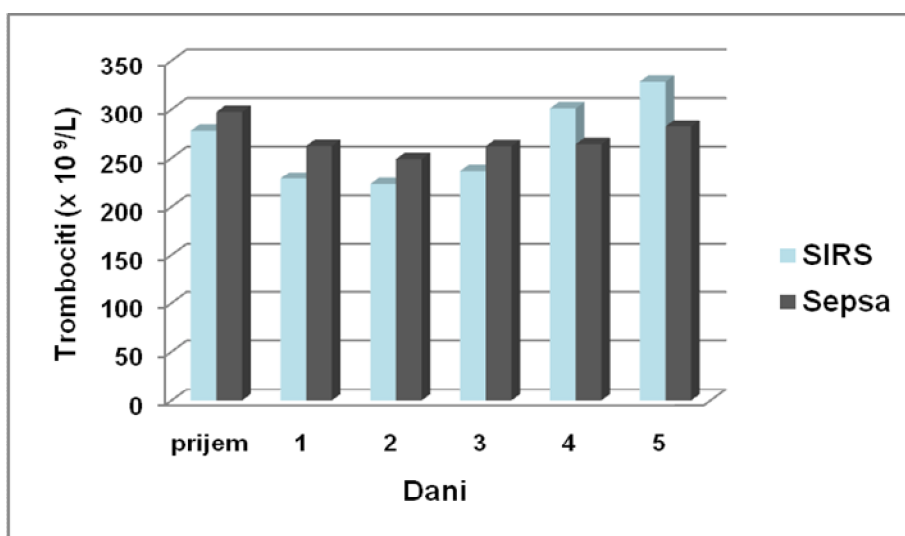
\*<sup>0</sup> statistički značajna razlika ( $p < 0,05$ ) u odnosu na dan prijema u okviru grupe

\*<sup>1</sup> statistički značajna razlika ( $p < 0,05$ ) u odnosu na prvi dan u okviru grupe

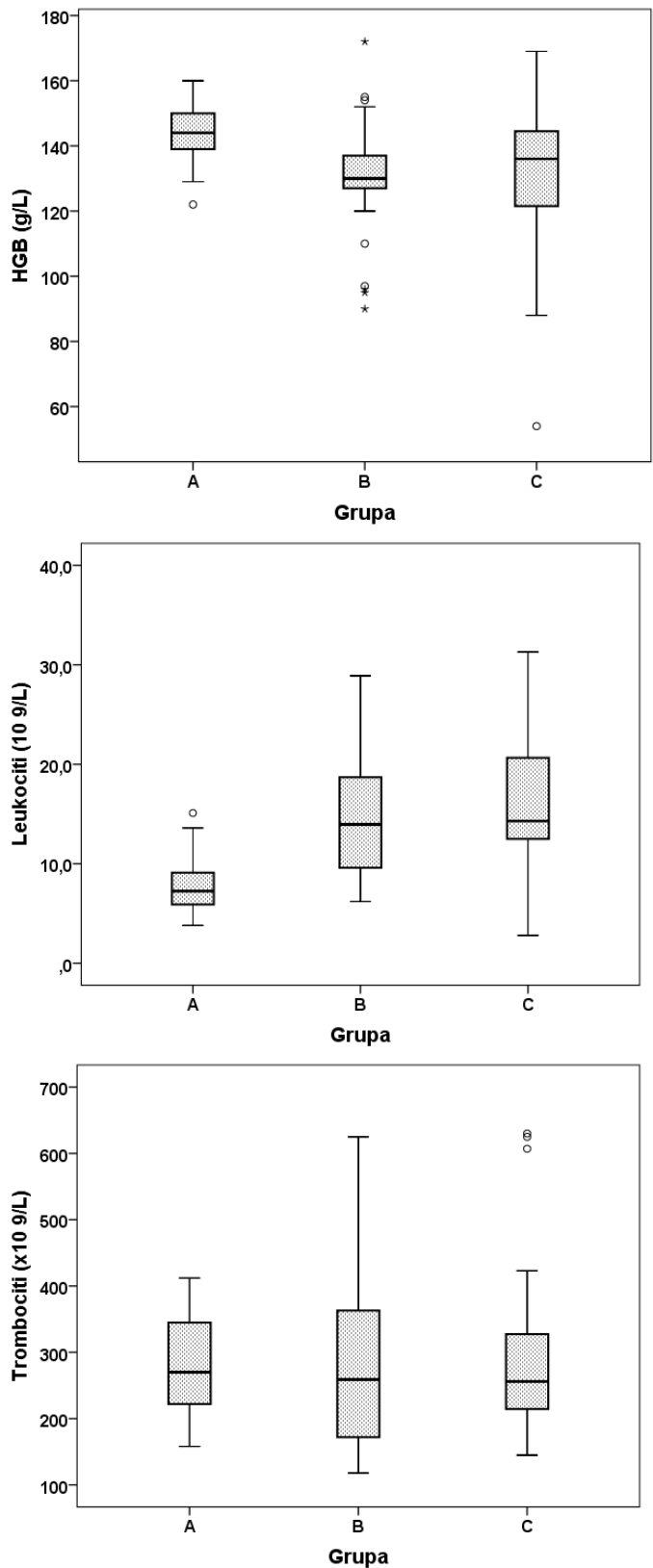
\*<sup>2</sup> statistički značajna razlika ( $p < 0,05$ ) u odnosu na drugi dan u okviru grupe

\*<sup>3</sup> statistički značajna razlika ( $p < 0,05$ ) u odnosu na treći dan u okviru grupe

\*<sup>A1</sup> statistički značajna razlika ( $p < 0,05$ ) u odnosu na grupu A1



Slika 22. Srednje vrednosti koncentracija trombocita po danima nakon prijema u grupi pacijenata sa SIRS (B1) i sepsom (C1)



Slika 23. Koncentracije hemoglobina (HGB), leukocita i trombocita (PLT) kod zdravih osoba (A) i preoperativno kod pacijenata sa SIRS (B) i sepsom (C) u prvoj studiji; podaci su prikazani kao *box-plots* grafici

#### 4.2.2. Korelacija određivanih parametara u prvoj studiji

Da bi se ustanovila povezanost nivoa parametara sepse odnosno da li postoji korelacija između vrednosti određivanih parametara u stanju inflamacije određen je Spearmanov koeficijent korelacije neparametarskim testom, primenom Spearmanove korelacije, s obzirom na to da dobijeni podaci nisu imali normalnu raspodelu. Spearman-ovi koeficijenti korelacije izračunati su primenom kompjuterskog programa SPSS vers.20. Vrednosti korelacionih koeficijenata i korelacija parametara, preoperativno i postoperativno, kod pacijenata sa sepsom i sistemski inflamatornim odgovorom prikazane su u Tabelama XXII – XXIX. Rezultati pokazuju da su vrednosti određivanih parametara međusobno u značajnoj korelaciji koja može biti pozitivna ili negativna.

U slučaju preoperativnih vrednosti, rezultati korelacije pokazuju da postoji, ne tako veliko, ali značajno slaganje između većine određivanih parametara. Dobra povezanost nivoa biomarkera sepse evidentna je i u danima postoperativnog lečenja. Iz dana u dan postoperativno, korelacija između vrednosti parametara je sve obimnija i značajnija.

Tabela XXII Korelacija određivanih parametara kod pacijenata sa sepsom (C1) zbirno

Parametar	PCT	CRP	Protein C	WBC	DD	PLG	AT III	HGB	PLT
PCT	1,000	,420**	-,411**	-,018	,049	-,342**	-,424**	-,223**	-,318**
CRP	,420**	1,000	-,180**	-,019	,239**	-,143**	-,271**	-,032	-,203**
Protein C	-,411**	-,180**	1,000	,190**	-,095	,479**	,565**	,262**	,050
WBC	-,018	-,019	,190**	1,000	-,083	,026	,152**	-,028	,182**
DD	,049	,239**	-,095	-,083	1,000	-,022	-,181**	-,176**	,175**
PLG	-,342**	-,143**	,479**	,026	-,022	1,000	,612**	,200**	,113*
AT III	-,424**	-,271**	,565**	,152**	-,181**	,612**	1,000	,410**	,150**
HGB	-,223**	-,032	,262**	-,028	-,176**	,200**	,410**	1,000	-,170**
PLT	-,318**	-,203**	,050	,182**	,175**	,113*	,150**	-,170**	1,000

\*\*  $p < 0,01$ , postoji korelacija između parametara

Tabela XXIII Korelacija parametara kod pacijenata sa sepsom (C1) na dan prijema

Parametar	HGB 0	PLT 0	WBC 0	PCT 0	CRP 0	DD 0	PLG 0	ATIII 0	PC 0
HGB 0	1,000	-,205	,138	-,058	-,285*	-,107	,293*	,540**	,365**
PLT 0	-,205	1,000	,352**	,071	,138	,137	,015	-,004	-,153
WBC 0	,138	,352**	1,000	-,339*	-,177	-,466**	,257	,436**	,381**
PCT 0	-,058	,071	-,339*	1,000	,132	,249	-,052	-,195	-,078
CRP 0	-,285*	,138	-,177	,132	1,000	,384*	,043	-,203	-,325*
DD 0	-,107	,137	-,466**	,249	,384*	1,000	-,125	-,227	-,328*
PLG 0	,293*	,015	,257	-,052	,043	-,125	1,000	,637**	,538**
ATIII 0	,540**	-,004	,436**	-,195	-,203	-,227	,637**	1,000	,664**
PC 0	,365**	-,153	,381**	-,078	-,325*	-,328*	,538**	,664**	1,000

\*\* p < 0,01, postoji korelacija između parametara

\* p < 0,05, postoji korelacija između parametara

Tabela XXIV Korelacija parametara kod pacijenata sa sepsom (C1) prvog dana

Parametar	HGB 1	PLT 1	WBC 1	PCT 1	CRP 1	DD 1	PLG 1	ATIII 1	PC 1
HGB 1	1,000	-,344**	,012	-,324*	,234	-,301*	,159	,440**	,153
PLT 1	-,344**	1,000	,328*	-,118	-,040	,352*	,038	-,042	-,091
WBC 1	,012	,328*	1,000	-,333*	-,078	-,043	,276*	,485**	,404**
PCT 1	-,324*	-,118	-,333*	1,000	,115	,246	-,215	-,484**	-,439**
CRP 1	,234	-,040	-,078	,115	1,000	,399**	,070	-,013	-,063
DD 1	-,301*	,352*	-,043	,246	,399**	1,000	,025	-,186	-,303*
PLG 1	,159	,038	,276*	-,215	,070	,025	1,000	,498**	,359**
ATIII 1	,440**	-,042	,485**	-,484**	-,013	-,186	,498**	1,000	,598**
PC 1	,153	-,091	,404**	-,439**	-,063	-,303*	,359**	,598**	1,000

\*\* p < 0,01, postoji korelacija između parametara

\* p < 0,05, postoji korelacija između parametara



Tabela XXV Korelacija parametara kod pacijenata sa sepsom (C1) drugog dana

Parametar	HGB 2	PLT	WBC 2	PCT 2	CRP 2	DD 2	PLG 2	ATIII 2	PC 2
HGB 2	1,000	-,292*	-,200	-,398**	,420**	-,379**	,092	,300*	,229
PLT 2	-,292*	1,000	,326*	-,250	-,424**	,266	,134	,160	,121
WBC 2	-,200	,326*	1,000	-,228	-,231	-,061	,246	,214	,244
PCT 2	-,398**	-,250	-,228	1,000	,032	,230	-,322*	-,601**	-,599**
CRP 2	,420**	-,424**	-,231	,032	1,000	,129	,001	-,110	-,010
DD 2	-,379**	,266	-,061	,230	,129	1,000	-,122	-,192	-,412**
PLG 2	,092	,134	,246	-,322*	,001	-,122	1,000	,650**	,561**
ATIII 2	,300*	,160	,214	-,601**	-,110	-,192	,650**	1,000	,625**
PC 2	,229	,121	,244	-,599**	-,010	-,412**	,561**	,625**	1,000

\*\* p < 0,01, postoji korelacija između parametara

\* p < 0,05, postoji korelacija između parametara

Tabela XXVI Korelacija parametara kod pacijenata sa sepsom (C1) trećeg dana

Parametar	HGB 3	PLT 3	WBC 3	PCT 3	CRP 3	DD 3	PLG 3	ATIII3	PC 3
HGB 3	1,000	-,097	-,163	-,348*	,001	-,583**	,350*	,351*	,439**
PLT 3	-,097	1,000	,188	-,388**	-,426**	,228	,048	,161	-,006
WBC 3	-,163	,188	1,000	-,007	-,047	,016	-,318*	-,252	-,002
PCT 3	-,348*	-,388**	-,007	1,000	,332*	,329*	-,522**	-,574**	-,572**
CRP 3	,001	-,426**	-,047	,332*	1,000	,114	-,112	-,310*	-,042
DD 3	-,583**	,228	,016	,329*	,114	1,000	-,321*	-,361*	-,482**
PLG 3	,350*	,048	-,318*	-,522**	-,112	-,321*	1,000	,680**	,589**
ATIII 3	,351*	,161	-,252	-,574**	-,310*	-,361*	,680**	1,000	,598**
PC 3	,439**	-,006	-,002	-,572**	-,042	-,482**	,589**	,598**	1,000

\*\* p < 0,01, postoji korelacija između parametara

\* p < 0,05, postoji korelacija između parametara

Tabela XXVII Korelacija parametara kod pacijenata sa sepsom (C1) četvrto dana

Parametar	HGB 4	PLT 4	WBC 4	PCT 4	CRP 4	DD 4	PLG 4	ATIII 4	PC 4
HGB 4	1,000	-,145	-,225	-,280*	-,232	-,458**	,347*	,365**	,372**
PLT 4	-,145	1,000	,201	-,507**	-,181	,062	,196	,266	,173
WBC 4	-,225	,201	1,000	,031	,338*	,097	-,233	-,183	-,076
PCT 4	-,280*	-,507**	,031	1,000	,393**	,380*	-,435**	-,553**	-,553**
CRP 4	-,232	-,181	,338*	,393**	1,000	,497**	-,255	-,583**	-,291*
DD 4	-,458**	,062	,097	,380*	,497**	1,000	-,249	-,514**	-,519**
PLG 4	,347*	,196	-,233	-,435**	-,255	-,249	1,000	,650**	,582**
ATIII 4	,365**	,266	-,183	-,553**	-,583**	-,514**	,650**	1,000	,578**
PC 4	,372**	,173	-,076	-,553**	-,291*	-,519**	,582**	,578**	1,000

\*\* p < 0,01, postoji korelacija između parametara

\* p < 0,05, postoji korelacija između parametara

Tabela XXVIII Korelacija parametara kod pacijenata sa sepsom (C1) petog dana

Parametar	HGB 5	PLT 5	WBC 5	PCT 5	CRP 5	DD 5	PLG 5	ATIII 5	PC 5
HGB 5	1,000	,126	-,135	-,472**	-,223	-,417**	,285*	,345*	,472**
PLT 5	,126	1,000	,278	-,634**	-,119	-,179	,240	,348*	,376**
WBC 5	-,135	,278	1,000	-,071	,432**	-,014	-,227	-,114	,192
PCT 5	-,472**	-,634**	-,071	1,000	,447**	,385*	-,280	-,628**	-,543**
CRP 5	-,223	-,119	,432**	,447**	1,000	,202	-,159	-,338*	-,138
DD 5	-,417**	-,179	-,014	,385*	,202	1,000	,024	-,422**	-,390*
PLG 5	,285*	,240	-,227	-,280	-,159	,024	1,000	,635**	,491**
ATIII 5	,345*	,348*	-,114	-,628**	-,338*	-,422**	,635**	1,000	,592**
PC 5	,472**	,376**	,192	-,543**	-,138	-,390*	,491**	,592**	1,000

\*\* p < 0,01, postoji korelacija između parametara

\* p < 0,05, postoji korelacija između parametara

Tabela XXIX Korelacija odredivanih parametara kod pacijenata sa SIRS (B1)

Parametar	HGB	PLT	PCT	WBC	DD	PLG	AT III	PC	CRP
HGB	1,000	-,231**	,018	-,358**	-,297**	,157*	,371**	,110	-,062
PLT	-,231**	1,000	-,346**	,307**	,220**	,471**	,052	,288**	-,070
PCT	,018	-,346**	1,000	,046	,400**	-,245**	-,174*	-,476**	,420**
WBC	-,358**	,307**	,046	1,000	,117	-,079	-,252**	-,248**	,155*
DD	-,297**	,220**	,400**	,117	1,000	,027	-,388**	-,238**	,292**
PLG	,157*	,471**	-,245**	-,079	,027	1,000	,475**	,399**	,077
AT III	,371**	,052	-,174*	-,252**	-,388**	,475**	1,000	,330**	-,096
PCT	,110	,288**	-,476**	-,248**	-,238**	,399**	,330**	1,000	-,126
CRP	-,062	-,070	,420**	,155*	,292**	,077	-,096	-,126	1,000

\*\* p < 0,01, postoji korelacija između parametara

\* p < 0,05, postoji korelacija između parametara

#### 4.2.3. Određivanje parametara sepse kod pacijenata sa simptomima dužim od 24 sata

Pri ispitivanju uzeto je u razmatranje i trajanje simptoma pre prijema u bolnicu. Bilo je ukupno 63 pacijenta, od ispitanih 98, koji su imali bolove u predelu stomaka više od 24 sata. Od tih 63, 41 bolesnik je razvio sepsu (S24) dok su kod preostalih 22 pacijenta zabeleženi simptomi karakteristični za SIRS (SIRS24). Vrednosti određivanih parametara kod ove dve grupe pacijenata prikazane su u Tabeli XXX.

Tabela XXX Dijagnostički značaj ispitivanih parametara kod pacijenata iz grupe SIRS (B1) i sepse (C1), koji su imali simptome duže od 24 sata; podaci su prikazani kao srednja vrednost (Sd)

Parametar	SIRS (N=22)	Sepsa (N=41)	<i>p</i> *
Prokalcitonin (ng/mL)	0,35 (0,66)	3,30 (15,10)	0,000
CRP (mg/ L)	143,4 (124,9)	166,6 (113,6)	0,185
Antitrombin III (%)	87,8 (18,7)	76,1 (18,9)	0,062
Protein C (%)	94,6 (25,6)	75,9 (23,7)	0,008
Plazminogen (%)	96,4 (23,7)	85,0 (19,8)	> 0,05
D-dimer (µg/L)	435,5 (366,2)	365,5(359,2)	> 0,05
Hemoglobin (g/L)	124,1 (16,5)	119,2(27,3)	> 0,05
Leukociti (×10 <sup>9</sup> /L)	15,66 (7,62)	12,57(8,07)	> 0,05
Trombociti (×10 <sup>9</sup> /L)	303,6 (150,8)	315,7(146,3)	> 0,05

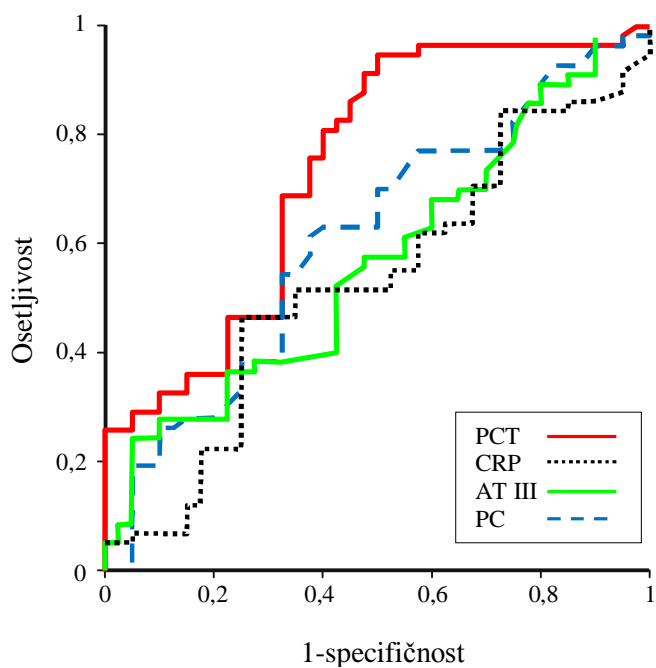
\**p* < 0,05 – statistički značajna razlika

Evidentno je da se vrednosti prokalcitonina, sa razvojem zapaljenske reakcije povećavaju. U grupi pacijenata koji su imali simptome duže od 24 časa, a razvili su sepsu (N=41) koncentracije prokalcitonina su povećane te srednja vrednost iznosi 3,30 ng/mL, dok su vrednosti prokalcitonina u grupi pacijenata sa SIRS (N=22) u okviru normalnih vrednosti i srednja vrednost je 0,35 ng/mL. Osim prokalcitonina, smanjenje aktivnosti proteina C je značajno, dok je kod antitrombina III na granici statističke značajnosti.

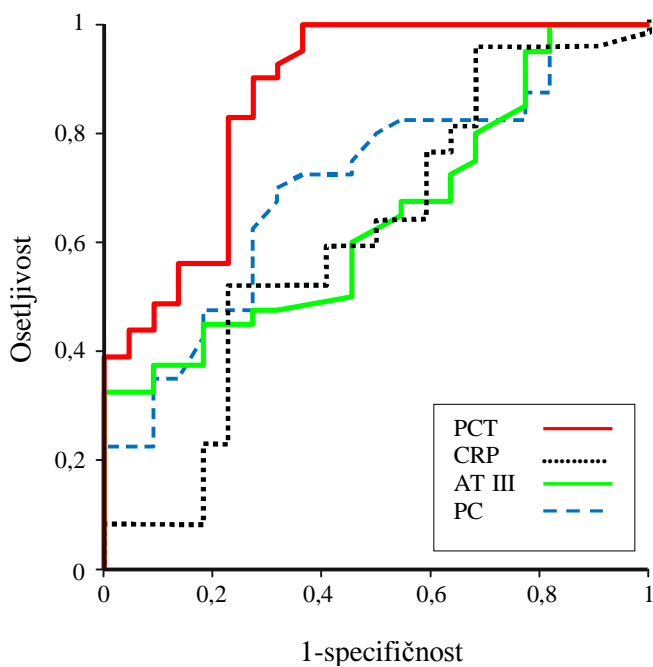
#### 4.2.4. Dijagnostička vrednost određivanih parametara kao markera sepse u IAI

Da bi se procenila dijagnostička vrednost određivanih parametara kao markera sepse u intraabdominalnim infekcijama (IAI) primenjena je analiza ROC (engl. *Receiver operating characteristic*) krive. Za dobijanje ROC dijagrama, kao i za ROC analizu korišćen je kompjuterski program SPSS vers. 20. ROC krivom (engl. *Receiver operating characteristic curve*) se u formi dijagrama prikazuje odnos osetljivosti i specifičnosti pri različitim nivoima odlučivanja. ROC kriva se dobija prikazivanjem stvarno pozitivnih rezultata (y-osa) nasuprot lažno pozitivnim rezultatima (x-osa). X-osa dijagrama prikazuje udeo zdravih pacijenata koji su pogrešno svrstani kao pozitivni pri određenom specifičnom nivou odlučivanja. Ovi lažno pozitivni rezultati matematički odgovaraju  $[1 - \text{specifičnost}]$ . Y-osa prikazuje stvarno pozitivne rezultate (osetljivost). Tako, osetljivost određivanja definišemo kao broj stvarno pozitivnih u procentima od ukupnog broja bolesnih, a specifičnost kao broj stvarno negativnih podeljen ukupnim brojem zdravih. Najopštiju meru dijagnostičke tačnosti predstavlja površina ispod ROC krive (AUC); to je osnovna osobina određivanja koja govori o njegovoj mogućnosti da vrši razdvajanje između dva stanja. Po dogovoru AUC je uvek  $\geq 0,5$ . Vrednosti se nalaze između 1,0 (kompletno razdvajanje vrednosti određivanja dve grupe) i 0,5 (bez jasne distribucione razlike između vrednosti određivanja dve grupe) (124–126).

ROC krive za određene markere sepse pri razlikovanju grupa pacijenata sa sepsom i sindromom sistemskog inflamatornog odgovora su prikazane na slikama 24. i 25. U tabeli XXXI i XXXII prikazani su podaci dobijeni ROC analizom u slučaju razlikovanja grupe pacijenata sa SIRS (B1) i sepsom (C1) kao i kod razlikovanja grupa istih pacijenata koji su imali simptome duže od 24 sata. Za sve ROC krive izračunate su odgovarajuće površine ispod krive (označene sa AUC) i 95% interval pouzdanosti (95% CI). Optimalna *cutt-off* vrednost za prokalcitonin izračunata ROC analizom u slučaju razlikovanja preoperativnih vrednosti u grupama pacijenata sa sepsom i SIRS iznosila je 1,1 ng/mL, a osetljivost je bila 72,4% i specifičnost 62,5%. ROC analizom krive sa vrednostima pacijenata iz grupe SIRS (B1) i sepsa (C1), koji su imali simptome duže od 24 sata, granična vrednost od 1,1 ng/mL dala je veću osetljivost (82,9%) i veću specifičnost (77,3%).



Slika 24. ROC krive za vrednosti markera sepse pri razlikovanju grupe pacijenata sa SIRS (B1) i sepsom (C1) na dan prijema



Slika 25. ROC krive za markere sepse kod pacijenata grupe SIRS (B1) i sepsa (C1), koji su imali simptome duže od 24 sata

Tabela XXXI Podaci iz ROC analize za prokalcitonin, CRP, antitrombin III i protein C kod pacijenata preoperativno i kod pacijenata koji su imali simptome duže od 24 sata

Parametar	preoperativno	simptomi duže od 24h
	AUC (95%CI)	AUC (95%CI)
Prokalcitonin, ng/mL	0,740 (0,637– 0,842)	0,869 (0,771-0,967)
CRP, mg/ L	0,495 (0,370 – 0,621)	0,602 (0,447-0,757)
Antitrombin III, %	0,570 (0,455 – 0,685)	0,644 (0,506-0,783)
Protein C, %	0,610 (0,496 – 0,725)	0,706 (0,573-0,839)

Tabela XXXII Dijagnostička vrednost za prokalcitonin kod pacijenata preoperativno i kod pacijenata koji su imali simptome duže od 24 sata

Prokalcitonin	preoperativno	simptomi duže od 24h
AUC (95%CI)	0,740 (0,637– 0,842)	0,869 (0,771-0,967)
"cutt -off " vrednost	1,1 ng/mL	1,1 ng/mL
Osetljivost (%)	72,4	82,9
Specifičnost (%)	62,5	77,3

### 4.3. Klinička vrednost određivanih parametara u drugoj studiji

Drugi deo istraživanja obuhvatio je 60 pacijenata sa akutnim abdominalnim bolom koji su pri dolasku u Urgentni centar ispunjavali kriterijume za SIRS (*Systemic Inflammation Response Syndrom*). Nakon hirurške intervencije, potvrde laboratorijskih ispitivanja i pozitivnog mikrobiološkog nalaza 30 pacijenata svrstano je u grupu pacijenata sa dijagnozom sepse (grupa C2), dok je ostalih 30 pacijenata svrstano u grupu pacijenata koji su razvili SIRS (grupa B2). U skladu sa dokumentom "*Definitions for sepsis and organ failure and guidelines for the use of innovative therapies in sepsis*" (11) kod pacijenata sa potvrđenom sepsom razlikovana su i stanja teške sepse i septičnog šoka od sepse. Kod pacijenata uzorci krvi za određivanje ispitivanih parametara uzimani su u vreme prijema na lečenje kao i prvog, trećeg i petog dana nakon hirurškog zahvata. U ispitivanje je bilo uključeno i 70 zdravih osoba, 36 žena i 34 muškarca, starosne dobi od 27 do 84 godine (grupa A2).

#### 4.3.1. Preoperativne vrednosti biomarkera sepse

U danu prijema na lečenje u UC, pre neophodnog hirurškog zahvata, dakle preoperativno, kod svih pacijenata, kao i kod kontrolne grupe koju su sačinjavale zdrave osobe, određivani su biomarkeri sa ciljem da se odredi njihova ukupna klinička vrednost u dijagnozi sepse. Određena je vrednost sledećih parametara: koncentracije presepsina, prokalcitonina (PCT), lipopolisaharid vezujućeg proteina (LBP), interleukina 6 (IL-6), C-reaktivnog proteina (CRP), leukocita, hemoglobina (HGB), trombocita, ukupnih proteina, albumina, kalijuma i neorganskog fosfora, aktivnost antitrombina III (AT III) i proteina C, procenat segmentiranih leukocita i brzina sedimentacije eritrocita.

U grupi pacijenata sa SIRS (B2), preoperativne vrednosti su pokazale statistički značajnu razliku u odnosu na vrednosti zdravih osoba za sve određivane parametre, osim za protein C. Pacijenti sa potvrđenom sepsom (C2) su imali statistički značajno različite vrednosti za sve određivane biomarkere u odnosu na zdravu populaciju. Razlikovanje pacijenata sa sepsom u odnosu na pacijente sa SIRS statistički značajno je za sledeće parametre: presepsin, prokalcitonin, LBP, IL6, CRP, leukocite, segmentirane leukocite i brzinu sedimentacije. Preoperativne vrednosti određivanih parametara kod



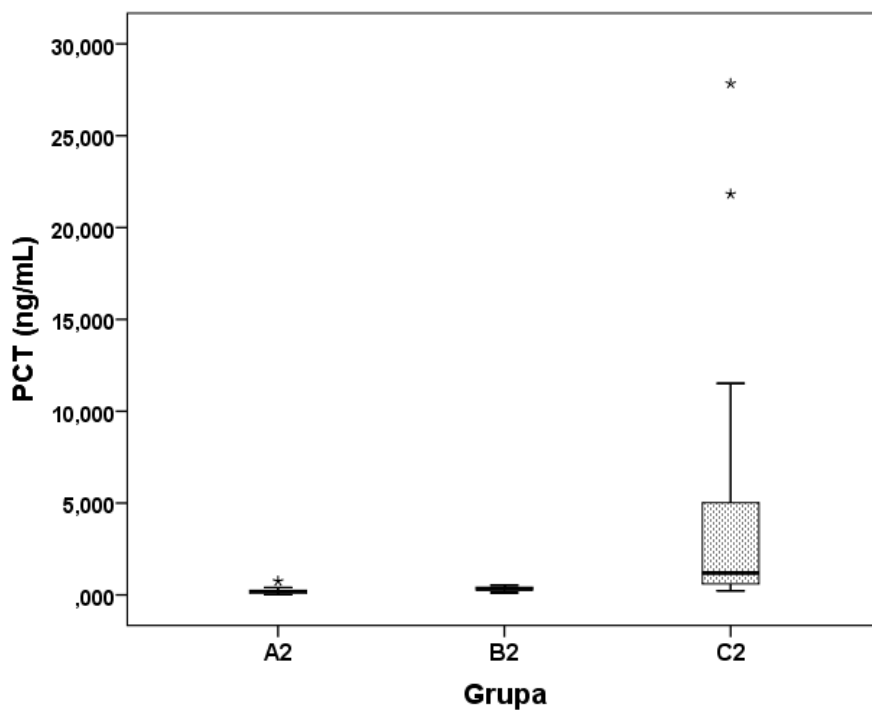
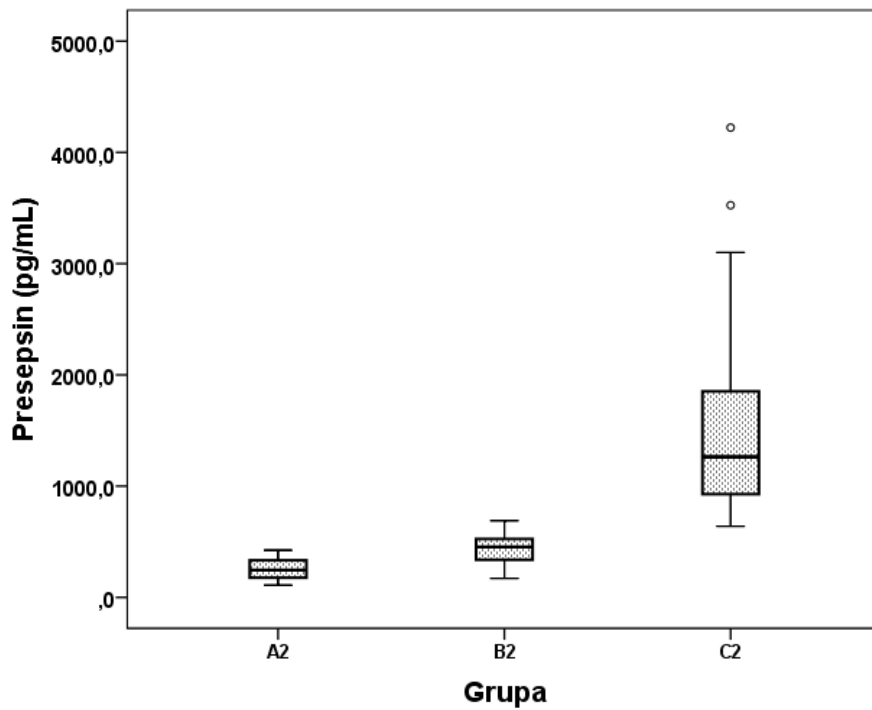
zdravih osoba (A2), pacijenata koji su razvili SIRS (B2) i pacijenata sa potvrđenom sepsom (C2) prikazani su u Tabelama XXXIII –XXXV i na Slikama 26–33.

Tabela XXXIII Preoperativne vrednosti određivanih parametara kod zdravih osoba (A2), pacijenata sa SIRS (B2) i sepsom (C2)

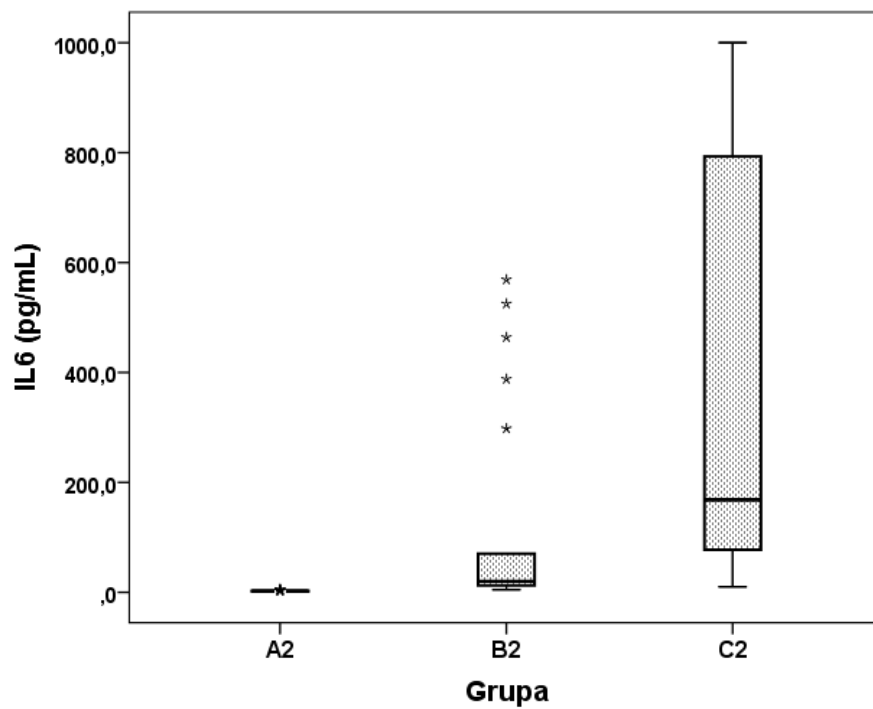
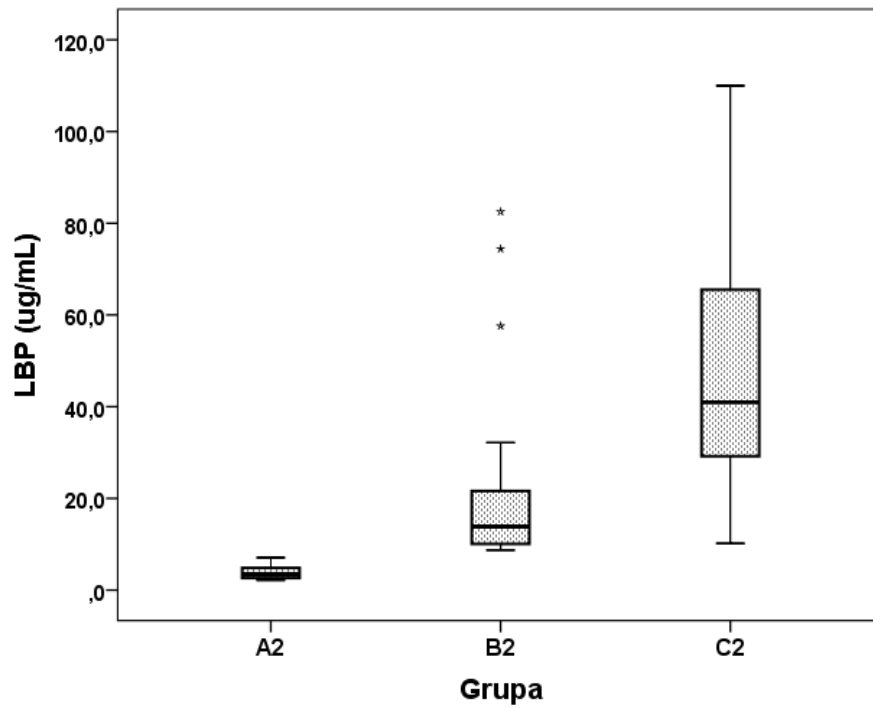
Parametar	Grupa	Statistički parametri				
		N	$\bar{x}$	Sd	Min	Max
presepsin, pg/mL	Zdravi (A2)	70	258,7	92,5	111	425
	SIRS (B2)	30	430,0*	141,3	170	689
	Sepsa (C2)	30	1508,3*/**	866,6	639	4223
PCT, ng/mL	Zdravi (A2)	70	0,195	0,119	0,024	0,750
	SIRS (B2)	30	0,334*	0,104	0,125	0,525
	Sepsa (C2)	30	4,479*/**	6,999	0,220	27,840
LBP ( $\mu$ g/mL)	Zdravi (A2)	70	3,81	1,360	2,1	7,1
	SIRS (B2)	30	21,14*	19,191	8,7	82,5
	Sepsa (C2)	30	38,04*/**	28,361	4,2	110,0
IL 6 (pg/mL)	Zdravi (A2)	70	2,29	0,619	2,0	5,3
	SIRS (B2)	30	99,29*	167,504	4,8	569,0
	Sepsa (C2)	30	356,22*/**	385,916	2,9	1000,0
CRP, mg/L	Zdravi (A2)	70	3,8	2,1	0,6	11,2
	SIRS (B2)	30	67,0*	76,5	8,0	309,1
	Sepsa (C2)	30	217,8*/**	121,2	16	498,5
Leukociti, $10^9/L$	Zdravi (A2)	70	8,1	2,69	3,8	15,1
	SIRS (B2)	30	11,21*	2,78	7,8	18,6
	Sepsa (C2)	30	15,28*/**	5,77	0,8	28,9

\*  $p < 0.0001$ , statistički značajna razlika u odnosu na grupu zdravih (A2)

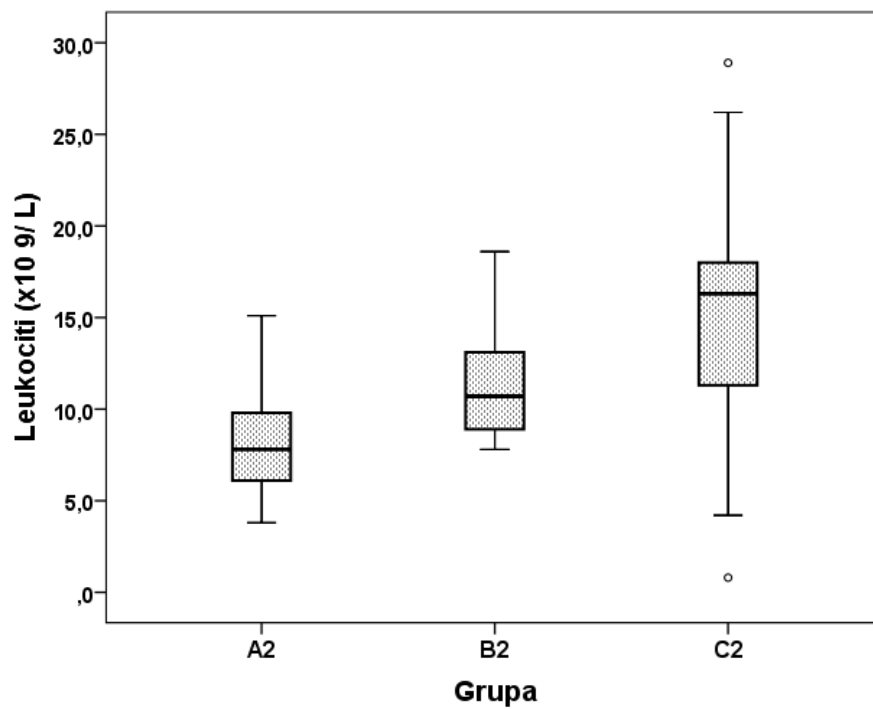
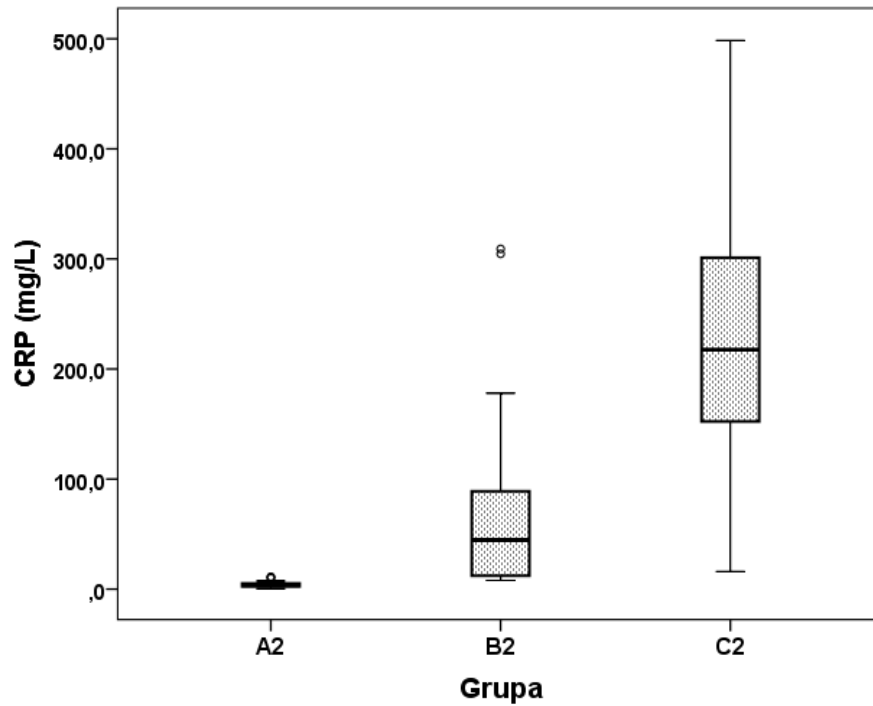
\*\*  $p < 0.0001$  statistički značajna razlika u odnosu na grupu SIRS (B2)



Slika 26. Koncentracije presepsina i prokalcitonina (PCT) kod zdravih osoba (A2), i preoperativno kod pacijenata sa SIRS (B2) i sepsom (C2); podaci su prikazani kao *box-plots* grafici



Slika 27. Koncentracije LBP i IL-6 kod zdravih osoba (A2), i preoperativno kod pacijenata sa SIRS (B2) i sepsom (C2); podaci su prikazani kao *box-plots* grafici



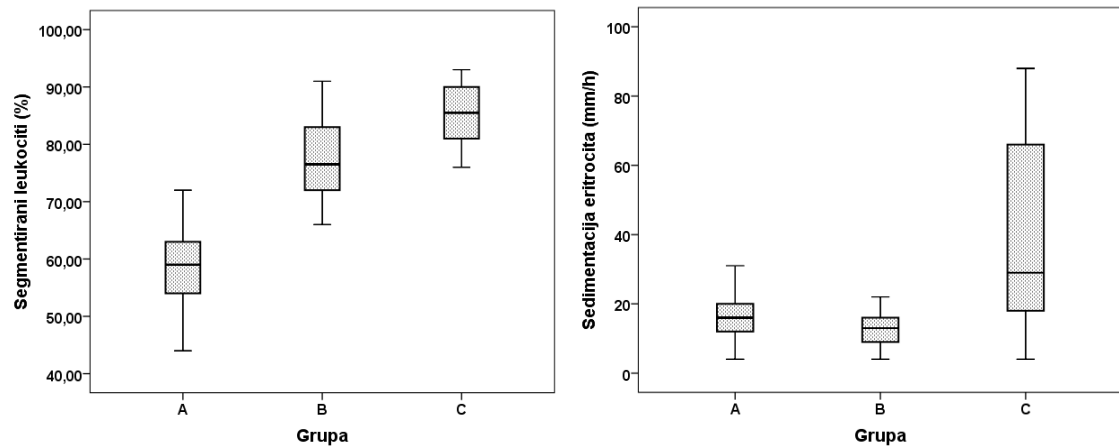
Slika 28. Koncentracije CRP i leukocita kod zdravih osoba (A2), i preoperativno kod pacijenata sa SIRS (B2) i sepsom (C2); podaci su prikazani kao *box-plots* grafici

Tabela XXXIV Preoperativne vrednosti određivanih parametara kod zdravih osoba (A2), pacijenata sa SIRS (B2) i sepsom (C2)

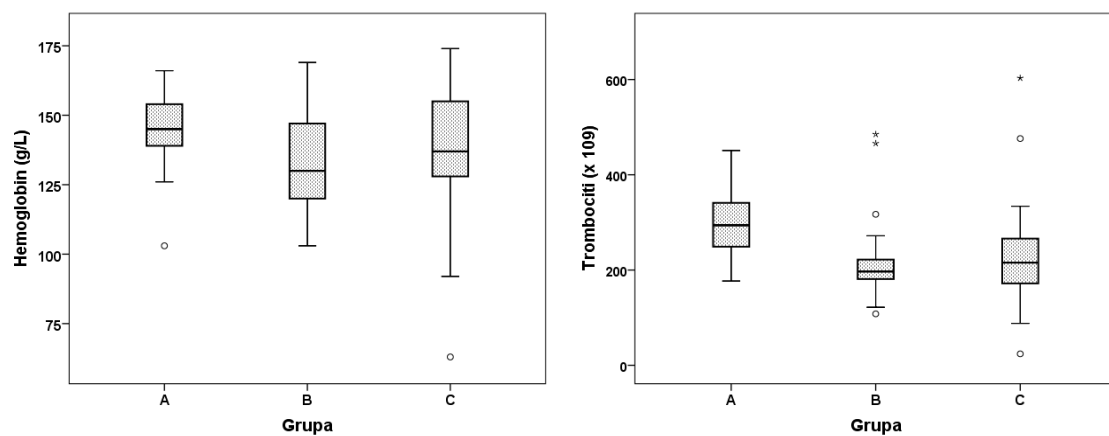
Parametar	Grupa	Statistički parametri				
		N	$\bar{x}$	Sd	Min	Max
Segm Leu (%)	Zdravi (A2)	70	59,8	7,11	44	72
	SIRS (B2)	30	76,8*	6,80	66	91
	Sepsa (C2)	30	85,3 */**	5,45	76	93
Sedimentacija (mm/h)	Zdravi (A2)	70	16,0	6,07	4	31
	SIRS (B2)	30	12,9*	4,74	4	22
	Sepsa (C2)	30	38,3*/**	29,18	4	88
Hemoglobin (g/L)	Zdravi (A2)	70	146,3	10,29	103	166
	SIRS (B2)	30	132,6*	17,73	103	169
	Sepsa (C2)	30	135,5*	24,19	63	174
Trombociti ( $\times 10^9/L$ )	Zdravi (A2)	70	291,5	60,23	177	451
	SIRS (B2)	30	224,8*	99,49	108	501
	Sepsa (C2)	30	234,3*	20,66	24	603
Antitrombin III (%)	Zdravi (A2)	70	95,9	10,27	78	118
	SIRS (B2)	30	87,5*	0,93	73	119
	Sepsa (C2)	30	83,4*	20,43	41	124
Protein C (%)	Zdravi (A2)	70	101,1	16,48	63	141
	SIRS (B2)	30	97,03	20,77	63	131
	Sepsa (C2)	30	90,7*	28,41	42	150

\*  $p < 0.05$ , statistički značajna razlika u odnosu na grupu zdravih (A2)

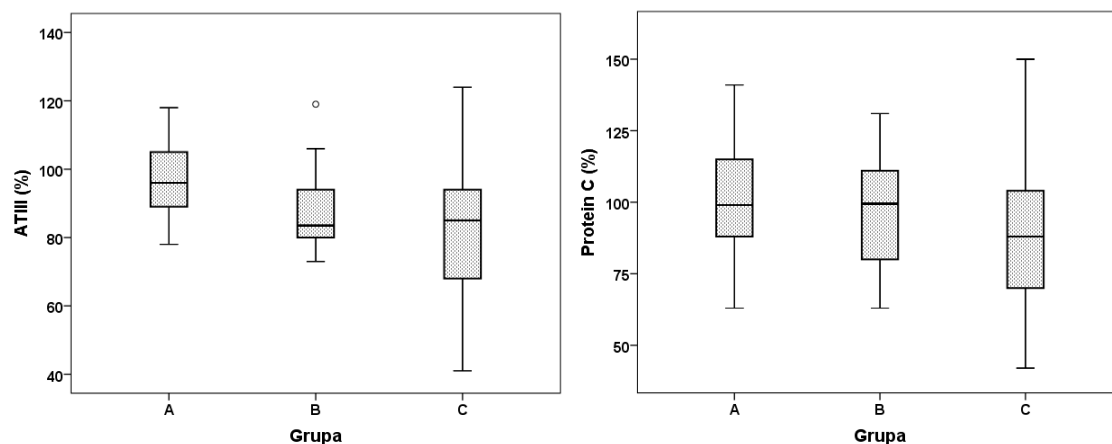
\*\*  $p < 0.05$  statistički značajna razlika u odnosu na grupu SIRS (B2)



Slika 29. Vrednosti segmentiranih leukocita i brzine sedimentacije eritrocita kod zdravih osoba (A), i preoperativno kod pacijenata sa SIRS (B) i sepsom (C) u drugoj studiji; podaci su prikazani kao *box-plots* grafici



Slika 30. Vrednosti koncentracije hemoglobina i trombocita kod zdravih osoba (A), i preoperativno kod pacijenata sa SIRS (B) i sepsom (C) u drugoj studiji; podaci su prikazani kao *box-plots* grafici



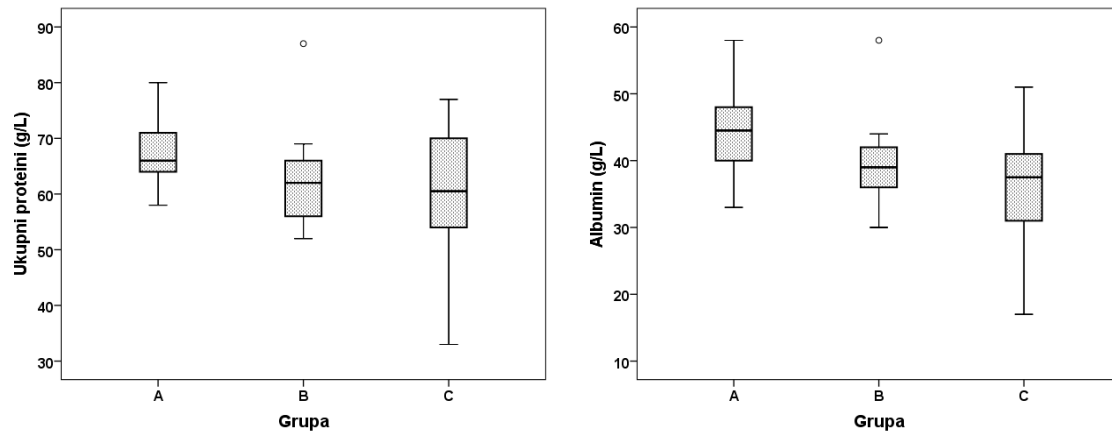
Slika 31. Aktivnosti antritrombina III (AT III) i proteina C kod zdravih osoba (A), i preoperativno kod pacijenata sa SIRS (B) i sepsom (C) u drugoj studiji; podaci su prikazani kao *box-plots* grafici

Tabela XXXV Preoperativne vrednosti određivanih parametara kod zdravih osoba (A2), pacijenata sa SIRS (B2) i sepsom (C2)

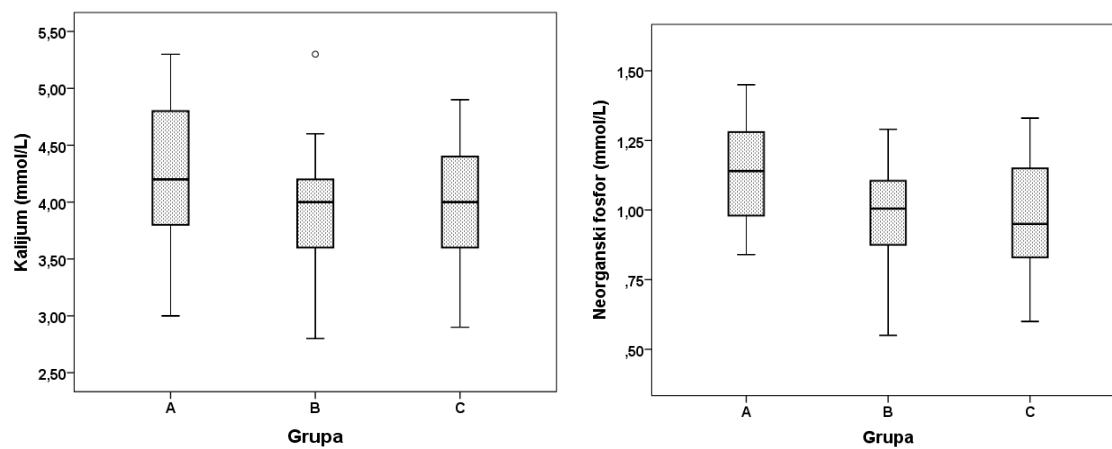
Parametar	Grupa	Statistički parametri				
		N	$\bar{x}$	Sd	Min	Max
Ukupni proteini (g/L)	Zdravi (A2)	70	67,44	5,06	58	80
	SIRS (B2)	30	61,9*	7,21	52	87
	Sepsa (C2)	30	59,7 *	11,12	33	77
Albumin (g/L)	Zdravi (A2)	70	44,4	5,32	33	58
	SIRS (B2)	30	38,9*	5,36	30	58
	Sepsa (C2)	30	35,3 *	9,21	17	51
Kalijum (mmol/L)	Zdravi (A2)	70	4,27	0,525	3,0	5,3
	SIRS (B2)	30	3,97*	0,465	2,8	5,3
	Sepsa (C2)	30	4,04 *	0,545	2,9	4,9
Neorg.fosfor (mmol/L)	Zdravi (A2)	70	1,137	0,1743	0,84	1,45
	SIRS (B2)	30	1,118*	0,5857	0,55	3,68
	Sepsa (C2)	30	1,028*	0,2384	0,60	1,76

\*  $p < 0.05$ , statistički značajna razlika u odnosu na grupu zdravih (A2)

\*\*  $p < 0.05$  statistički značajna razlika u odnosu na grupu SIRS (B2)



Slika 32. Koncentracije ukupnih proteina i albumina kod zdravih osoba (A), i preoperativno kod pacijenata sa SIRS (B) i sepsom (C) u drugoj studiji; podaci su prikazani kao *box-plots* grafici



Slika 33. Koncentracije kalijuma i neorganskog fosfora kod zdravih osoba (A), i preoperativno kod pacijenata sa SIRS (B) i sepsom (C) u drugoj studiji; podaci su prikazani kao *box-plots* grafici



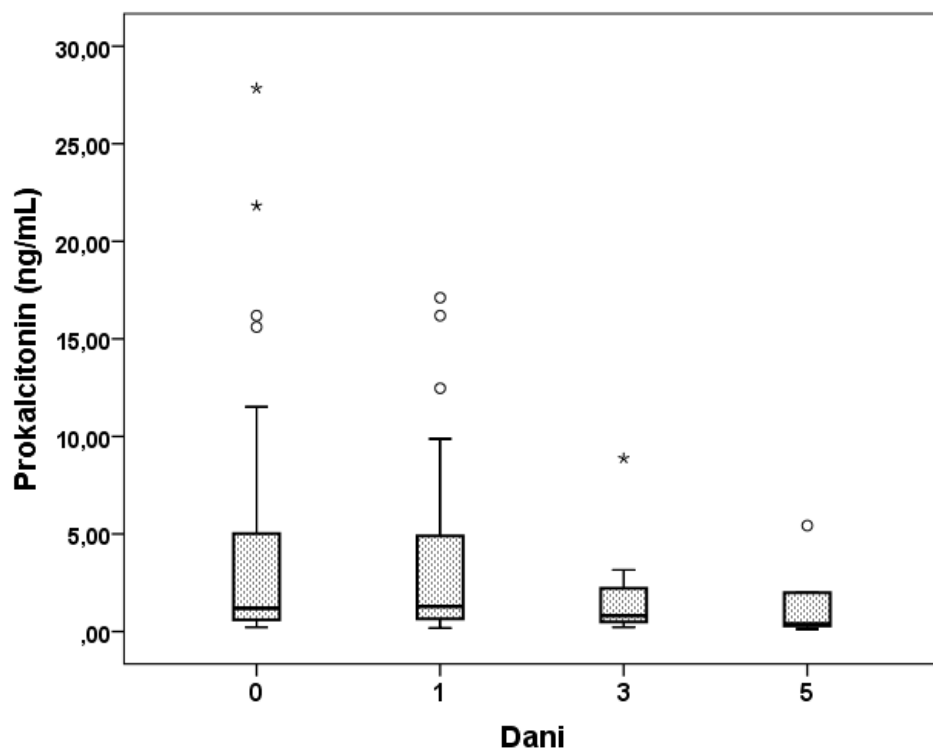
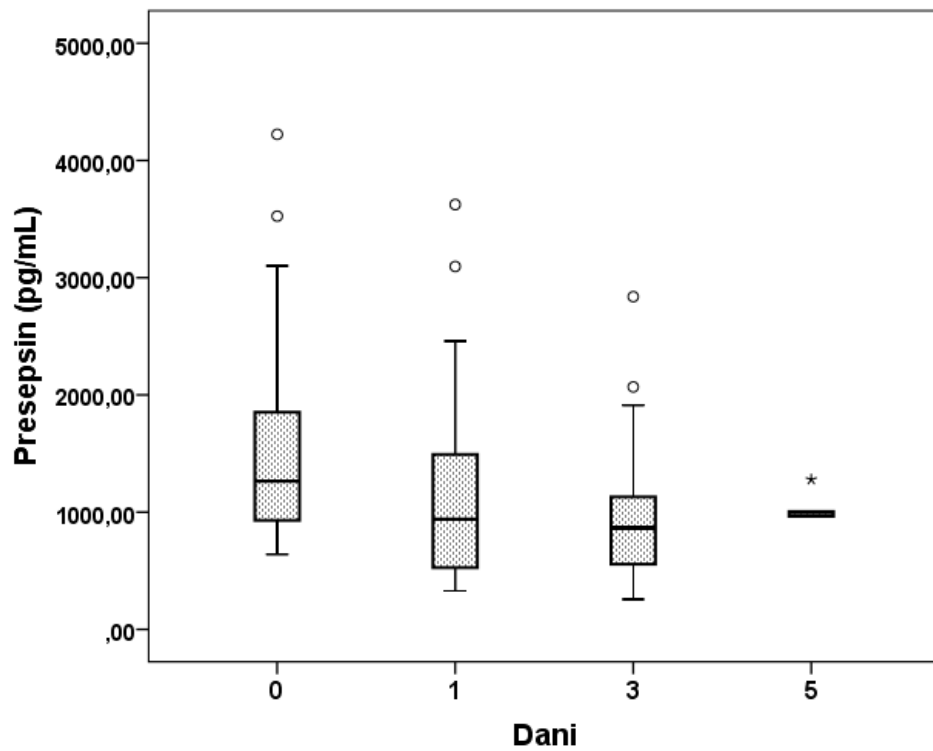
### 4.3.2. Postoperativne vrednosti biomarkera sepse

Odmah po prijemu u UC i nakon neophodnih dijagnostičkih procedura pacijenti su podvrgnuti hirurškoj intervenciji. Pre- i post-operativne vrednosti markera sepse prikazane su u Tabelama XXXVI – XXXVIII i na Slikama 34–41. U danima nakon operativnog zahvata preoperativne vrednosti koncentracija tj. aktivnosti određivanih parametara se smanjuju (osim brzine sedimentacije eritrocita). Statistički značajno sniženje vrednosti u odnosu na preoperativne vrednosti postoji kod presepsina (svih dana), prvog dana kod antitrombina III, proteina i albumina, trećeg dana kod IL6, leukocita, segmentisanih leukocita, proteina, albumina i kalijuma i petog dana kod proteina i albumina. Brzina sedimentacije statistički značajno raste trećeg odnosno petog dana postoperativno u odnosu na preoperativne vrednosti.

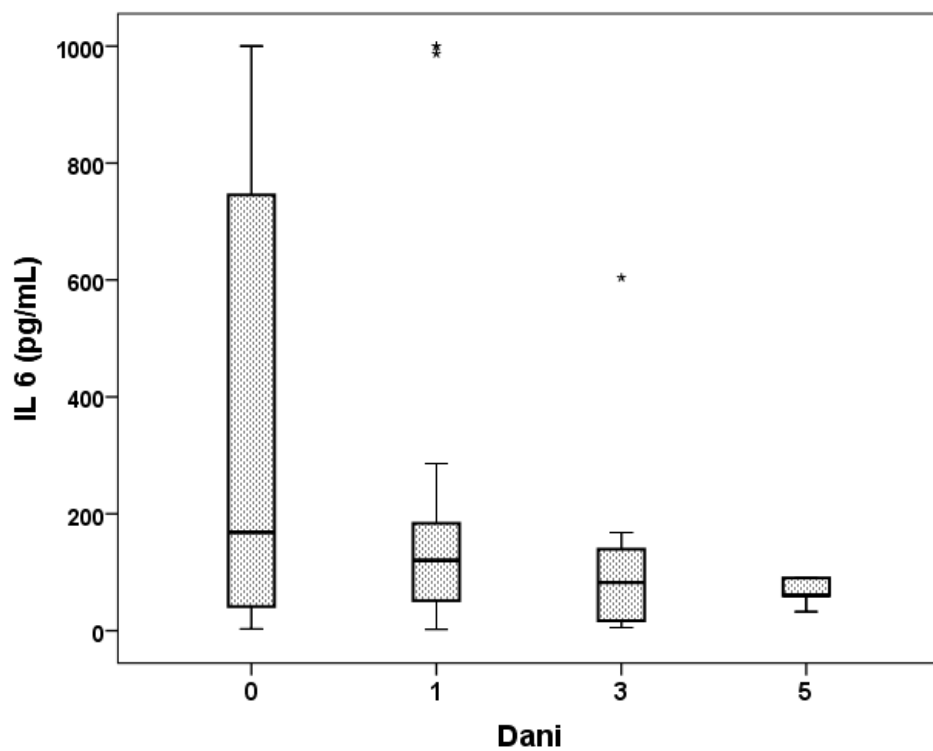
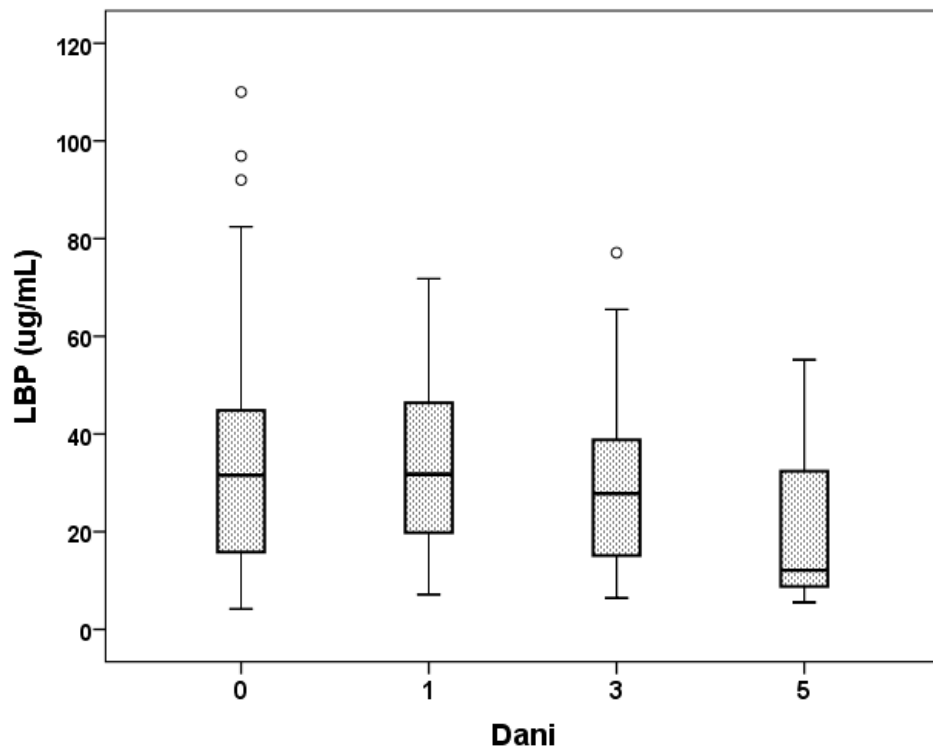
Tabela XXXVI Srednje vrednosti (Sd) i opseg vrednosti ispitivanih parametara u grupi pacijenata sa sepsom (C2) preoperativno (prijem) i postoperativno nakon 1, 3 i 5 dana

Parametar	Dani			
	prijem	1	3	5
Presepsin (pg/mL)	1508,3 (866,6) 639–4223	1174,9* <sup>P</sup> (828,6) 329–3624	1009,0* <sup>P</sup> (608,6) 257–2838	1042,0* <sup>P</sup> (133,3) 964–1278
Prokalcitonin (ng/mL)	4,479 (6,9989) 0,220–27,840	3,523 (4,8019) 0,183–17,110	1,533 (1,8836) 0,223–8,880	1,643 (2,2467) 0,120–5,430
LBP (µg/mL)	38,04 (28,361) 4,2–110,0	33,85 (17,012) 7,1–71,8	30,99 (18,958) 6,4–77,1	22,80(20,927) 5,5–55,2
IL 6 (pg/mL)	356,22 (385,915) 2,9–1000,0	230,23 (301,618) 2,5–1000,0	118,90* <sup>P</sup> (150,515) 5,2–604,0	78,96 (45,696) 32,4–152,0
CRP (mg/L)	217,80 (121,204) 16,0–498,5	210,25 (102,780) 41,0–495,7	215,79 (79,708) 81,8–388,0	230,86 (57,11) 181,9–324,4
Leukociti (×10 <sup>9</sup> /L)	15,28 (5,774) 0,8–28,9	14,78 (6,409) 0,2–30,9	12,98* <sup>P</sup> (3,623) 7,5–22,6	12,48 (2,636) 9,9–16,9

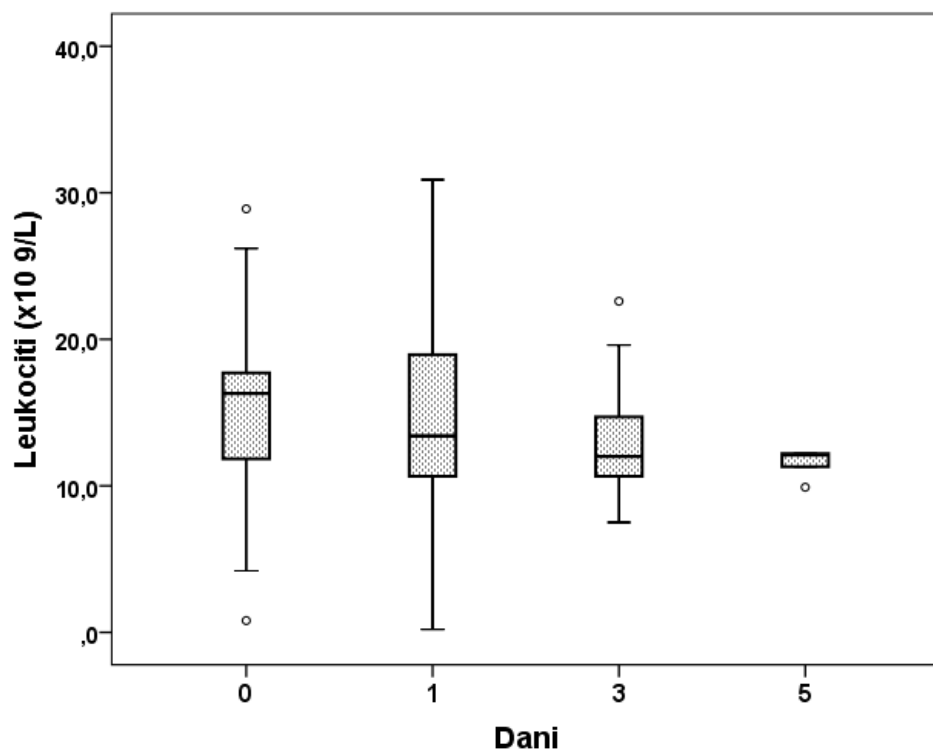
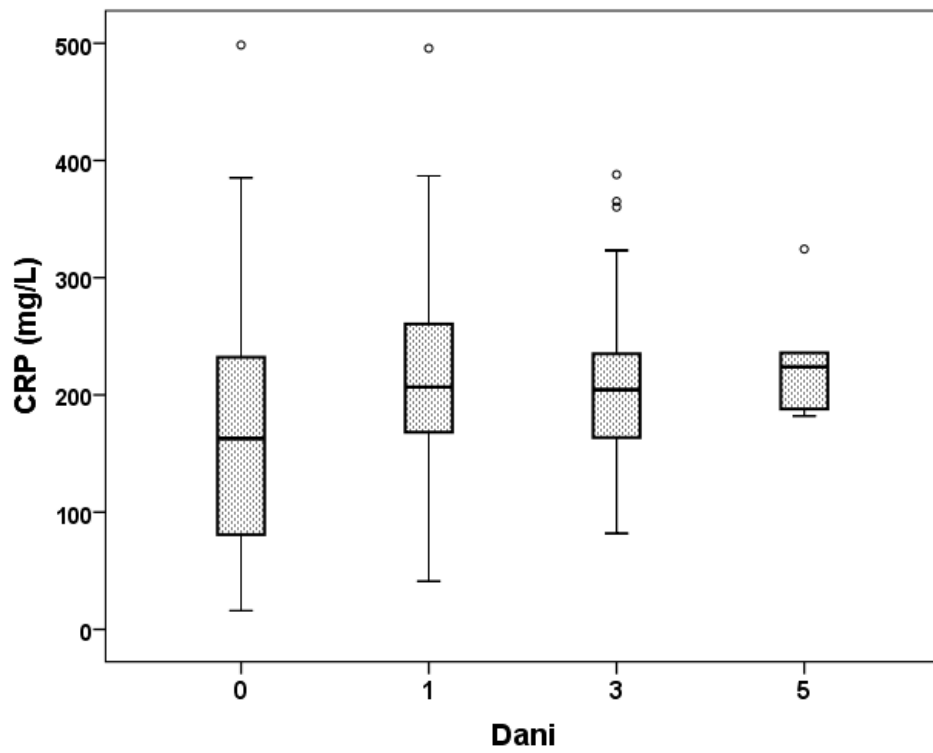
\*<sup>P</sup> statistički značajna razlika (p<0,05) u odnosu na dan prijema u okviru grupe



Slika 34. Koncentracije presepsina i prokalcitonina u grupi pacijenata sa sepsom po danima nakon prijema; podaci su prikazani kao *box-plots* grafici



Slika 35. Koncentracije LBP i IL-6 u grupi pacijenata sa sepsom po danima nakon prijema; podaci su prikazani kao *box-plots* grafici

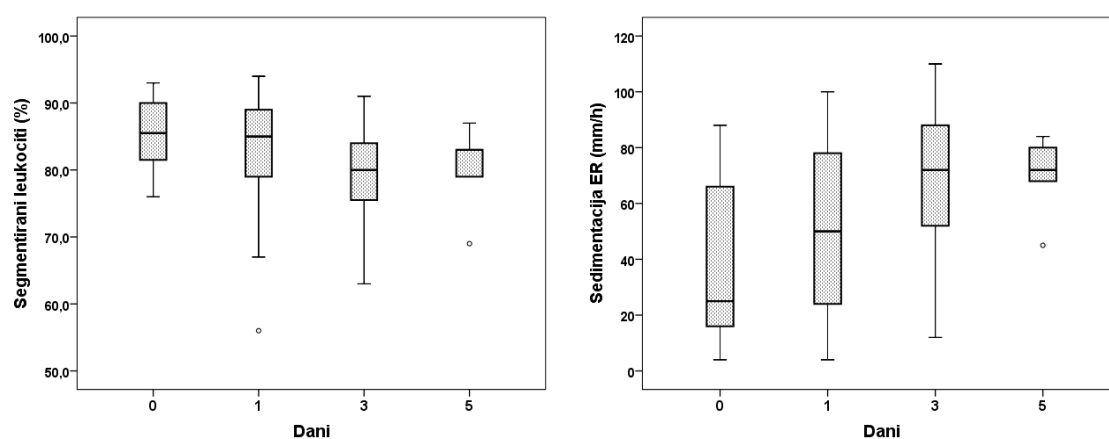


Slika 36. Koncentracije CRP i leukocita u grupi pacijenata sa sepsom po danima nakon prijema; podaci su prikazani kao *box-plots* grafici

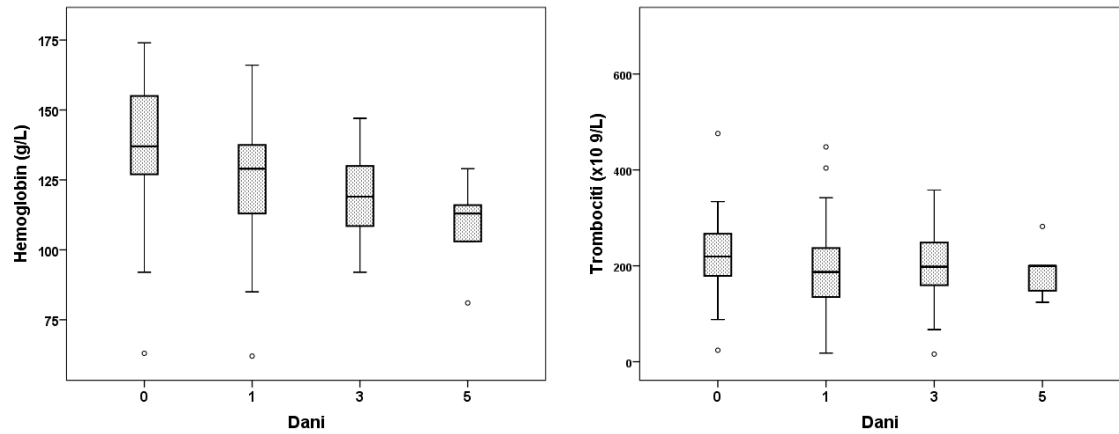
Tabela XXXVII Srednje vrednosti (Sd) i opseg vrednosti ispitivanih parametara u grupi pacijenata sa sepsom (C2) preoperativno (prijem) i postoperativno nakon 1, 3 i 5 dana

Parametar	Dani			
	prijem	1	3	5
Segm Leu (%)	85,3 (5,45) 76–93	83,0 (8,29) 56–94	79,7* <sup>P</sup> (6,99) 63–91	80,2 (6,87) 69–87
Sedimentacija (mm/h)	38,3 (29,18) 4–88	50,4 (29,49) 4–100	66,6* <sup>P</sup> (30,17) 12–110	69,8* <sup>P</sup> (15,24) 45–84
Hemoglobin (g/L)	135,5 (24,19) 63–174	125,9 (21,94) 62–166	119,7 (14,31) 92–147	108,4* <sup>P</sup> (17,91) 81–129
Trombociti ( $\times 10^9/L$ )	234,3 (20,66) 24–603	196,14 (17,70) 18–448	197,6 (16,26) 16–358	190,8 (27,18) 124–282
Antitrombin III (%)	83,4 (20,43) 41–124	72,6* <sup>P</sup> (18,22) 14–98	69,8 (15,35) 31–94	69,4 (8,26) 56–76
Protein C (%)	90,7 (28,41) 42–150	79,9 (23,23) 29–131	78,2 (20,36) 22–113	78,0 (15,28) 61–102

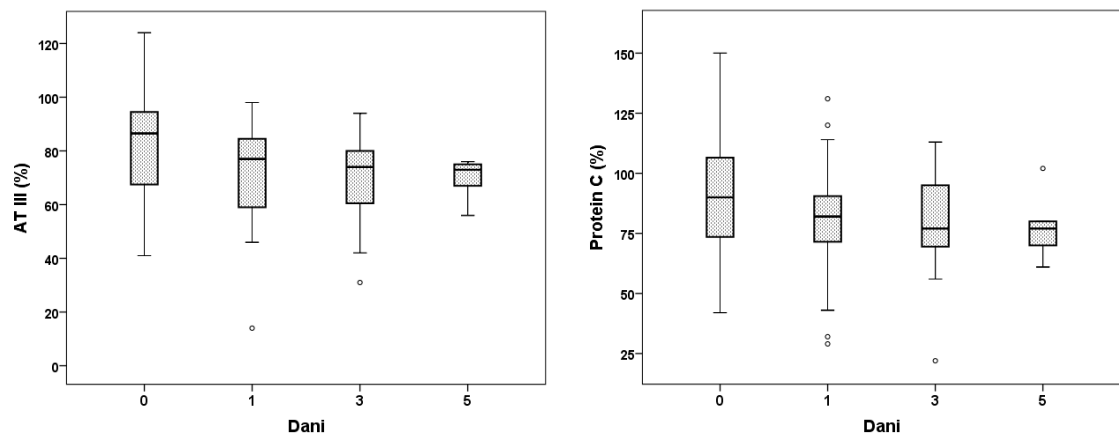
\*<sup>P</sup> statistički značajna razlika ( $p < 0,05$ ) u odnosu na dan prijema u okviru grupe



Slika 37. Vrednosti segmentiranih leukocita i brzine sedimentacije eritrocita u grupi pacijenata sa sepsom po danima nakon prijema: podaci su prikazani kao *box-plots* grafici



Slika 38. Koncentracije hemoglobina i trombocita u grupi pacijenata sa sepsom po danima nakon prijema: podaci su prikazani kao *box-plots* grafici

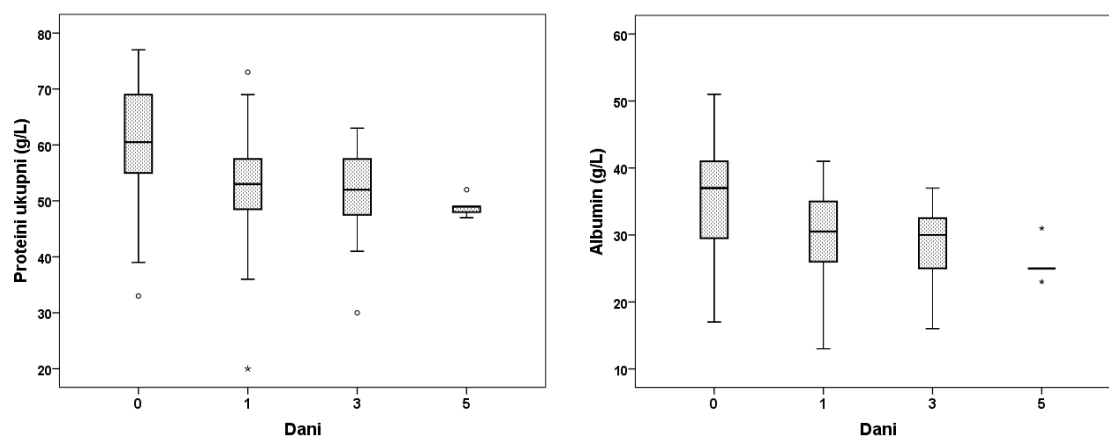


Slika 39. Aktivnosti antitrombina III (AT III) i proteina C u grupi pacijenata sa sepsom po danima nakon prijema: podaci su prikazani kao *box-plots* grafici

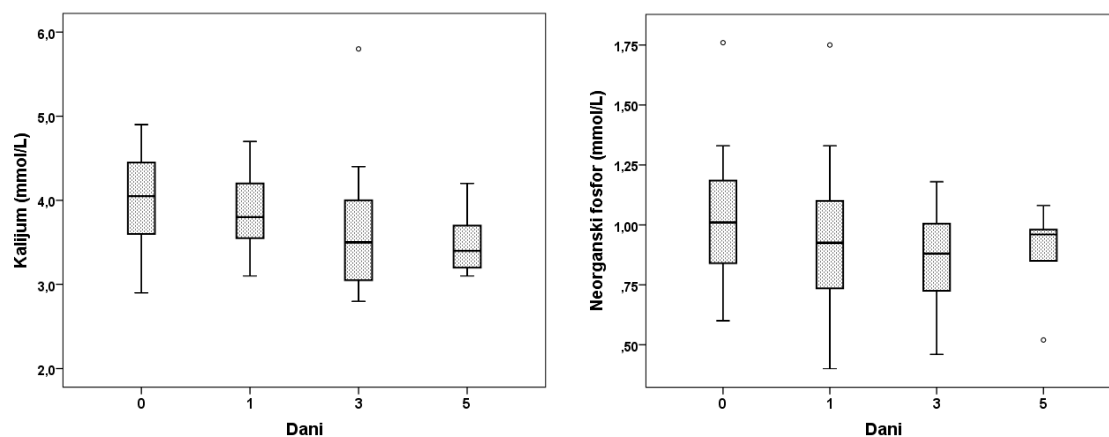
Tabela XXXVIII Srednje vrednosti (Sd) i opseg vrednosti ispitivanih parametara u grupi pacijenata sa sepsom (C2) preoperativno (prijem) i postoperativno nakon 1, 3 i 5 dana

Parametar	Dani			
	prijem	1	3	5
Ukupni proteini (g/L)	59,7 (11,12) 33–77	52,3* <sup>P</sup> (10,47) 20–73	51,8* <sup>P</sup> (7,63) 30–63	49,0* <sup>P</sup> (1,87) 47–52
Albumin (g/L)	35,3 (9,21) 17–51	30,1* <sup>P</sup> (6,78) 13–41	28,9* <sup>P</sup> (5,43) 16–37	25,8* <sup>P</sup> (3,03) 23–31
Kalijum (mmol/L)	4,04 (0,545) 2,9–4,9	3,88 (0,439) 3,1–4,7	3,64* <sup>P</sup> (0,699) 2,8–5,8	3,52 (0,444) 3,1–4,2
Neorg.fosfor (mmol/L)	1,028 (0,2384) 0,60–1,76	0,917 (0,2870) 0,40–1,75	0,867* <sup>P</sup> (0,1991) 0,46–1,18	0,878 (0,2162) 0,52–1,08

\*<sup>P</sup> statistički značajna razlika ( $p < 0,05$ ) u odnosu na dan prijema u okviru grupe



Slika 40. Koncentracije ukupnih proteina i albumina u grupi pacijenata sa sepsom po danima nakon prijema: podaci su prikazani kao *box-plots* grafici



Slika 41. Koncentracije kalijuma i neorganskog fosfora u grupi pacijenata sa sepsom po danima nakon prijema: podaci su prikazani kao *box-plots* grafici

#### 4.3.3. Korelacija određivanih parametara u drugoj studiji

Da bi se ustanovilo kakvo je slaganje i da li postoji korelacija između vrednosti određivanih parametara u stanju inflamacije urađena je neparametarskim testom Spearmanova korelacija, s obzirom na to da dobijeni podaci nisu imali normalnu raspodelu. Spearmanovi koeficijenti korelacije izračunati su primenom kompjuterskog programa SPSS vers.20. Vrednosti korelacionih koeficijenata i korelacija parametara preoperativno i postoperativno kod pacijenata sa sepsom (grupa C2) i sistemskim inflamatornim odgovorom (grupa B2) prikazane su u Tabelama XXXIX - XXXXVIII.

Markeri sepse, presepsin, prokalcitonin, LBP i CRP pokazali su očekivano značajnu korelaciju kako međusobno tako i sa većinom ostalih parametara.



Tabela XXXIX Korelacija parametara u grupi C2 na dan prijema (I)

Parametar	PSPS 0	PCT 0	LBP 0	IL6 0	CRP 0	WBC 0	SE 0	SEG 0
PSPS 0	1,000	,458*	,500**	,410*	,239	,063	,281	-,003
PCT 0	,458*	1,000	,535**	,576**	,511**	-,277	,222	-,115
LBP 0	,500**	,535**	1,000	,364	,722**	-,188	,649**	-,495**
IL6 0	,410*	,576**	,364	1,000	,260	-,008	,048	-,041
CRP 0	,239	,511**	,722**	,260	1,000	-,352	,606**	-,671**
WBC 0	,063	-,277	-,188	-,008	-,352	1,000	-,168	,551**
SE 0	,281	,222	,649**	,048	,606**	-,168	1,000	-,500**
SEG 0	-,003	-,115	-,495**	-,041	-,671**	,551**	-,500**	1,000
HGB 0	-,235	-,533**	-,502**	-,310	-,461*	,230	-,426*	,156
PLT 0	-,047	-,326	-,223	-,309	-,417*	,556**	-,036	,474*
ATIII 0	-,260	-,568**	-,426*	-,328	-,624**	,383*	-,418*	,510**
PC 0	-,460*	-,556**	-,502**	-,290	-,644**	,410*	-,482**	,414*
TP 0	-,069	-,447*	-,265	-,354	-,562**	,473*	-,012	,410*
ALB 0	-,208	-,524**	-,480**	-,495**	-,683**	,418*	-,362	,466*
K 0	-,265	-,118	-,245	,078	-,369	,348	-,185	,532**
P 0	,177	,015	-,020	,021	-,310	,255	-,113	,123

\*\* p < 0,01, postoji korelacija između parametara

\* p < 0,05, postoji korelacija između parametara

Tabela XXXX Korelacija parametara u grupi C2 na dan prijema (II)

Parametar	HGB 0	PLT 0	ATIII 0	PC 0	TP 0	ALB 0	K 0	P 0
PSPS 0	-,235	-,047	-,260	-,460*	-,069	-,208	-,265	,177
PCT 0	-,533**	-,326	-,568**	-,556**	-,447*	-,524**	-,118	,015
LBP 0	-,502**	-,223	-,426*	-,502**	-,265	-,480**	-,245	-,020
IL6 0	-,310	-,309	-,328	-,290	-,354	-,495**	,078	,021
CRP 0	-,461*	-,417*	-,624**	-,644**	-,562**	-,683**	-,369	-,310
WBC 0	,230	,556**	,383*	,410*	,473*	,418*	,348	,255
SE 0	-,426*	-,036	-,418*	-,482**	-,012	-,362	-,185	-,113
SEG 0	,156	,474*	,510**	,414*	,410*	,466*	,532**	,123
HGB 0	1,000	,278	,489**	,463*	,471*	,633**	-,150	-,166
PLT 0	,278	1,000	,575**	,466*	,786**	,617**	,126	,109
ATIII 0	,489**	,575**	1,000	,855**	,616**	,762**	,146	-,108
PC 0	,463*	,466*	,855**	1,000	,508**	,696**	,160	-,053
TP 0	,471*	,786**	,616**	,508**	1,000	,822**	,095	-,027
ALB 0	,633**	,617**	,762**	,696**	,822**	1,000	,100	-,030
K 0	-,150	,126	,146	,160	,095	,100	1,000	,246
P 0	-,166	,109	-,108	-,053	-,027	-,030	,246	1,000

\*\* p < 0,01, postoji korelacija između parametara

\* p < 0,05, postoji korelacija između parametara

Tabela XXXXI Korelacija parametara u grupi C2 prvi dan po prijemu (I)

Parametar	PSPS 1	PCT 1	LBP 1	IL6 1	CRP 1	WBC 1	SE 1	SEG 1
PSPS 1	1,000	,413*	,160	,234	,011	-,024	-,138	,102
PCT 1	,413*	1,000	,337	,415*	,233	-,162	-,091	,226
LBP 1	,160	,337	1,000	,323	,525**	-,247	,185	,048
IL6 1	,234	,415*	,323	1,000	,202	,236	-,105	,509**
CRP 1	,011	,233	,525**	,202	1,000	-,233	,322	-,190
WBC 1	-,024	-,162	-,247	,236	-,233	1,000	-,233	,550**
SE 1	-,138	-,091	,185	-,105	,322	-,233	1,000	-,383*
SEG 1	,102	,226	,048	,509**	-,190	,550**	-,383*	1,000
HGB1	,084	-,260	-,188	-,207	,032	,322	-,352	-,039
PLT 1	-,287	-,393*	-,414*	-,304	-,394*	,370	,148	,007
ATIII 1	-,246	-,555**	-,358	-,548**	-,532**	,253	-,018	-,157
PC 1	-,423*	-,652**	-,293	-,360	-,178	,308	-,022	-,102
TP 1	-,129	-,458*	-,126	-,359	-,181	,314	,390*	-,178
ALB 1	-,173	-,597**	-,243	-,500**	-,382*	,301	-,141	-,166
K 1	,131	,141	,031	,414*	-,062	,376	-,149	,094
P 1	,168	-,077	-,466*	-,204	-,383*	,015	-,149	-,004

\*\* p &lt; 0,01, postoji korelacija između parametara

\* p &lt; 0,05, postoji korelacija između parametara

Tabela XXXXII Korelacija parametara u grupi C2 prvi dan po prijemu (II)

Parametar	HGB 1	PLT 1	ATIII 1	PC 1	TP 1	ALB 1	K 1	P 1
PSPS 1	,084	-,287	-,246	-,423*	-,129	-,173	,131	,168
PCT 1	-,260	-,393*	-,555**	-,652**	-,458*	-,597**	,141	-,077
LBP 1	-,188	-,414*	-,358	-,293	-,126	-,243	,031	-,466*
IL 1	-,207	-,304	-,548**	-,360	-,359	-,500**	,414*	-,204
CRP 1	,032	-,394*	-,532**	-,178	-,181	-,382*	-,062	-,383*
WBC 1	,322	,370	,253	,308	,314	,301	,376	,015
SE 1	-,352	,148	-,018	-,022	,390*	-,141	-,149	-,149
SEG 1	-,039	,007	-,157	-,102	-,178	-,166	,094	-,004
HGB 1	1,000	,147	,319	,328	,244	,587**	,105	-,284
PLT 1	,147	1,000	,547**	,394*	,664**	,490**	-,059	,149
ATIII 1	,319	,547**	1,000	,769**	,658**	,833**	-,171	,070
PC 1	,328	,394*	,769**	1,000	,521**	,695**	-,056	-,036
TP 1	,244	,664**	,658**	,521**	1,000	,723**	-,077	,048
ALB 1	,587**	,490**	,833**	,695**	,723**	1,000	-,034	,013
K 1	,105	-,059	-,171	-,056	-,077	-,034	1,000	-,002
P 1	-,284	,149	,070	-,036	,048	,013	-,002	1,000

\*\* p &lt; 0,01, postoji korelacija između parametara

\* p &lt; 0,05, postoji korelacija između parametara

Tabela XXXXIII Korelacija parametara u grupi C2 treći dan po prijemu (I)

Parametar	PSPS 3	PCT 3	LBP 3	IL6 3	CRP 3	WBC 3	SE 3	SEG 3
PSPS 3	1,000	,280	,341	,616**	,450*	,504*	,030	,026
PCT 3	,280	1,000	-,068	-,046	-,319	,120	-,098	-,036
LBP 3	,341	-,068	1,000	,465*	,324	,413	-,034	,273
IL6 3	,616**	-,046	,465*	1,000	,575**	,386	-,319	,393
CRP 3	,450*	-,319	,324	,575**	1,000	,303	-,140	,098
WBC 3	,504*	,120	,413	,386	,303	1,000	-,320	,034
SE 3	,030	-,098	-,034	-,319	-,140	-,320	1,000	-,293
SEG 3	,026	-,036	,273	,393	,098	,034	-,293	1,000
HGB 3	-,177	-,107	-,189	-,298	,204	,211	-,157	-,158
PLT 3	-,097	,097	,001	-,515*	-,135	,238	,446*	-,419*
ATIII 3	-,266	-,303	,013	-,459*	-,132	,009	,542**	-,345
PC 3	-,511*	-,259	-,246	-,622**	-,202	-,190	,388	-,526**
TP 3	-,018	,015	,040	-,530**	-,141	,038	,571**	-,432*
ALB 3	-,274	-,185	-,172	-,546**	-,090	,116	,131	-,431*
K 3	-,040	-,226	,035	,176	,007	,184	-,034	-,202
P 3	-,144	,160	-,319	-,425*	-,374	-,490*	,306	-,417*

\*\* p < 0,01, postoji korelacija između parametara

\* p < 0,05, postoji korelacija između parametara

Tabela XXXXIV Korelacija parametara u grupi C2 treći dan po prijemu (II)

Parametar	HGB 3	PLT 3	ATIII 3	PC 3	TP 3	ALB 3	K 3	P 3
PSPS 3	-,177	-,097	-,266	-,511*	-,018	-,274	-,040	-,144
PCT 3	-,107	,097	-,303	-,259	,015	-,185	-,226	,160
LBP 3	-,189	,001	,013	-,246	,040	-,172	,035	-,319
IL6 3	-,298	-,515*	-,459*	-,622**	-,530**	-,546**	,176	-,425*
CRP 3	,204	-,135	-,132	-,202	-,141	-,090	,007	-,374
WBC 3	,211	,238	,009	-,190	,038	,116	,184	-,490*
SE 3	-,157	,446*	,542**	,388	,571**	,131	-,034	,306
SEG 3	-,158	-,419*	-,345	-,526**	-,432*	-,431*	-,202	-,417*
HGB 3	1,000	,234	,261	,100	,413	,679**	,073	-,295
PLT 3	,234	1,000	,520*	,564**	,571**	,365	-,089	,200
ATIII 3	,261	,520*	1,000	,686**	,726**	,646**	-,001	-,002
PC 3	,100	,564**	,686**	1,000	,442*	,458*	-,005	,313
TP 3	,413	,571**	,726**	,442*	1,000	,687**	,029	,176
ALB 3	,679**	,365	,646**	,458*	,687**	1,000	-,104	-,086
K 3	,073	-,089	-,001	-,005	,029	-,104	1,000	-,201
P 3	-,295	,200	-,002	,313	,176	-,086	-,201	1,000

\*\* p < 0,01, postoji korelacija između parametara

\* p < 0,05, postoji korelacija između parametara

Tabela XXXXV Korelacija parametara u grupi C2 peti dan po prijemu (I)

Parametar	PSPS 5	PCT 5	LBP 5	IL6 5	CRP 5	WBC 5	SE 5	SEG 5
PSPS 5	1,000	,975**	,051	,154	-,718	-,667	,667	,289
PCT 5	,975**	1,000	-,100	,100	-,600	-,600	,600	,205
LBP 5	,051	-,100	1,000	,800	0,000	,300	,300	,564
IL6 5	,154	,100	,800	1,000	,300	,300	0,000	,821
CRP 5	-,718	-,600	0,000	,300	1,000	,800	-,700	,051
WBC 5	-,667	-,600	,300	,300	,800	1,000	-,200	-,205
SE 5	,667	,600	,300	0,000	-,700	-,200	1,000	-,205
SEG 5	,289	,205	,564	,821	,051	-,205	-,205	1,000
HGB 5	,308	,400	-,200	-,300	-,200	,200	,700	-,667
PLT 5	-,368	-,359	-,462	-,872	-,205	,051	,154	-,921*
ATIII 5	-,975**	-1,000**	,100	-,100	,600	,600	-,600	-,205
PC 5	-,821	-,900*	,500	,200	,500	,700	-,300	-,051
TP 5	,395	,462	-,821	-,821	-,564	-,667	,205	-,526
ALB 5	-,459	-,447	,447	,224	,447	,894*	,224	-,344
K 5	-,821	-,700	-,100	0,000	,900*	,900*	-,500	-,359
P 5	,051	,200	-,900*	-,500	,100	-,400	-,500	-,154

\*\* p < 0,01, postoji korelacija između parametara

\* p < 0,05, postoji korelacija između parametara

Tabela XXXXVI Korelacija parametara u grupi C2 peti dan po prijemu (II)

Parametar	HGB 5	PLT 5	ATIII 5	PC 5	TP 5	ALB 5	K 5	P 5
PSPS 5	,308	-,368	-,975**	-,821	,395	-,459	-,821	,051
PCT 5	,400	-,359	-1,000**	-,900*	,462	-,447	-,700	,200
LBP 5	-,200	-,462	,100	,500	-,821	,447	-,100	-,900*
IL6 5	-,300	-,872	-,100	,200	-,821	,224	0,000	-,500
CRP 5	-,200	-,205	,600	,500	-,564	,447	,900*	,100
WBC 5	,200	,051	,600	,700	-,667	,894*	,900*	-,400
SE 5	,700	,154	-,600	-,300	,205	,224	-,500	-,500
SEG 5	-,667	-,921*	-,205	-,051	-,526	-,344	-,359	-,154
HGB 5	1,000	,410	-,400	-,300	,359	,447	,100	-,100
PLT 5	,410	1,000	,359	,205	,500	,229	,205	,051
ATIII 5	-,400	,359	1,000	,900*	-,462	,447	,700	-,200
PC 5	-,300	,205	,900*	1,000	-,718	,671	,600	-,600
TP 5	,359	,500	-,462	-,718	1,000	-,574	-,410	,667
ALB 5	,447	,229	,447	,671	-,574	1,000	,671	-,671
K 5	,100	,205	,700	,600	-,410	,671	1,000	0,000
P 5	-,100	,051	-,200	-,600	,667	-,671	0,000	1,000

\*\* p < 0,01, postoji korelacija između parametara

\* p < 0,05, postoji korelacija između parametara

Tabela XXXXVII Korelacija parametara u grupi B2 na prijemu (I)

Parametar	PSPS	PCT	CRP	WBC	LBP	IL6	SE	SEG
PSPS	1,000	,763**	,472**	,212	,512**	,489**	-,254	-,114
PCT	,763**	1,000	,615**	,290	,434*	,356	,011	,038
CRP	,472**	,615**	1,000	,108	,119	,020	,098	,223
WBC	,212	,290	,108	1,000	-,136	-,133	,111	,245
LBP	,512**	,434*	,119	-,136	1,000	,788**	,022	-,173
IL6	,489**	,356	,020	-,133	,788**	1,000	-,036	-,235
SEG	-,114	,038	,223	,245	-,173	-,235	,231	1,000
HGB	,129	,339	,489**	,013	,083	-,199	,110	,464**
PLT	,058	-,237	-,444*	,189	-,154	,009	-,111	,016
S	-,254	,011	,098	,111	,022	-,036	1,000	,231
ATIII	,270	,193	,164	-,060	,121	,338	-,125	,080
PC	-,056	-,117	,004	-,323	,081	,377*	,093	-,095
TP	-,027	-,082	-,099	-,102	-,050	,032	-,007	,119
ALB	-,051	-,061	,019	-,128	-,060	,203	,056	,011
K	,065	-,110	-,181	,035	,087	,094	-,051	,131
P	-,310	-,366*	-,334	-,174	-,205	-,079	,141	-,246

\*\* p < 0,01, postoji korelacija između parametara

\* p < 0,05, postoji korelacija između parametara

Tabela XXXXVIII Korelacija parametara u grupi B2 na prijemu (II)

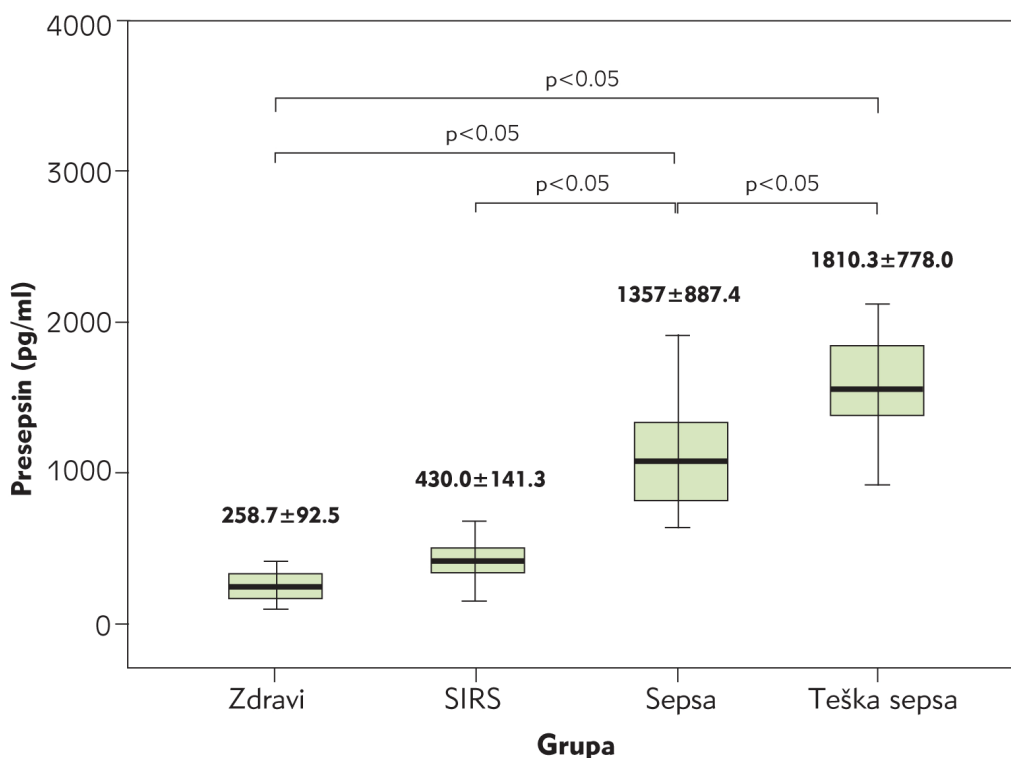
Parametar	HGB	PLT	ATIII	PC	TP	ALB	K	P
PSPS	,129	,058	,270	-,056	-,027	-,051	,065	-,310
PCT	,339	-,237	,193	-,117	-,082	-,061	-,110	-,366*
CRP	,489**	-,444*	,164	,004	-,099	,019	-,181	-,334
WBC	,013	,189	-,060	-,323	-,102	-,128	,035	-,174
LBP	,083	-,154	,121	,081	-,050	-,060	,087	-,205
IL6	-,199	,009	,338	,377*	,032	,203	,094	-,079
SEG	,464**	,016	,080	-,095	,119	,011	,131	-,246
HGB	1,000	-,635**	,219	,070	,279	,235	-,005	,012
PLT	-,635**	1,000	-,022	-,085	-,040	-,230	,186	-,076
SE	,110	-,111	-,125	,093	-,007	,056	-,051	,141
ATIII	,219	-,022	1,000	,749**	,614**	,678**	,167	,098
PC	,070	-,085	,749**	1,000	,523**	,708**	,017	,238
TP	,279	-,040	,614**	,523**	1,000	,843**	,512**	,416*
ALB	,235	-,230	,678**	,708**	,843**	1,000	,369*	,460*
K	-,005	,186	,167	,017	,512**	,369*	1,000	,161
P	,012	-,076	,098	,238	,416*	,460*	,161	1,000

\*\* p < 0,01, postoji korelacija između parametara

\* p < 0,05, postoji korelacija između parametara

#### 4.3.4. Presepsin u različitim patofiziološkim stanjima

U grupi pacijenata sa potvrđenom sepsom (C2), poštujući kriterijume iz dokumenta "*Definitions for sepsis and organ failure and guidelines for the use of innovative therapies in sepsis*" (11) razlikovana su i stanja teške sepse i septičnog šoka. Od ukupnog broja od 30 pacijenata njih 5 razvilo je stanje teške sepse, a njih 5 stanje septičnog šoka. Ostalim pacijentima, njih 20, dijagnostikovano je stanje sepse. Određene su vrednosti parametra presepsina kod ovih pacijenata i poređenje sa vrednostima iz ostalih grupa. Na Slici 42. prikazane su vrednosti za presepsin pri čemu su vrednosti bolesnika u stanju teške sepse i septičnog šoka objedinjene.



Slika 42. Poređenje vrednosti presepsina u različitim patofiziološkim stanjima (127)

#### 4.3.5. APACHE II u grupi pacijenata sa sepsom

APACHE II (*Acute Physiology and Chronic Health*) je najčešće korišćen skor u jedinicama intenzivne nege, spada u grupu fizioloških skorova i bazira se na podacima koji su lako merljivi. APACHE II skor se koristi za procenu težine oboljenja bolesnika na osnovu akutnog fiziološkog skora (*Acute Physiology Score*), skora za starost pacijenta (*Age Score*) kao i skora za hronična obolenja (*Chronic Health Score*). Podaci dobijeni merenjima se prate 24h da bi u definitivnu obradu ušli najbolji rezultati odgovarajućih parametara. Ovaj skor spada u grupu skorova rizika pomoću kojih procenjujemo verovatnoću pojave negativnog ishoda. U ovom ispitivanju praćeni su svi parametri neophodni za izračunavanje APACHE II skora. Vrednosti APACHE II skora u podgrupama pacijenata sa sepsom prikazani su u Tabeli XXXXIX i grafički na slici 43.

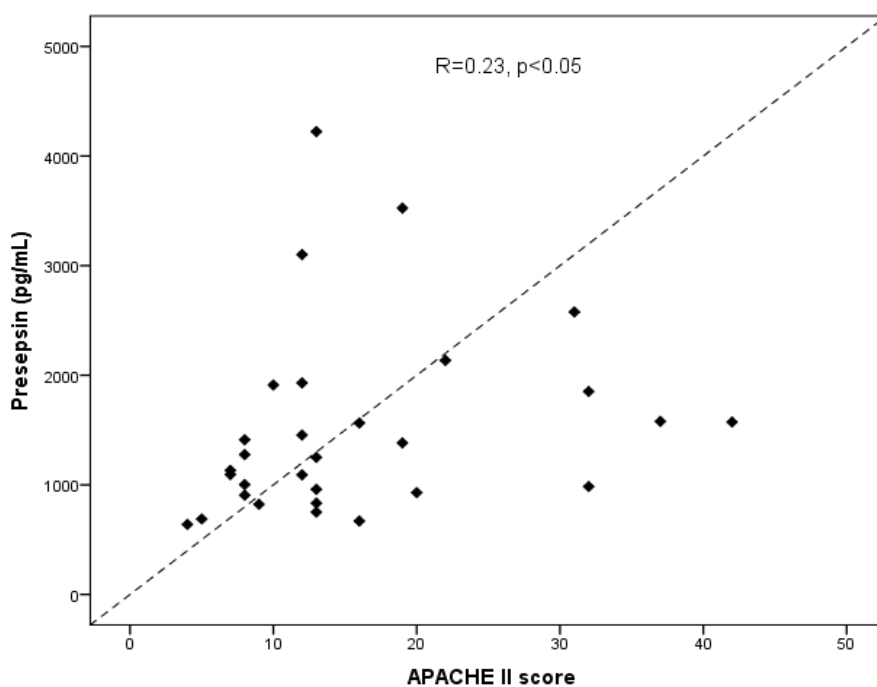
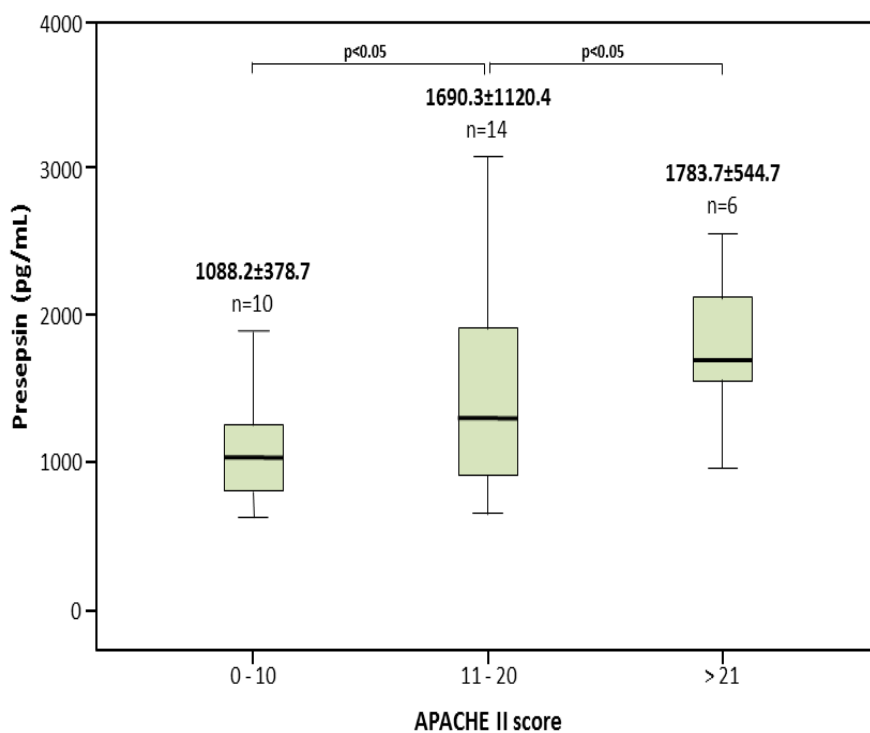
Tabela XXXXIX Vrednosti APACHE II skora u podgrupama pacijenata sa sepsom

Podgrupa	$\bar{x}$	Sd	Opseg vrednosti
Sepsa	10,1	3,18	4 – 16
Teška sepsa	19,2*	2,17	16 – 22
Septični šok	24,8*/**	4,66	31 – 42

\*  $p < 0.0001$ , statistički značajna razlika u odnosu na pacijente sa sepsom

\*\*  $p < 0.0001$  statistički značajna razlika u odnosu na pacijente sa teškom sepsom

Da bi se ispitali svi segmenti kliničkog značaja presepinu, kao markera sepse novijeg datuma, urađena je i korelacija ovog parametra sa vrednostima APACHE II skora u grupi pacijenata sa sepsom (C2). Rezultati ispitivanja prikazani su na Slici 43.



Slika 43. Distribucija vrednosti APACHE II skora u korelaciji sa vrednostima presepsina u grupi pacijenata sa sepsom (C2) i utvrđena statistički značajna razlika (127)



#### 4.3.6. Dijagnostička vrednost određivanih parametara kao markera sepse u IAI

Da bi se procenila dijagnostička vrednost određivanih parametara kao markera sepse u intraabdominalnim infekcijama (IAI) primenjena je analiza ROC (engl. *Receiver operating characteristic*) krive. Za dobijanje ROC dijagrama, kao i za ROC analizu korišćen je kompjuterski program SPSS vers. 20. ROC krivom (engl. *Receiver operating characteristic curve*) se u formi dijagrama prikazuje odnos osetljivosti i specifičnosti pri različitim nivoima odlučivanja. ROC kriva se dobija prikazivanjem stvarno pozitivnih rezultata (y-osa) nasuprot lažno pozitivnim rezultatima (x-osa). X-osa dijagrama prikazuje udeo zdravih pacijenata koji su pogrešno svrstani kao pozitivni pri određenom specifičnom nivou odlučivanja. Ovi lažno pozitivni rezultati matematički odgovaraju  $[1 - \text{specifičnost}]$ . Y-osa prikazuje stvarno pozitivne rezultate (osetljivost). Tako, osetljivost određivanja definišemo kao broj stvarno pozitivnih u procentima od ukupnog broja bolesnih, a specifičnost kao broj stvarno negativnih podeljen ukupnim brojem zdravih. Najopštiju meru dijagnostičke tačnosti predstavlja površina ispod ROC krive (AUC); to je osnovna osobina određivanja koja govori o njegovoj mogućnosti da vrši razdvajanje između dva stanja. Po dogovoru AUC je uvek  $\geq 0,5$ . Vrednosti se nalaze između 1,0 (kompletno razdvajanje vrednosti određivanja dve grupe) i 0,5 (bez jasne distribucione razlike između vrednosti određivanja dve grupe). (124–126).

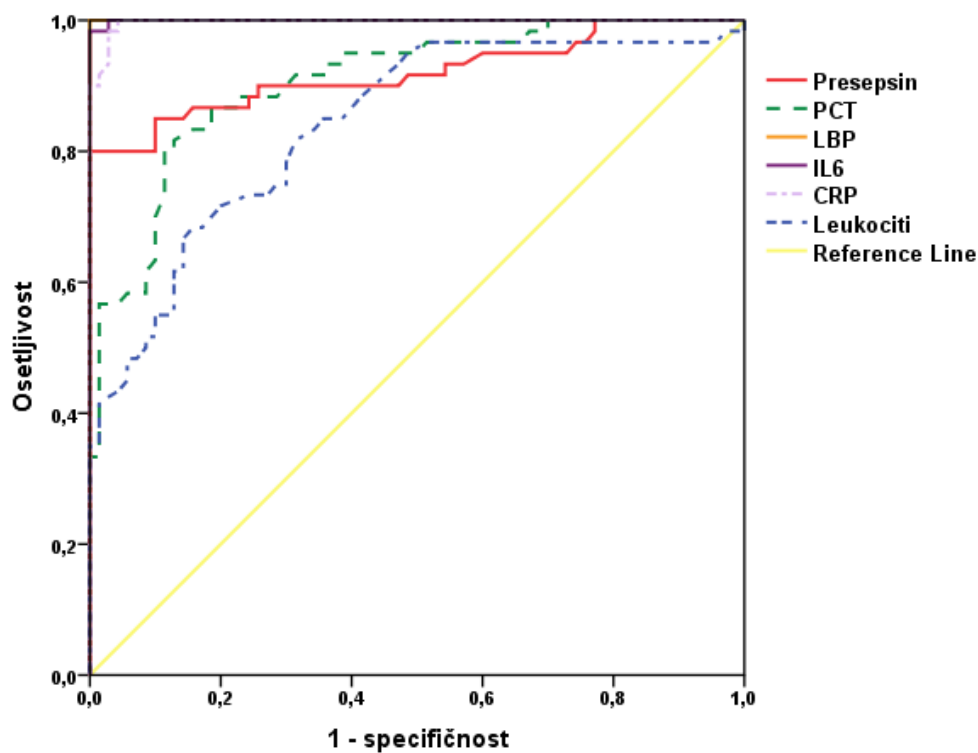
Za sve ROC krive izračunate su odgovarajuće površine ispod krive (označene sa AUC), standardne devijacije (označene sa SE) i 95% interval pouzdanosti (95% CI) koji su prikazani u Tabeli XXXXX. Izračunati su i prikazani ROC grafici zavisno od stanja i stadijuma infekcije. ROC analiza je primenjena, za razlikovanje zdravih osoba (A2) i pacijenata sa sumnjom na sepsu (Sepsa ssp.), pacijenata sa SIRS (B2) i sepsom (C2), ali i kod pacijenata sa sepsom u odnosu na grupu tzv. neinfektivnih pacijenata u koju su uključene zdrave osobe (A2) i pacijenti sa SIRS (B2). ROC krive za određene markere sepse pri razlikovanju grupa pacijenata sa sepsom i sindromom sistemskog inflamatornog odgovora i zdravih osoba su prikazane na Slikama 44–46. U Tabelama XXXXXI – XXXXXIII prikazane su izračunate "cut-off" vrednosti i odgovarajuće vrednosti za dijagnostičku osetljivost i specifičnost pri razlikovanju grupa.

Tabela XXXXX Podaci iz ROC analize pri diferencijaciji grupa ispitanika u infektivnom i neinfektivnom stanju

Grupe	Neinf /Sepsa (C2)	Zdravi (A2) / Sepsa ssp.	SIRS(B2)/Sepsa (C2)
Parametar	Parametri ROC analize AUC (SE) [95%CI]		
Presepsin	0,999 (0,001) [0,996 – 1,000]	0,920 (0,027) [0,867 – 0,972]	0,996 (0,004) [0,988 – 1,000]
Prokalcitonin	0,956 (0,022) [0,913 – 0,998]	0,905 (0,026) [0,855 – 0,956]	0,912 (0,042) [0,830 – 0,995]
LBP	0,956 (0,018) [0,922 – 0,991]	1,000 (0,000) [ 1,000 – 1,000]	0,857 (0,053) [0,752 – 0,961]
IL 6	0,947 (0,019) [0,910 – 0,984]	1,000 (0,001) [0,998 – 1,000]	0,822 (0,057) [0,711 – 0,934]
CRP	0,957 (0,016) [0,925 – 0,989]	0,997 (0,002) [0,993 – 1,000]	0,857 (0,050) [0,759 – 0,954]
Leukociti	0,853 (0,049) [0,756 – 0,950]	0,841 (0,035) [0,773 – 0,909]	0,777 (0,063) [0,652 – 0,901]

Površine ispod ROC krivih za presepsin, prokalcitonin, LBP, IL 6, CRP i leukocite za diferencijaciju infektivnog i neinfektivnog stanja su međusobno upoređene i za sve je  $p > 0,05$ , što znači da ne postoji statistički značajna razlika.

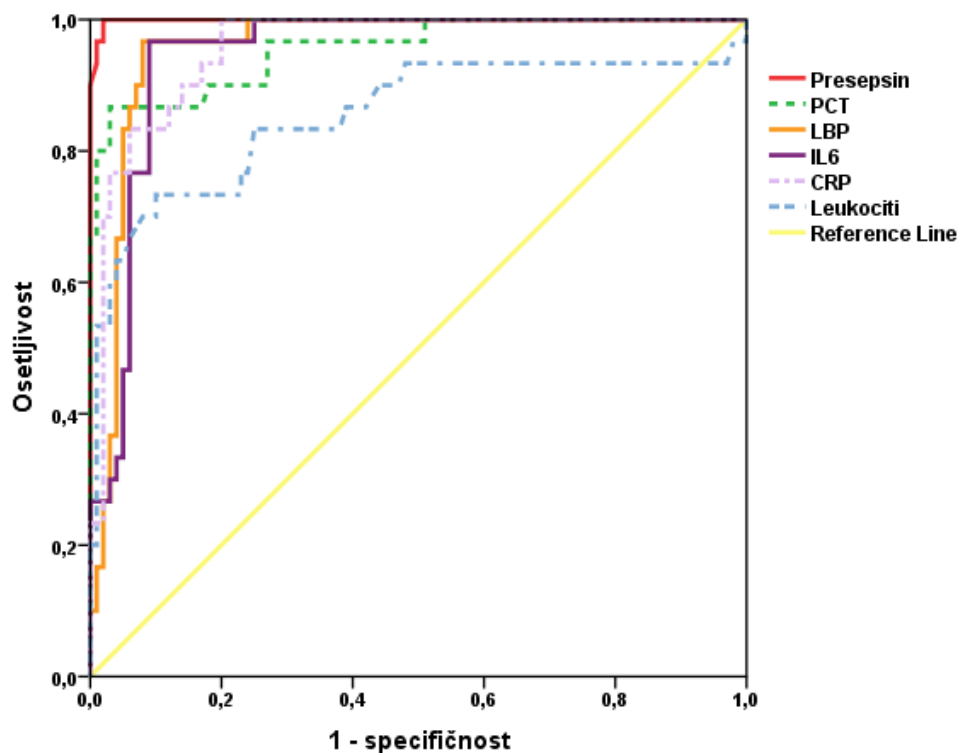
*Cutt-off* vrednosti su vrednosti koje su u statističkom programu označene kao optimalne, odnosno to su vrednosti koje odgovaraju najvećoj tačnosti – vrednosti sa minimalno lažno negativnih i minimalno lažno pozitivnih vrednosti. Osetljivost je verovatnoća da će rezultat testa biti pozitivan kada je bolest prisutna, a specifičnost je verovatnoća da će rezultat testa biti negativan kada bolest nije prisutna. U ovom slučaju gde su pacijenti podeljeni između onih sa sepsom i bez nje, osetljivost označava procenat pacijenata koji imaju koncentraciju određenog parametra (npr. presepsina ili prokalcitonina) iznad *cut-off* vrednosti od ukupnog broja bolesnih. Specifičnost označava broj pacijenata sa npr. presepsinom manjim od *cut-off* vrednosti podeljen ukupnim brojem zdravih.



Slika 44. ROC krive za markere sepsa pri razlikovanju grupe zdravih ispitanika (A2) i pacijenata sa sumnjom na sepsu (Sepsa ssp.)

Tabela XXXXXI Dijagnostička vrednost markera sepsa pri razlikovanju grupe zdravih ispitanika (A2) i pacijenata sa sumnjom na sepsu (Sepsa ssp.)

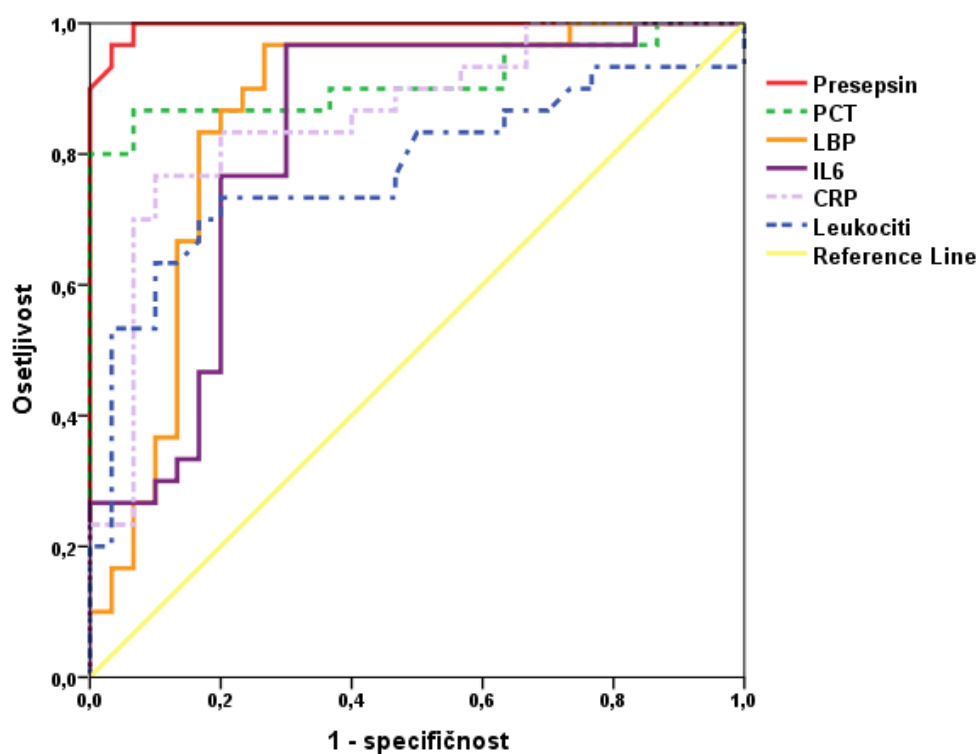
	"Cut-off" vrednost	Osetljivost (%)	Specifičnost (%)
Presepsin, pg/mL	392	85	90
Prokalcitonin, ng/mL	0,299	82	87
LBP, $\mu\text{g/mL}$	7,9	100	100
IL 6, pg/mL	4,1	100	97
CRP, mg/L	10,0	98	97
Leukociti, $\times 10^9/\text{L}$	10,0	72	80



Slika 45. ROC krive za markere sepse pri razlikovanju grupe neinfektivnih ispitanika (koju čine zdravi i pacijenti sa SIRS) i pacijenata sa potvrđenom sepsom

Tabela XXXXXII Dijagnostička vrednost markera sepse pri razlikovanju grupe neinfektivnih ispitanika (koju čine zdravi i pacijenti sa SIRS) i pacijenata sa potvrđenom sepsom

	"Cut-off" vrednost	Osetljivost (%)	Specifičnost (%)
Presepsin, pg/mL	630	100	98
Prokalcitonin, ng/mL	0,494	87	97
LBP, $\mu$ g/mL	19,9	97	92
IL 6, pg/mL	34,2	97	91
CRP, mg/L	15,6	100	80
Leukociti, $\times 10^9/L$	13,3	73	90



Slika 46. ROC krive za markere sepse pri razlikovanju grupe pacijenata sa SIRS (B2) i pacijenata sa potvrđenom sepsom (C2)

Tabela XXXXXIII Dijagnostička vrednost markera sepse pri razlikovanju grupe pacijenata sa SIRS (B2) i pacijenata sa potvrđenom sepsom (C2)

	"Cut-off" vrednost	Osetljivost (%)	Specifičnost (%)
Presepsin, pg/mL	630	100	93
Prokalcitonin, ng/mL	0,494	87	93
LBP, µg/mL	19,9	97	73
IL 6, pg/mL	34,2	97	70
CRP, mg/L	90,9	83	80
Leukociti, $\times 10^9/L$	13,3	73	80

## 5. DISKUSIJA

Mikroorganizmi kao što su bakterije i gljivice mogu da izazovu ozbiljne bolesti kod ljudi. Bakterijska infekcija može započeti od površinske kolonizacije do lokalizovane invazivne infekcije i rezultovati daljim sistemskim manifestacijama, kao što je sepsa. Sepsa kao sistemska bakterijska infekcija se teško razlikuje od lokalizovane infekcije i neinfektivnih stanja, kao što je sindrom sistemskog inflamatornog odgovora (SIRS), kod kritično obolelih pacijenata. Iako su infekcija i sepsa praćene kliničkim i laboratorijskim znacima, kao što su promene u telesnoj temperaturi, leukocitozom, povišenim vrednostima C-reaktivnog proteina (CRP) i tahikardijom, oni često daju nisku diskriminaciju u dijagnostici infekcije. Kako bolest može brzo napredovati od lokalnog procesa do sistemskih manifestacija organske disfunkcije, vreme do dijagnoze je veoma važno kod ovih bolesnika (128). Rano otkrivanje sepse i brza antibakterijska terapija su veoma važni. Glavni problemi su da dijagnozu sepse kod kritično obolelih pacijenata nije moguće utvrditi pomoću rutinskih laboratorijskih parametara i fizičkog pregleda, dok većina potvrđenih mikrobioloških ispitivanja i njihovi rezultati nisu odmah dostupni. Obično pre započinjanja adekvatne terapije, vrši se analiza hemokulture kod bolesnika suspektnih na sepsu. I pored toga, klinički znaci sepse mogu se razviti bez bakteriološkog dokaza infekcije i negativan rezultat ne isključuje prisustvo infekcije ili sepse (129). Odgovor organizma u sepsi uključuje oslobađanje raznih medijatora zapaljenja što navodi na činjenicu da se njihovo određivanje može koristiti i kao znak infekcije i težine stanja u kome se organizam trenutno nalazi. Zbog svojih karakteristika (stabilnost, vreme poluživota, osetljivost, specifičnost) oni se koriste i u praćenju efekata primenjene terapije (130). Rana dijagnoza sepse i bakterijske infekcije i dalje zavisi od zbira kliničkih kriterijuma i mikrobioloških postupaka, i zato je veliki broj studija, započet sa inicijativom da se poveća preživljavanje bolesnika u sepsi, zasnovan na strategiji koja podrazumeva pre svega ranu dijagnozu i odgovarajuće lečenje (131, 132).

Abdominalna sepsa je često prikazana simptomima akutnog abdominalnog stanja i povezana sa trbušnim infekcijama izazivajući sistemski inflamatorni odgovor organizma i hitnu hiruršku intervenciju. Dijagnostički kriterijumi intraabdominalne

sepsa treba da omogućuje prepoznavanje bolesnika u ranoj fazi sindroma, što će uputiti kliničara na izvor i postupak lečenja infekcije i isključiti stanja koja unatoč simptomima ne zahtevaju hirurški zahvat (80).

### **5.1. Prokalcitonin i drugi markeri teške sistemske bakterijske infekcije kod ispitanika prve studije**

U poslednjoj deceniji različite studije su pokazale da prokalcitonin ima vrhunsku dijagnostičku tačnost za dijagnozu sepsa u odnosu na ostale parametre i da je značajno povećana koncentracija prokalcitonina u korelaciji sa stepenom infekcije, prognozom i odgovorom na lečenje. Sistemske infekcije su povezane sa statistički značajno povišenim vrednostima prokalcitonina nasuprot vrednostima kod lokalizovanih infekcija. Prokalcitonin, kao prekursor kalcitonina, se nalazi u serumu u fiziološkim uslovima u vrlo niskim koncentracijama (manje od 0,1 ng/mL). Međutim, kod pacijenata sa sepsom ove vrednosti se povećavaju i do nekoliko stotina puta. Ova povećanja koreliraju sa težinom inflamatornog odgovora i stepenom infekcije (133). Shodno tome, lokalne bakterijske infekcije nisu praćene povećanim vrednostima prokalcitonina. Kofteridis i saradnici (134) su utvrdili da prokalcitonin nije pogodan za pacijente sa manje ozbiljnim ili lokalizovanim infekcijama, kao što su infekcije gornjih disajnih puteva. Nasuprot tome, Becker i saradnici (135) pokazali su da koncentracija prokalcitonina ne može uvek da se odnosi na sistemska bakterijska infekcija i da se viši nivoi mogu naći i u lokalizovanim infekcijama sa negativnim hemokulturama, kao što je u bakterijskoj pneumoniji. Naši podaci pokazali su da je prokalcitonin vrlo koristan parametar za rano preoperativno utvrđivanje sepsa kod intraabdominalnih infekcija. Ipak, ovaj nalaz se zasniva na grupi odabranih pacijenata koji su zbog svojih kliničkih pokazatelja bili podvrgnuti hitnoj hirurškoj intervenciji. Osim toga iz ispitivanja su bili isključeni pacijenti sa izmenjenim imunim odgovorom da bi se obezbedila činjenica da je inflamatorna reakcija isključivo uzrokovana abdominalnom patologijom.

Kod zdravih osoba (A1) srednja vrednost za prokalcitonin iznosila je 0,21 ng/mL, što je u skladu sa referentnim opsegom za ovaj parametar (< 0,5 ng/mL). Kod pacijenata sa sistemskim inflamatornim odgovorom, a bez potvrđene sepsa, u grupi

SIRS (B1), vrednosti prokalcitonina su bile statistički značajno više tokom celokupnog ispitivanja (preoperativno i postoperativno) u odnosu na zdrave osobe. Preoperativna srednja vrednost u ovoj grupi pacijenata iznosila je 0,45 ng/mL, što je još uvek u granicama normalnih vrednosti. Do trećeg dana postoperativnog lečenja zabeležene su statistički značajno povišene vrednosti prokalcitonina u odnosu na preoperativnu vrednost, što ukazuje na dinamiku rasta vrednosti prokalcitonina i težinu oboljenja. Četvrtog i petog postoperativnog dana vrednost prokalcitonina teži ka smanjivanju te su i vrednosti statistički značajno niže u odnosu na prvi i drugi dan postoperativnog lečenja (*Tabela XIII i Slika 11*).

Kod bolesnika sa potvrđenom sepsom, u grupi C1, preoperativna srednja vrednost iznosila je 2,32 ng/mL što je pet puta viša vrednost od normalne te nam ukazuje na postojanje jakog upalnog procesa u organizmu. Nivo prokalcitonina raste kao odgovor na stimulus u roku do 6 sati. Preoperativne vrednosti kod pacijenata sa sepsom su pokazale i statističku značajnost u odnosu na preoperativne vrednosti kod ostale dve grupe ispitanika, zdravih osoba (A1) i pacijenata sa SIRS (B1). Ova statistička značajnost, u smeru povećanih vrednosti prokalcitonina kod pacijenata sa sepsom (C1), zadržana je do četvrtog postoperativnog dana i to za obe grupe ispitanika (A1 i B1). Najveća srednja vrednost od 18,48 ng/mL kao i najveća izmerena vrednost za prokalcitonin (389,60 ng/mL) zabeležena je prvog postoperativnog dana lečenja. Najviša srednja vrednost i izmerena vrednost za prokalcitonin i u grupi SIRS (B1), takođe, je zabeležena prvog postoperativnog dana lečenja (*Tabela XIII i Slika 11*). Ovo se može objasniti činjenicom da iako nivo raste kao odgovor na stimulus, dalji nivoi zavise od balansa između plazma poluživota i nove produkcije prokalcitonina. Što je stepen sepse teži obimnija je i produkcija ovog markera. Dakle, kod pacijenata sa potvrđenom sepsom vrednosti prokalcitonina svih dana postoperativno bile su statistički značajno više u odnosu na preoperativne vrednosti, dok su trećeg, četvrtog i petog dana postoperativno vrednosti statistički značajno niže u odnosu na vrednosti iz prvog i drugog postoperativnog dana. Literaturni podaci (136) pokazuju da se nakon 72 sata, dakle trećeg dana postoperativno, vrednosti prokalcitonina značajno smanjuju, kao što je slučaj i kod naših bolesnika. Statistički značajno niža vrednost prokalcitonina petog postoperativnog dana u odnosu na prva tri dana lečenja, ali još uvek statistički značajno viša u odnosu na grupu zdravih ispitanika, dokaz je adekvatnih terapijskih postupaka i



znak dobre prognoze (*Tabela XIII*). Da je prokalcitonin dobar prognostički marker i pokazatelj odgovarajuće terapije pokazala su mnoga ispitivanja (137, 138), pa i naše.

Podaci iz literature ukazuju i na ulogu C-reaktivnog proteina u dijagnostici akutne bakterijske infekcije i praćenju terapije, ali većina autora predlaže korišćenje C-reaktivnog proteina u kombinaciji sa više drugih akutnih biomarkera (139). Naši podaci su pokazali da se indukcija C-reaktivnog proteina desila kod svih bolesnika sa inflamacijom, tj. u grupi SIRS (B1) i grupi pacijenata sa sepsom (C1) i da su vrednosti statistički značajno više u odnosu na vrednosti kod zdravih osoba (*Tabela XIV* i *Slika 12*).

Kod pacijenata sa "sistemski inflamatornim odgovorom" tj. u grupi B1, vrednosti C-reaktivnog proteina su bile statistički značajno više prvog i drugog dana postoperativno u odnosu na preoperativne vrednosti. Statistički značajno niže vrednosti evidentne su trećeg postoperativnog dana u odnosu na drugi tj. četvrtog i petog dana u odnosu na prva tri dana postoperativno (*Tabela XIV* i *Slika 12*).

C-reaktivni protein je protein akutne faze koga obilno stvaraju hepatociti pod uticajem citokina (npr. IL-6) i čija koncentracija značajno raste 24–48 sati nakon nastupa bolesti (140, 141), što su i naše vrednosti pokazale. Najviše srednje vrednosti i izmerene vrednosti zabeležene su drugog postoperativnog dana i to kod obe grupe bolesnika (grupa B1 i C1) (*Tabela XIV*).

Kod pacijenata sa sepsom vrednosti su statistički značajno više prvog, drugog i trećeg dana postoperativnog lečenja u odnosu na dan prijema, preoperativno. Nakon tri dana lečenja, dakle trećeg, četvrtog i petog dana, vrednosti C-reaktivnog proteina su statistički značajno niže u odnosu na prvi i drugi dan postoperativno. Takođe, četvrtog i petog dana C-reaktivni protein je statistički značajno niži u odnosu na prethodne dane (treći i četvrti dan postoperativno).

Iako su preoperativne, pa i postoperativne, vrednosti C-reaktivnog proteina povećane u obe grupe pacijenata (B1 i C1), među njima ne postoji statistički značajna razlika, kao kod vrednosti prokalcitonina. U tom smislu C-reaktivni protein, saglasno našim rezultatima, a i nekih drugih studija (139), ne može biti verodostojan parametar za ranu preoperativnu diferencijaciju neinfektivnog SIRS-a i intraabdominalne sepse.

Prokalcitonin je u ovoj studiji prepoznat kao bolji marker sepse i parametar kojim je omogućeno razdvajanje stepena inflamacije do generalizovane infekcije.

Multicentrična studija u kojoj su poređene vrednosti i dijagnostički značaj određivanja prokalcitonina i C-reaktivnog proteina kod sekundarnog peritonitisa, pokazala je, da su za razliku od C-reaktivnog proteina, povišene vrednosti prokalcitonina vrlo korisne i pouzdane u predviđanju komplikacija u vidu sepse (142). Takođe, kod bolesnika sa potvrđenom sepsom vrednosti C-reaktivnog proteina ostaju vrlo dugo povišene, dok prokalcitonin brže raste, ali brže i snižava svoju vrednost postoperativno u odnosu na C-reaktivni protein (143).

Poremećaj hemostaze u smislu smanjene funkcije prirodnih antikoagulanata, kao što su antitrombin III i (aktivirani) protein C (APC) kao posledica poremećene funkcije jetre i potrošne koagulopatije ključni su u patogenezi sepse. Pored svog antikoagulantnog delovanja antitrombin III poseduje i antiinflamatorna svojstva jer vezivanjem trombina doprinosi smanjenoj aktivaciji proinflamatornih ćelija (leukocita, trombocita, ćelija endotela). Takođe, i protein C, koji se aktivira trombinom, ima važne funkcije u modulaciji inflamatornog odgovora svojim antiinflamatornim i profibrinolitičkim delovanjem (109). Shodno navedenom, očekivano niže i statistički značajno različite vrednosti aktivnosti za antitrombin III i protein C dobijene su kod obe grupe pacijenata, i sa sepsom (C1) i sa dijagnozom SIRS (B1), u odnosu na zdrave osobe (A1), preoperativno i pet dana postoperativno. Kod pacijenata sa potvrđenom sepsom (C1) postoji i statistički značajna razlika u vrednostima aktivnosti antitrombina III i proteina C, i u odnosu na pacijente sa dijagnozom SIRS (B1), što ih čini korisnim biomarkerima sepse. Ova razlika je izračunata i postoji tokom svih pet dana postoperativnog lečenja. Za razlikovanje pacijenata sa sepsom (C1) i inflamatornim odgovorom (B1), aktivnost proteina C i preoperativno je statistički značajna, što još više uvećava značaj određivanja ovog markera. Kod pacijenata sa sepsom su izraženije niske vrednosti i svoj minimum beleže drugog postoperativnog dana (*Tabela XVI i Slika 15*).

Razumevanje osnovnih mehanizama zgrušavanja i poremećaja u sepsi važno je za razvoj terapijskih postupaka. Jedino se APC pokazao delotvornim, naime studija PROWESS pokazala je da 96-časovna kontinuirana infuzija drotrecogina-alfa-aktiviranog smanjuje smrtnost za 19,4% kod bolesnika s teškom sepsom (144).

Hemostaza se dodatno kontroliše fibrinolitičkim sistemom, u kojem je ključni enzim plazmin (čiji je proenzim plazminogen). Svoju proteoliznu aktivnost plazmin

ispoljava razlaganjem fibrina i fibrinogena pri čemu nastaju fibrin-fibrinogen degradacioni produkti (D-dimer). Inhibicija fibrinolitičkog sistema je važna komponenta u hemostatskom poremećaju koji nastaje tokom upalnih stanja. Početni akutni fibrinolitički odgovor na inflamatorno stanje je prolazno povećanje fibrinolitičke aktivnosti uz povećanu aktivaciju plazminogena, čemu sledi rast fibrinolitičkog inhibitora i značajno suzbijanje fibrinolitičke aktivnosti uz neadekvatno uklanjanje fibrinskog ugruška. Kod većine pacijenata sa sepsom, fibrinolitička aktivnost je potisnuta dok se aktivacija koagulacije nastavlja.

U grupi pacijenata sa sistemski inflamatornim odgovorom tj. SIRS (B1) vrednosti plazminogena i D-dimera su se tokom prvih pet dana postoperativnog lečenja statistički značajno razlikovale od vrednosti kod zdravih osoba. Isti rezultati su dobijeni i kod pacijenata sa potvrđenom sepsom (C1), gde su evidentne i statistički značajno niže vrednosti plazminogena ne samo u odnosu na zdrave osobe, već i na pacijente sa sistemski inflamatornim odgovorom tj. SIRS, i to četvrtog i petog dana postoperativno. Unutar grupe pacijenata sa potvrđenom sepsom statistički značajne razlike su zabeležene u odnosu na preoperativne vrednosti ili postoperativno prvog dana lečenja (*Tabela XVII*).

Vrednosti izabranih hematoloških parametara, koncentracije hemoglobina, leukocita i trombocita, su bile izmenjene kod ispitivanih osoba u stanju inflamacije (*Tabele XIX–XXI i Slika 23*). Kod obe grupa pacijenata, i sa sepsom (C1) i sa sistemski inflamatornim odgovorom tj. SIRS (B1), izračunate su statistički značajno više vrednosti koncentracija leukocita preoperativno (na dan prijema) kao i u danima postoperativnog lečenja (od prvog do petog dana) u odnosu na zdrave osobe. Pored toga evidentna je i statistički značajna razlika vrednosti unutar grupe pacijenata sa SIRS (B1) tj. grupe pacijenata sa sepsom (C1), nakon trećeg dana postoperativno u odnosu na preoperativne vrednosti, jer se vrednosti snižavaju ka referentnom opsegu.

Sepsa je svakako jedan od faktora rizika za trombocitopeniju i težina sepse je u korelaciji sa smanjenjem broja trombocita (145). Srednje vrednosti koncentracije trombocita kod svih pacijenta bile su u opsegu referentnih vrednosti, ali posmatrajući najniže izmerene vrednosti one su zabeležene kod pacijenata sa potvrđenom sepsom trećeg i četvrtog postoperativnog dana. Smanjenje broja trombocita može biti izazvano višestrukim i uglavnom međusobno povezanim faktorima. Mehanizam kojim se

trombocitopenija javlja u sepsi, obuhvata potrošnju i uništenje trombocita, hemodiluciju, sekvestraciju trombocita (na primer, u slezini) i njihovu smanjenu produkciju (146).

U stanju sepse hemoglobin se oslobađa iz eritrocita, dolazi do hemolize i oslobođene hem grupe iz hemoglobina postaju toksične, izazivaju smrt ćelije i dovode do disfunkcije organa. Vrednosti hemoglobina kod obe grupe pacijenata (B1 i C1) su bile statistički značajno niže u odnosu na grupu zdravih osoba i preoperativno i postoperativno. Unutar grupa, razlika statističke značajnosti uočena je u danima posle operativnog zahvata kada su vrednosti snižene u odnosu na preoperativnu vrednost.

Iako ovde navedeni hematološki parametri ne pokazuju veliku doslednost neophodnu za odlučivanje i postavljanje dijagnoze jer imaju manju specifičnost, njihovo određivanje je korisno u daljem praćenju lečenja i efekata terapijskih postupaka.

Da bi se procenilo u kojoj meri su ispitivani parametri povezani urađen je Spearmanov test korelacije. Na osnovu izračunatih koeficijenata korelacije može se zaključiti da postoji značajna korelacija između velikog broja određivani parametara, markera sepse. To se lako objašnjava činjenicom da su odabrani markeri vrlo važni faktori u funkcionisanju podsistema koji su međusobno povezani i zajedno čine uređen sistem kao što je ljudski organizam. U slučaju preoperativnih vrednosti, rezultati korelacije pokazuju da postoji, ne tako veliko, ali značajno slaganje između većine određivanih parametara (*Tabela XXIII*). Preoperativno prokalcitonin pokazuje zadovoljavajuću korelaciju samo sa brojem leukocita (statistički značajnu na nivou odlučivanja  $p < 0,05$ ), dok se prvog operativnog dana beleži korelacija i sa hemoglobinom, antitrombinom III i proteinom C. Ovako dobra povezanost nivoa biomarkera sepse evidentna je i u danima daljeg postoperativnog lečenja (*Tabele XXIV–XXVIII*). Iz dana u dan postoperativno, korelacija između vrednosti parametara je sve obimnija i značajnija.

### **5.1.1. Dijagnostički značaj biomarkera sepse kod pacijenata sa simptomima abdominalnog bola dužim od 24 sata**

Od 98 pacijenata primljenih na lečenje, njih 63, što predstavlja 64%, prilikom uzimanja anamneze dalo je podatak da su prve simptome i smetnje i abdominalne bolove osetili još 24 sata ranije. Ovaj podatak uzet je kao kriterijum na osnovu čega je posebno obrađena ova grupa pacijenata. Od 63 bolesnika, 41 bolesnik je razvio sepsu (65%), a preostalih 22 (35%) pacijenata su lečeni pod dijagnozom sistemskog inflamatornog odgovora (SIRS). Bolesnici iz ove dve grupe bili su označeni kao grupa S24 (sa sepsom) i SIRS24, zavisno od svog stanja. Poznato je da vrednost prokalcitonina raste uporedo sa razvojem inflamatorne reakcije (147). Srednja vrednost prokalcitonina, preoperativno, kod bolesnika koji su razvili sepsu (S24) je bila daleko iznad referentnog opsega, tačnije 3,30 ng/mL, dok je kod pacijenata iz grupe SIRS24 ona iznosila 0,35 ng/mL, što je u opsegu normalnih vrednosti ( $< 0,5$  ng/mL). Razlika između ovih vrednosti prokalcitonina je statistički značajna, gde je  $p < 0,0001$ , što je prokalcitonin svrstalo u red korisnih i validnih parametara za postavljanje dijagnoze sepse (*Tabela XXX*).

Za razliku od prokalcitonina, srednje vrednosti C-reaktivnog proteina (CRP) kod ove dve grupe ispitanika, iako znatno iznad referentnog opsega nisu pokazale međusobno značajnu razliku ( $p=0,185$ ). Kod grupe SIRS24 srednja vrednost za CRP iznosila je 143,4 mg/ L, a kod S24 166,6 mg/ L (*Tabela XXX*). I pored velikog kliničkog značaja ovog parametra, u ovoj situaciji zabeležen je nedostatak u smislu smanjene specifičnosti da bi se istakla razlika između sepse i sistemskog inflamatornog odgovora.

Od ostalih određivanih parametara svojim rezultatima, u ovom delu, izdvojili su se i parametri hemostaze, antitrombin III i protein C, još jednom potvrdivši svoj klinički značaj. U grupi pacijenata sa sepsom (S24) srednja vrednost za antitrombin III od 76,1 % bila je smanjena i ispod donje granice referentnog intervala, dok je kod SIRS24 iznosila 87,8% i bila u opsegu normalnih vrednosti. Izračunata statistička razlika bila je na samoj graničnoj vrednosti ( $p=0,06$ ), ali i pored toga je potvrđena dijagnostička korisnost ovog parametra kod sumnje na sepsu. Kod proteina C smo dobili vrlo slične rezultate: u grupi bolesnika sa sepsom (S24), srednja vrednost je bila na donjoj granici referentnih vrednosti tj. 75,9%, a kod grupe SIRS24 vrednost je iznosila 94,6%. Razlika

je evidentna i statistički značajna ( $p=0,008$ ), što uvećava značajnost određivanja ovog parametra pri postavljanju dijagnoze sepse. Analizirajući vrednosti ostalih određivanih parametara hemostaze, plazminogena i D-dimera i hematoloških parametara, hemoglobina, broja trombocita i leukocita, nisu dobijene statistički značajne razlike ( $p>0,05$ ) poređenjem grupe bolesnika sa sepsom (S24) i sistemskim inflamatornim odgovorom (SIRS24) (*Tabela XXX*).

### **5.1.2. Dijagnostička vrednost određivanih parametara kao biomarkera sepse u IAI kod ispitanika prve studije**

Dijagnostička tačnost određivanih parametara kao biomarkera sepse u intraabdominalnim infekcijama ispitana je ROC analizom. Tačnost je osnovna karakteristika testa koja meri njegovu sposobnost da izvrši razdvajanje između dva stanja (u ovom radu infektivnog (sepsa) i neinfektivnog stanja). Tačnost je najbolje opisana vrednošću površine ispod ROC krive (AUC), koja procenjuje tačnost pri svim nivoima odlučivanja i nezavisna je od prevalencije. Prevalencija je frekvencija pacijenata sa određenom bolešću u okviru grupe koja se ispituje (125).

ROC analizom obrađene su vrednosti parametara prokalcitonina, C-reaktivnog proteina, antitrombina III i proteina C, pri razlikovanju grupa bolesnika sa sepsom i sindromom sistemskog inflamatornog odgovora.

Kod bolesnika sa sepsom (C1) i sindromom sistemskog inflamatornog odgovora (B1) izračunate vrednosti za ROC AUC su bile sledeće: za prokalcitonin 0,740, za CRP 0,495, za antitrombin III 0,570 i za protein C 0,610 (*Tabela XXXI* i *Slika 24*). S obzirom da AUC daje informaciju o tome koliko je ROC kriva blizu najboljoj mogućnosti ( $AUC = 1$ ), prokalcitonin je pokazao zadovoljavajuću dijagnostičku tačnost kao marker sepse u intraabdominalnim infekcijama. Izračunata "cutt-off" vrednost pri razlikovanju grupe bolesnika sa sepsom (C1) i sindromom sistemskog inflamatornog odgovora (B1) za prokalcitonin iznosila je 1,1 ng/mL. Odgovarajuće vrednosti za dijagnostičku osetljivost (broj stvarno pozitivnih kod bolesnika sa sepsom) pri navedenoj "cutt-off" vrednosti iznosila je 72,4% i dijagnostičku specifičnost (broj stvarno negativnih kod bolesnika sa SIRS) 62,5% (*Tabela XXXII*). Klinička studija (148) u kojoj je uveden prokalcitoninski

test u dijagnozi sepse pokazala je istu vrednost od 1,1 ng/mL, pa iako nalaz nije bio visoko specifičan, usmerio je lekare na donošenje kliničke odluke u pristupu lečenja bolesnika.

Kriterijum da su kod određene grupe pacijenata simptomi bolesti, pre svih abdominalni bol, trajali duže od 24 sata, upotrebljen je da se ispita dijagnostička vrednost ovih parametara i u ovoj situaciji, s obzirom da ih je bilo više od polovine, njih 63 (64%) od ukupnog broja od 98 primljenih pacijenata. Pri razlikovanju grupe bolesnika sa sistemskim inflamatornim odgovorom i sa sepsom, koji su primljeni na lečenje sa simptomima dužim od 24 sata, izračunate vrednosti za ROC AUC su bile sledeće: za prokalcitonin 0,869, za CRP 0,602, za antitrombin III 0,644 i za protein C 0,706 (*Tabela XXXI* i *Slika 25*). U poređnom analizom grafika, ROC krive (*Slika 24* i *Slika 25*) za vrednosti parametara kod bolesnika sa simptomima dužim od 24 sata se nalaze iznad i na levo od dobijenih ROC krivih za razlikovanje grupa bolesnika sa sepsom (C1) i sindromom sistemskog inflamatornog odgovora (B1). Položaj krivih ukazuje na nešto veću dijagnostičku tačnost.

Izračunata "cutt-off" vrednost pri razlikovanju grupe bolesnika sa sistemskim inflamatornim odgovorom i sa sepsom, koji su primljeni na lečenje sa simptomima dužim od 24 sata, za prokalcitonin iznosila je isto 1,1 ng/mL. Odgovarajuća vrednost za dijagnostičku osetljivost pri navedenoj "cutt-off" vrednosti iznosila je 82,9% i za dijagnostičku specifičnost 77,3% (*Tabela XXXII*).

Od početka analize dobijenih podataka, prokalcitonin se izdvojio kao najznačajniji marker u dijagnostici abdominalne sepse, nego bilo koji drugi parametar. Vrednosti koncentracije prokalcitonina kod pacijenata sa sepsom bile su povišene dok su kod neseptičnih pacijenata ostale u granicama referentnih intervala. "Cutt-off" vrednost u dijagnozi sepse može se razlikovati zavisno od metode koja se koristi za određivanje kao i od ispitivane grupe bolesnika uprkos nastojanjima da grupa bude što homogenija po svojim unapred određenim karakteristikama. "Cutt-off" vrednost od 1,1 ng/mL za preoperativnu dijagnozu abdominalne sepse pokazala je zadovoljavajuću osetljivost (72,4%) i manju specifičnost (62,5%). Povećanjem "cutt-off" vrednosti povećali bi i specifičnost, ali promenili i osetljivost. S obzirom na nemogućnost mikrobiološkog nalaza u tako kratkom vremenskom intervalu ova vrednost prokalcitonina korišćena je kao nivo odluke za dalji tok lečenja.

Mnoge studije su pokazale superiornost prokalcitonina u dijagnostici sepse i njegovoj korelaciji sa stepenom težine stanja (148, 149). Osetljivost za prokalcitonin raste sa vremenom od nastanka sepse (149, 150). Dobijeni rezultati su u potpunom skladu sa ovom tvrdnjom. Analizom rezultata prikupljenih od pacijenata koji su imali abdominalni bol najmanje 24 sata pre prijema na lečenje zaključeno je sledeće: vrednost prokalcitonina u grupi bolesnika koji su razvili sepsu koncentracija prokalcitonina bila je 3,30 ng/mL, dok je kod bolesnika sa sistemskim inflamatornim odgovorom vrednost prokalcitonina bila 0,35 ng/mL. Osim toga vrednost od 3,30 ng/mL, bila je veća i od srednje vrednosti koncentracija prokalcitonina izračunate na celokupnu grupu pacijenata sa sepsom (grupa C1, N=58) koja je iznosila 2,32 ng/mL. "Cutt-off" vrednost od 1,1 ng/mL koja je dobijena i kod ROC analize vrednosti prokalcitonina kod razlikovanja bolesnika sa simptomima dužim od 24 sata, pokazala je bolju osetljivost (82,9%) i bolju specifičnost (77,3%). Sveukupnim ispitivanjem je potvrđeno da je prokalcitonin dobar pokazatelj razvoja intaraabdominalne sepse.

## **5.2. Presepsin, prokalcitonin i drugi markeri teške sistemske bakterijske infekcije kod ispitanika druge studije**

Sepsa je kliničko ispoljavanje opšte inflamatorne reakcije organizma na infekciju. Nakon prodora mikroorganizma dolazi do pokretanja niza imunoloških mehanizama koji obično uspevaju da potisnu infekciju. Međutim ako su ovi mehanizmi nadjačani, homeostaza će biti poremećena i nastaje stanje sepse. Dalje napredovanje vodi organizam u stanje teške sepse i septičnog šoka, koji podrazumevaju hipotenziju i otkazivanje pojedinih organa (151). Postepeni razvoj sepse u septični šok u velikoj meri povećava rizik od fatalnog ishoda (152). Rano otkrivena sepsa je obično reverzibilna, dok pacijenti u stanju šoka i uprkos agresivnoj terapiji imaju letalan ishod. Veliki broj studija koje su posvećene boljem preživljavanju bolesnika u sepsi zasniva se na obezbeđenju rane i pravovremene dijagnoze i daljem lečenju (131, 132).

Činjenicu da dužina trajanja simptoma bitno utiče na tok i ishod lečenja ispitivali smo i potvrdili tokom prve, a primenili u drugoj studiji. U drugoj studiji kod



svih bolesnika hirurško lečenje započeto je na vreme da nije bilo dovoljno vremena da se mikrobiološki uzročnik namnoži i izazove još jači toksični efekat (6 – 24 sata).

Odgovor organizma u infekciji podrazumeva oslobađanje u cirkulaciju velikog broja biomarkera, što navodi na pomisao da se upravo oni mogu iskoristiti kao markeri sepse i težine stanja u kome se organizam nalazi. Laboratorijski parametri kao što je koncentracija leukocita i C-reaktivnog proteina kao i brzina sedimentacije eritrocita su već dugi niz godina parametri za rutinsko određivanje u slučaju infekcije. Kao zlatni standard, i dalje se smatra mikrobiološki nalaz, ali je za njega potrebno određeno vreme kojim kliničar ne raspolaže jer mora vrlo brzo da odreaguje i započne lečenje (153, 154). Utoliko više je potreba za brzim, ali korisnim testovima i parametrima veća. U poslednjih nekoliko godina, prokalcitonin je potvrdio svoju ulogu markera sepse, što je u kombinaciji sa već rutinskim parametrima omogućilo brzu i pravovremenu dijagnostiku infektivnih stanja (137, 138, 147). Međutim, sepsa je još uvek veliko polje istraživanja, naročito u domenu novih biomarkera. Istraživanja novijeg datuma predlažu i opisuju korisnost određivanja presepsina u stanjima infekcije (155, 156), te su u ovom radu određivane i analizirane vrednosti ovog parametra kod bolesnika sa intraabdominalnim infekcijama.

Presepsin je glikoprotein, fragment CD14 molekule, koji kao receptor ima veliki afinitet za lipolosaharid (LPS). Dejstvom plazma proteaze stvara se rastvorljiva frakcija tzv. sCD14-ST koji nazivamo presepsin i čija se koncentracija znatno povećava u krvi bolesnika sa sepsom (117, 122). Jedan od naših ciljeva u ovom istraživanju je bio i da se ispita i dokaže dijagnostički značaj presepsina kod naših ispitanika.

U našoj studiji merili smo nivoe presepsina kod zdravih osoba (grupa A2, N=70), bolesnika sa dijagnozom SIRS (grupa B2, N=30) i sa sepsom (grupa C2, N=30), preoperativno. U grupi zdravih osoba, kako je bilo i očekivano (121), preoperativne vrednosti su bile u referentnom opsegu pa je srednja izmerena vrednost iznosila 258,7 pg/mL. Kod bolesnika sa SIRS, srednja vrednost je bila 430,0 pg/mL, a kod bolesnika sa sepsom 1508,3 pg/mL. Već iz navedenih vrednosti evidentna je razlika, koja je i statistički potvrđena. Naime, preoperativne vrednosti presepsina kod grupe bolesnika sa SIRS (B2) su statistički značajno više u odnosu na zdrave osobe (A2). Takođe, kod preoperativnih vrednosti bolesnika sa sepsom (C2) postoji statistički značajna razlika u odnosu na vrednosti zdravih osoba, ali i na preoperativne vrednosti bolesnika sa SIRS.

Statistički značajna razlika utvrđena je MannWhitney U testom, gde je p bio manji od 0,0001 (*Tabela XXXIII i Slika 26*).

Da bi pokazali kliničku vrednost presepsina u različitim stadijumima infekcije izvršeno je poređenje vrednosti izmerenih kod zdravih osoba, bolesnika sa sistemski inflamatornim odgovorom i sepsom. Kod bolesnika sa sepsom (grupa C2) razlikovali smo bolesnike sa težim stadijumom tj. teškom sepsom i septičnim šokom i bolesnike sa sepsom. Za diferenciranje stadijuma sepse koristili smo kriterijume iz dokumenta "*Definitions for sepsis and organ failure and guidelines for the use of innovative therapies in sepsis*" (11). Od ukupnog broja od 30 pacijenata njih 5 je razvilo stanje teške sepse, a 5 septičnog šoka. Preoperativne vrednosti koncentracija presepsina ovih bolesnika smo izdvojili od preostale grupe bolesnika sa sepsom i statistički obradili. Srednja vrednost preoperativnih koncentracija presepsina kod bolesnika sa sepsom (N=30) iznosila je 1508,3 pg/mL. Kada smo grupu podelili, izračunate su srednje vrednosti koncentracija presepsina i one su iznosile 1810,3 pg/mL kod teških oblika sepse tj. 1357,0 pg/mL kod sepse. Izdvajanjem težih slučajeva srednja vrednost koncentracija presepsina je snižena što je bilo i očekivano, jer su bolesnici sa teškim oblikom sepse imali i veće vrednosti za presepsin. Površena je i statistički značajna razlika bolesnika sa sepsom i teškom sepsom ( $p < 0,05$ ) u odnosu na zdrave osobe i bolesnike sa sistemski inflamatornim odgovorom (SIRS). Osim toga, statistički značajna razlika ( $p < 0,05$ ) utvrđena je kod bolesnika sa teškom sepsom u odnosu na bolesnike sa sepsom (*Slika 42*). Ovim rezultatima presepsin se dokazao i kao jako dobar pokazatelj težine stanja i stepena oštećenja organa koje podrazumevaju stanja teške sepse i septičnog šoka.

S obzirom na sve složenije mogućnosti intezivne terapije pri lečenju sepse javila se i potreba za što objektivnijim prikazom opšteg stanja bolesnika, što je omogućeno primenom APACHE II sistema skorovanja. APACHE (*Acute Physiology And Chronic Health Evaluation*) sistem pomoću matematičke formule može dati podatke o proceni stanja bolesnika kao i ishoda lečenja, a zasniva se na podacima koji su lako merljivi. Praćeni su svi neophodni parametri kod bolesnika sa sepsom (grupa C2) i izračunate su vrednosti za APACHE II skor (*Tabela XXXIX*) koji su poslužile kao indeks težine bolesti. Najveća srednja vrednost za APACHE II skor izračunata je kod bolesnika u septičnom šoku i iznosila je 24,8 i bila je statistički značajna ( $p < 0,0001$ ) u odnosu na

srednje vrednosti kod bolesnika sa teškom sepsom (19,2) i sa sepsom (10,1). APACHE II skor pripada grupi skorova rizika pomoću kojih se procenjuje verovatnoća pojave negativnog ishoda (35). To se i u ovom istraživanju pokazalo apsolutno tačno, jer su bolesnici sa najvećim APACHE II skorom imali letalan ishod.

Literaturni podaci iz obavljenih istraživanja za presepsin kao marker sepse novijeg doba pokazali su veliko i značajno slaganje vrednosti presepsina i APACHE II skora (117, 122, 155, 156). Da bi potvrdili kliničku vrednost presepsina i u ovom segmentu istraživanja najpre su izračunate vrednosti APACHE II skora bolesnika sa sepsom koje su podeljene u tri grupe prema opsegu vrednosti (0–10, 11–20 i >21) i zatim upoređene sa izmerenim vrednostima koncentracija presepsina kod bolesnika sa sepsom, nosioca tih vrednosti. Između grupa utvrđena je statistički značajna razlika kao i statistički značajna korelacija (*Slika 43*), čime je potvrđena korisnost presepsina i kao markera težine i ishoda septičnog stanja.

Određivane su i preoperativne vrednosti za parametar prokalcitonin u sve tri grupe ispitanika. Kod zdravih osoba (grupa A2) izmerene su koncentracije čija je srednja vrednost iznosila 0,195 ng/mL, što je bilo jako slično sa dobijenom vrednosti (od 0,21 ng/mL) u grupi zdravih osoba iz prve studije (grupa A1). Bolesnici sa sistemski inflamatornim odgovorom (grupa B2) imali su, pre operacije, srednju vrednost koncentracija 0,334 ng/mL, što je takođe vrednost vrlo bliska vrednosti (od 0,45 ng/mL) koju su imali preoperativno bolesnici sa SIRS iz prve studije (grupa B1). Zaključeno je da su u obe studije bolesnici sa SIRS zadržali nivo prokalcitonina u opsegu referentnih vrednosti (< 0,5 ng/mL). I pored toga, u grupi B2, bolesnika sa SIRS, ustanovljena je statistički značajna razlika ( $p < 0,0001$ ) u odnosu na grupu zdravih osoba. U grupi bolesnika sa sepsom (grupa C2), preoperativno, srednja vrednost prokalcitonina iznosila je 4,479 ng/mL, što je dva puta veća vrednost koja je bila kod bolesnika sa sepsom iz prve studije (grupa C1). Razlog za ovo može biti bolja selekcija ispitanika i veći stepen težine njihovog stanja. Kako je bilo i očekivano Mann Whitney U testom utvrđena je statistički značajna razlika ( $p < 0,0001$ ) između preoperativnih vrednosti za prokalcitonin kod bolesnika sa sepsom (C2) u odnosu na zdrave osobe (A2) i bolesnike sa sistemski inflamatornim odgovorom (B2) (*Tabela XXXIII* i *Slika 26*).

Studija je uključila i određivanje vrednosti LBP i IL-6, sa ciljem da se pokaže njihova klinička vrednost u stanju sepse. Vrednosti su određivane kod sve tri grupe ispitanika i pokazale su očekivane rezultate (157). Izmerene su koncentracije LBP, preoperativno, i izračunate srednje vrednosti koje su iznosile: u grupi zdravih 3,81  $\mu\text{g/mL}$ , kod bolesnika sa sistemski inflamatornim odgovorom 21,14  $\mu\text{g/mL}$  i kod bolesnika sa sepsom 38,04  $\mu\text{g/mL}$ . Kod obe grupe bolesnika (SIRS i sepsa) vrednosti su bile iznad referentnog opsega. Ispitivanjem razlika između grupa potvrđena je statistički značajna razlika ( $p < 0,0001$ ) obe grupe bolesnika (B2 i C2) u odnosu na zdrave osobe i ono što je još važnije između grupe bolesnika sa sepsom (C2) u odnosu na bolesnike sa sistemski inflamatornim odgovorom (B2). Vrednosti izmerenih koncentracija interleukina 6 (IL-6) su već pokazale svu značajnost određivanja ovog parametra u infektivnim stanjima. Kod zdravih osoba srednja vrednost izmerenih koncentracija iznosila je 2,29  $\text{pg/mL}$  i bila je u opsegu referentnih vrednosti. Kod bolesnika sa sistemski inflamatornim odgovorom (B2), preoperativno, izmerene koncentracije su bile mnogo veće pa je srednja vrednost iznosila 99,29  $\text{pg/mL}$  i dokazana je statistički značajna razlika ( $p < 0,001$ ) u odnosu na grupu zdravih osoba. Kod bolesnika sa sepsom (C2), preoperativno, izmerene koncentracije su bile još veće, sa srednjom vrednošću od 356,22  $\text{pg/mL}$ , što je bilo statistički značajno ( $p < 0,0001$ ) i u odnosu na grupu zdravih i na grupu bolesnika sa sistemski inflamatornim odgovorom (B2) (*Tabela XXXIII i Slika 27*). Akutni medijator inflamacije, interleukin 6, i protein koji vezuje lipopolisaharid uzročnika, LBP, svojim povišenim vrednostima pokazali su da su dobri markeri inflamacije i težine oboljenja (158).

C-reaktivni protein i broj leukocita pripadaju grupi parametara koji se već duži niz godina koriste u dijagnostici akutne bakterijske infekcije i praćenju terapije, ali u kombinaciji sa drugim biomarkerima (139), što smo i mi uradili i dobili očekivane rezultate. Srednja vrednost izmerenih koncentracija C-reaktivnog proteina kod zdravih osoba (grupa A2) bila je u opsegu normalnih vrednosti i iznosila je 3,8  $\text{mg/L}$ . Bolesnici sa sistemski inflamatornim odgovorom (grupa B2) imali su preoperativne koncentracije C-reaktivnog proteina, čija je srednja vrednost izračunata i iznosila je 67,0  $\text{mg/L}$ , što je bilo statistički značajno više u odnosu na vrednosti kod zdravih osoba ( $p < 0,0001$ ). Bolesnici sa sepsom, preoperativno, imali su izraženije povećanje vrednosti koncentracija C-reaktivnog proteina pa je izračunata srednja vrednost od 217,8  $\text{mg/L}$ ,

bila dovoljna za statistički značajnu razliku ( $p < 0,001$ ) ne samo u odnosu na grupu zdravih već i na grupu bolesnika sa sistemski inflamatornim odgovorom (*Tabela XXXIII i Slika 28*). Prokalcitonin i C-reaktivni protein potvrdili su svoju korisnost pri razlikovanju bolesnika sa infekcijom od bolesnika sa inflamatornim odgovorom, i značajnost kada je u pitanju razlikovanje bakterijske od npr. virusne infekcije. Ove zaključke navode i Esteban i sar. (159), s tim što su oni u svojoj studiji, pored navedenog, zaključili da ovi parametri ipak ne mogu biti upotrebljeni i dovoljni kada je jedini simptom povišena telesna temperatura. Neophodno je postojanje i drugih kliničkih znakova.

Pored broja leukocita u našoj studiji hteli smo da ispitamo i zastupljenost segmentiranih granulocita (neutrofila) u leukocitarnoj formuli kod naših ispitanika, znajući da su ove ćelije nosioci urođenog imunog odgovora (160). Broj leukocita i segmentiranih granulocita kao i prisustvo nezrelih granulocita su jednostavne i pouzdane mere za otkrivanje i praćenje upale, ali oni nemaju dijagnostičku korist jer su nespecifični (161). U grupi zdravih osoba (A2) srednja vrednost za koncentraciju leukocita iznosila je  $8,1 \times 10^9/L$ , a udeo segmentiranih granulocita je 59,8%, što je za oba parametra u referentnom opsegu. Kod bolesnika sa sistemski inflamatornim odgovorom (B2), preoperativno, vrednosti su bile malo iznad gornje granice referentnog intervala,  $11,21 \times 10^9/L$  za leukocite tj. 76,8% za segmentirane granulocite, i utvrđena je statistički značajna razlika u odnosu na grupu zdravih osoba. Bolesnici sa sepsom (C2) imali su izraženije povećanje vrednosti od ostalih, pa je kod preoperativnih vrednosti leukocita izračunata srednja vrednost  $15,28 \times 10^9/L$  i udeo segmentiranih granulocita 85,3% (*Tabele XXXIII–XXXIV i Slike 28–29*). I u ovom slučaju postojala je statistički značajna razlika u odnosu na grupu zdravih (A2), ali i bolesnika sa SIRS (B2). Kod većine bolesnika sa sepsom postojao je i efekat tzv. "skretanja u levo" i pojava nezrelih granulocita u cirkulaciji. Posebno se izdvaja slučaj bolesnika u sepsi sa izraženom leukopenijom. Ovakav nalaz ukazuje na snažno kretanje i izlivanje leukocita u purulentni peritonealni sadržaj. Ovakav patološki put je izuzetno opasan jer je oslabljena opšta otpornost organizma.

Brzina sedimentacije eritrocita pripada grupi rutinskih i jednostavnih laboratorijskih testova i zavisi od većeg broja faktora, pre svih od proteina plazme, te se sa njihovim porastom u stanju inflamacije, povećava i njena vrednost. Do porasta

sedimentacije eritrocita dolazi 24 do 48 sati nakon akutne inflamatorne reakcije i u proseku traje sledećih 7 dana, a nekad i duže, zavisno od težine stanja organizma. U tom smislu vrednosti koje smo mi dobili u ispitivanju imale su za cilj praćenje tretmana lečenja. Izmerene preoperativne vrednosti bile su statistički značajno više kod bolesnika sa sepsom nego kod bolesnika sa sistemskim inflamatornim odgovorom i kod zdravih osoba (*Tabela XXXIV* i *Slika 29*). Potvrdu korisnosti određivanja koncentracija prokalcitonina, C-reaktivnog proteina, broja leukocita i brzine sedimentacije kod bolesnika sa peritonitisom pokazali su u svom ispitivanju Yilmaz i sar. (162) kojim je dokazana velika osetljivost (100%) za C-reaktivni protein i brzinu sedimentacije eritrocita, ali uz malu specifičnost (55 tj. 10 %), dok je prokalcitonin imao specifičnost 100%, a osetljivost 70%, pri *cutt-off* vrednosti od 0,5 µg/mL. Leukociti su imali očekivanu osetljivost kao i specifičnost od 60%.

Trombocitopenija i snižene vrednosti hemoglobina kod pacijenata sa sepsom u prvoj studiji pokazale su se i kod ispitanika druge studije. Ova smanjenja nisu bila ispod granice referentnog opsega, osim u pojedinačnim slučajevima, tako da je statistički značajna razlika ( $p < 0,05$ ) postojala samo prema grupi zdravih osoba (*Tabela XXXIV* i *Slika 30*). Opšte zapažanje je da broj trombocita raste nakon uklanjanja septičnog žarišta. Potvrđena je nedoslednost ovih parametara za razlikovanje neinfektivnog od septičnog stanja, ali je njihovo određivanje korisno u cilju održavanja kardiovaskularnog i hemostaznog sistema. Pojava teških trombocitopenija nađena je kod bolesnika sa gram negativnom infekcijom. Ekstremno niske vrednosti zabeležene su kod dva bolesnika koja su imala letalan ishod. Razlog ovako izrazite trombocitopenije je toksično delovanje endotoksina i efekat agregacije na oštećenje bazalne membrane.

Upala i hemostaza su tesno međusobno povezana dva patofiziološka procesa koji značajno utiču jedan na drugi. U tom dvosmernom odnosu, upala dovodi do aktivacije hemostatskog sistema koji zauzvrat značajno utiče na upalne aktivnosti (55, 163). Upala pomera hemostatsku aktivnost prema prokoagulantnom stanju od sposobnosti proinflamatornih medijatora da aktiviraju sistem koagulacije i da inhibiraju antikoagulantnu i fibrinolitičku aktivnost. Otuda antikoagulantna funkcija antitrombina III i proteina C biva narušena i njihova aktivnost smanjena. Preoperativne vrednosti aktivnosti antitrombina III i proteina C kod ispitivanih bolesnika bile su statistički

značajno niže u odnosu na grupu zdravih osoba ( $p < 0,05$ ), ali razlika između bolesnika sa sepsom i sistemskim inflamatornim odgovorom nije potvrđena. Vrednosti aktivnosti za antitrombin III i protein C ispod donje granice referentnog intervala zabeležena je kod pojedinačnih slučajeva, tačnije kod bolesnika u stanju septičkog šoka (*Tabela XXXIV i Slika 31*). Sveukupno može se zaključiti da u drugoj studiji nije u potpunosti potvrđena visoka korisnost određivanja ovih parametara kao biomarkera sepse iz prve studije, ali svakako ostaje njihov značaj određivanja u smislu praćenja očuvanosti i funkcionalnosti hemostaznog sistema.

Stanje sepse izaziva velike metaboličke promene u organizmu pa su ova određivanja obuhvatila i neke rutinske, ali vrlo važne biohemijske parametre za procenu stanja organizma u infekciji. Određene su koncentracije ukupnih proteina, albumina, kalijuma i neorganskog fosfora, iz sledećih razloga: povećani katabolički procesi uzrokovani inflamacijom, a smanjena mogućnost sinteze, dovode do smanjenja koncentracije ukupnih proteina i albumina (164). Kalijum je najvažniji intracelularni katjon koji učestvuje i u regulaciji kontrakcija srca i srčanog ritma. Hipokalijemija dijagnostikovana preoperativnog dana posledica je ishemičnog delovanja bakterijskih toksina i masovnog propadanja ćelija u organizmu (165). Hipofosfatemija je vrlo česta kod pacijenata sa teškim infekcijama kao što je sepsa, naročito ako je uzročnik gram-negativna bakterija. Uslovi hipofosfatemije negativno utiču na funkciju granulocita u smislu smanjenja fagocitne i baktericidne aktivnosti (166). Preoperativne vrednosti koncentracija proteina, albumina, kalijuma i neorganskog fosfora kod naših ispitivanih bolesnika bile su statistički značajno niže u odnosu na grupu zdravih osoba ( $p < 0,05$ ), ali razlika između bolesnika sa sepsom i sistemskim inflamatornim odgovorom nije potvrđena. Vrednosti koncentracija za ove biohemijske parametre ispod donje granice referentnog intervala zabeležene su kod pojedinačnih slučajeva, tačnije kod bolesnika u stanju septičnog šoka (*Tabela XXXV i Slike 32–33*). Iako nije potvrđena značajnost u domenu dijagnoze sepse, određivanje ovih parametara značajno je sa aspekta praćenja primenjenih terapijskih procedura u cilju normalizacije osmolarnosti i elektrolitnog balansa u organizmu.

Svi napred navedeni parametri određivani su kod bolesnika sa sepsom ne samo preoperativno, sa ciljem utvrđivanja njihove dijagnostičke značajnosti, već i prvog, trećeg i petog dana postoperativno, da bi se pokazala njihova značajnost u oceni

efektivnosti terapijskih procedura. U danima nakon operativnog zahvata povišene ili smanjene preoperativne vrednosti određivanih parametara, prema svojoj dinamici, a zavisno od vremena poluživota i nove produkcije, napreduju ka svojim utvrđenim referentnim intervalima (*Tabele XXXVI–XXXVIII*).

Vrednosti presepsina izmerenih kod bolesnika sa sepsom, postoperativno, smanjivale su se u vremenu i to tako da je utvrđena i statistički značajna razlika ( $p < 0,05$ ) u odnosu na preoperativnu vrednost (*Tabela XXXVI i Slika 34*). Najveća izmerena vrednost iznosila je 4223 pg/mL i izmerena je preoperativno kod jednog bolesnika sa sepsom, koji je razvio i septični šok i imao letalan ishod. Primetno je da je interval izmerenih vrednosti petog dana lečenja bio od 964 do 1278 pg/mL, a prethodnih dana je taj raspon bio mnogo veći npr. trećeg dana od 257 do 2838 pg/mL. Objašnjenje leži u podatku da je veći deo ispitanih bolesnika otpušten na kućnu negu i lečenje, dok su u bolnici zadržani oni najteži, ali ipak dobro stabilizovani bolesnici. Literaturni podaci (115) ukazuju na postojanje korelacije presepsina sa ostalim markerima sepse. U našoj studiji presepsin, kao novi marker u ovoj grupi određivanih parametara, pokazao je značajnu korelaciju sa prokalcitoninom preoperativno i prvog dana postoperativno, kao i petog dana kada je koeficijent korelacije iznosio 0,975. Koncentracije presepsina su bile u značajnoj negativnoj korelaciji sa vrednostima proteina C, preoperativno kao i prvog i trećeg dana postoperativnog lečenja (*Tabele XXXIX, XXXXI i XXXXIII*).

Vrednosti prokalcitonina u danima nakon operativnog zahvata su imale trend smanjivanja (na granici statističke značajnosti) što je bilo i očekivano, shodno primenjenoj antibiotskoj terapiji (*Tabela XXXVI i Slika 34*). Iako, smanjenje vrednosti prokalcitonina u postoperativnom periodu nije imalo statističku značajnost ono je bilo evidentno. Primenjena antibiotska terapija pokazala je svoju efikasnost kod lečenih bolesnika sa sepsom. Naša ispitivanja kao i neki literaturni podaci (167) pokazali su da serijsko određivanje prokalcitonina povećava dijagnostičku pouzdanost i svrsishodnost sprovedenog lečenja. Takođe, kao i u studiji Karlsona i saradnika (168) i naši podaci pokazali su da je pad vrednosti prokalcitonina u prvih 48 do 72 sata kod bolesnika sa teškom sepsom povećao verovatnoću preživljavanja. Kod bolesnika kod kojih nije došlo do smanjivanja ovo je bio znak za promenu terapije, što je i učinjeno. Međutim, s obzirom da se prokalcitonin eliminiše iz organizma preko bubrega, nesmanjivanje



njegovih koncentracije kod pojedinih bolesnika sa sepsom može biti rezultat renalne insuficijencije koja se javlja kao komplikacije teške sepse/septičnog šoka, što su potvrdile i neke studije (168, 169). Vrednosti prokalcitonina postoperativno ostale su povišene i kod bolesnika u stanju teške sepse/septičnog šoka čime je potvrđeno da postoji korelacija između razvoja MODS i koncentracija ovog parametra (142).

Kod bolesnika sa potvrđenom sepsom (C1) iz prvog dela istraživanja izmerene su mnogo veće postoperativne vrednosti prokalcitonina nego kod bolesnika sa sepsom (C2) iz drugog dela ispitivanja. Razlozi mogu biti višestruki: veće iskustvo kliničara, pravovremena dijagnoza i primenjena savremena antibiotska terapija šireg spektra delovanja i jačine kao i stepen težine stanja na prijemu kod pojedinih osoba. Kod vrednosti koncentracija prokalcitonina Spearmanovi koeficijenti korelacije pokazali su statistički značajnu korelaciju sa većim brojem parametara naročito na dan prijema, dakle preoperativno. Statistički značajnu pozitivnu korelaciju prokalcitonin, preoperativno, ima sa vrednostima presepsina, interleukina 6, LBP i C-reaktivnog proteina, a negativnu sa vrednostima albumina, antitrombina III i proteina C. Statistički značajnu korelaciju ( $p < 0,01$ ) sa parametrima hemostaze prokalcitonin pokazuje u i danima postoperativnog lečenja. Ovaj podatak je u potpunoj saglasnosti sa zaključkom koji smo imali i u prvoj studiji. Dobijena značajna korelacija preoperativnih vrednosti prokalcitonina i C-reaktivnog proteina gde koeficijent korelacije iznosi 0,511 ( $p < 0,01$ ) u saglasnosti je sa rezultatima koje su dobili u svojoj studiji Esteban i sar. (159) gde je koeficijent korelacije bio 0,480 ( $p < 0,01$ ).

Preoperativno izmerene visoke koncentracije C-reaktivnog proteina, broja leukocita i segmentisanih granulocita i u posmatranom postoperativnom periodu ostaju visoke i iznad gornje granice referentnog intervala (*Tabele XXXVI–XXXVII* i *Slike 36–37*). Razlika maksimalnih i minimalnih izmerenih vrednosti indirektno ukazuje na intenzitet i dužinu inflamatorne reakcije. Koncentracije C-reaktivnog proteina su bile, preoperativno, u statistički značajnoj korelaciji ( $p < 0,01$ ) sa vrednostima LBP, prokalcitonina, segmentisanih granulocita i brzine sedimentacije (pozitivna korelacija) dok je sa vrednostima antitrombina III, proteina C, ukupnih proteina i albumina ostvarena statistički značajna ( $p < 0,01$ ) negativna korelacija. Kako je bilo i očekivano, broj leukocita je bio u značajnoj pozitivnoj korelaciji sa vrednostima segmentisanih granulocita, a oni sa vrednostima brzine sedimentacije eritrocita.

Prvog postoperativnog dana bolesnici sa sepsom imali su statistički značajno manje vrednosti, u odnosu na preoperativne, za određivane aktivnosti antitrombina III i koncentracije ukupnih proteina i albumina. Statistički značajno smanjenje vrednosti utvrđeno je i trećeg postoperativnog dana kod bolesnika sa sepsom u odnosu na preoperativnu vrednost za sledeće parametre: interleukin 6, broj leukocita, udeo segmentiranih granulocita i biohemijske parametre (ukupni proteini, albumin, kalijum i neorganski fosfor). Petog postoperativnog dana smanjenje je značajno još samo kod ukupnih proteina i albumina. Jedini parametar čije su se vrednosti postoperativno statistički značajno povećavale ( $p < 0,05$ ) bila je brzina sedimentacije eritrocita, i to trećeg odnosno petog dana postoperativno u odnosu na preoperativnu vrednost. Kod parametara kod kojih nije bila statistički značajna razlika, iz izračunatih srednjih vrednosti i opsega uočava se kretanje u smeru normalizacije (*Tabele XXXVI–XXXVIII i Slike 34–39*).

Posebno su analizirane postoperativne vrednosti broja trombocita i aktivnost antitrombina III i proteina C. Ovo su parametri koji odražavaju stanje hemostaznog sistema i regulišu proces zgrušavanja krvi. U danima lečenja njihove vrednosti blago opadaju, ali i dalje se zadržava funkcionalnost hemostaznog sistema, što i jeste najvažnije da organizam ne pređe u stanje diseminovane intravaskularne koagulacije (DIK) koja je česti pratilac traumatskih stanja i sepse.

Za antritrombin III i protein C kritičan je prvi tj. treći postoperativni dan jer tada počinje značajna razlika između bolesnika sa lošim ishodom od preživelih bolesnika. Vrednosti antitrombina III i proteina C u grupi umrlih i preživelih se "udaljavaju" po danima. Kod bolesnika sa lošim ishodom u stanju septičkog šoka izmerene su vrednosti antitrombina III daleko ispod donje granice referentnog opsega (opseg 14–56%) i za protein C (22–67%). Dugotrajna endotoksinska indukcija uzrokuje stalnu ekscitaciju koagulacijskog sistema. Inhibitorni antikoagulantni mehanizmi, antitrombin III i protein C, sprečavaju finalnu reakciju koagulacije, trombozu, i nastanak diseminovane intravaskularne koagulacije (DIK). Normalne preoperativne, a snižene postoperativne vrednosti ukazuju na potrošnu septičnu koagulopatiju.

Ključni činioci hemostaznog sistema testom korelacije dokazali su svoju međusobnu povezanost. Statistički značajnu korelaciju, i preoperativno i postoperativno, su imale vrednosti trombocita sa vrednostima antitrombina III i

preoteina C. Takođe, aktivnosti antitrombina III su bile u statistički značajnoj korelaciji ( $p < 0,01$ ), i preoperativno i postoperativno, sa aktivnostima proteina C, pa je preoperativnog dana koeficijent korelacije bio 0,855, a petog postoperativnog dana 0,900 (*Tabele XXXX i XXXXVI*).

Rutinski biohemijski parametri, ukupni proteini, albumin, kalijum i neorganski fosfor, imaju tokom postoperativnih dana lečenja snižene vrednost koje su ispod ili blizu donje granice referentnog intervala. To je jako važno s obzirom na fiziološku ulogu koji ovi parametri imaju. Njihovo smanjenje u postoperativnom periodu nije samo posledica septičnog stanja već posledično i smanjenog unosa hranljivih materija kod operisanih bolesnika nekoliko dana po hirurškoj intervenciji. Koncentracije albumina bile su u statistički značajnoj korelaciji ( $p < 0,01$ ), preoperativno i postoperativno, sa koncentracijama ukupnih proteina, kao i vrednostima hemoglobina. SAFE (*Saline vs Albumin Fluid Evaluation*) studije su pokazale da je primena albumina bezbedna i podjednako efikasna kao i upotreba slanog rastvora. (0,9%). Multicentrična randomizovana studija kod bolesnika sa septičnim šokom koja je upoređivala primenu albumina intravenski tokom tri dana sa intravenskom primenom slanog rastvora, je pokazala da terapija albuminima apsolutno smanjuje mortalitet za 2,2%, ali taj efekat nije dostigao statističku značajnost. Zbog ovoga je preporuka o upotrebi albumina pacijenata sa sepsom i septičnim šokom označena kao slaba (164, 170, 171).

Analizom podataka Spermanove korelacije i koeficijenata korelacije dobijenih kod preoperativnih vrednosti određivanih parametara kod bolesnika sa sistemski inflamatornim odgovorom dobili smo nalaze slične kao kod bolesnika sa sepsom. Koncentracije presepsina su bile u statistički značajnoj korelaciji ( $p < 0,01$ ) sa dijagnostičkim markerima sepse tj. sa prokalcitoninom, LBP, interleukinom 6 i C-reaktivnim proteinom. Koeficijent korelacije za presepsin i prokalcitonin je bio 0,763. Značajnu korelaciju vrednosti imali su i prokalcitonin i C-reaktivni protein, LBP i interleukin 6, antitrombin III i protein C i ukupni proteini i albumin (*Tabele XXXXVII–XXXXVIII*). Ovo su bile i najznačajnije korelacije ostvarene kod bolesnika sa sepsom.

Starosna struktura bolesnika sa sepsom ukazala je i na povezanost stepena smrtnosti i godina starosti ispitanika. U starosnoj grupi do 50 godina nije bilo smrtnog ishoda. Stanja septičnog šoka i letalnog ishoda zabeležena su kod bolesnika starosne dobi od 57 do 82 godine. Da povezanost godina starosti i stope preživljavanja postoji

dokazano je i uključivanjem uzrasta u APACHE skor, gde se boduju godine starosti. Tako su kod bolesnika sa letalnim ishodom izračunate najveće vrednosti za APACHE II skor u opsegu od 31 do 42. Sa godinama starosti povećava se APACHE II skor, ali i stopa mortaliteta.

### **5.2.1 Dijagnostička vrednost presepsina, prokalcitonina i određivanih parametara kao biomarkera sepse u IAI kod ispitanika druge studije**

Kao i u prvoj studiji dijagnostička tačnost određivanih parametara kao biomarkera sepse u intraabdominalnim infekcijama ispitali smo ROC analizom. Tačnost je najbolje opisana vrednošću površine ispod ROC krive (AUC). ROC analizom obrađene su vrednosti parametara koji nisu bili u prvoj studiji i parametara koji su pokazali dobre rezultate u prvom delu istraživanja sa ciljem da ih uporedimo i donesemo zajednički zaključak. U drugom delu studije ROC analizom obuhvaćeni su novi parametri presepsin, interleukin 6 i LBP i poznati prokalcitonin, C-reaktivni protein i broj leukocita. Podaci iz ROC analize pri diferencijaciji ispitanika neinfektivnog i infektivnog stanja prikazani su u *Tabeli XXXXX*.

S obzirom da su korišćeni parametri novijeg datuma, najpre je urađena ROC analiza da bi se utvrdila tačnost određenih biomarkera sepse pri razlikovanju zdravih osoba (grupa A2) od ispitanika sa sumnjom na sepsu (B2 i C2). Kod bolesnika sa sumnjom na sepsu (B2 i C2) i zdravih osoba (A2) izračunate vrednosti za ROC AUC su bile sledeće: za presepsin 0,920, za prokalcitonin 0,905, za interleukin 6 i LBP 1,000, za C-reaktivni protein 0,997 i za leukocite 0,841. S obzirom da AUC daje informaciju o tome koliko je ROC kriva blizu najboljoj mogućnosti ( $AUC = 1$ ), svi parametri su pokazali jako dobru dijagnostičku tačnost. Izračunate "cutt-off" vrednosti pri razlikovanju zdravih osoba (grupa A2) od ispitanika sa sumnjom na sepsu (B2 i C2), preoperativno, za sve parametre bile su blizu vrednosti gornjih granica referentnog intervala za određene parametre (*Tabela XXXXXI* i *Slika 44*). Postignuta osetljivost je bila u intervalu od 72% do 100%, a specifičnost od 80% do 100%.

Kod pacijenata sa sistemski inflamatornim odgovorom nije potvrđena infekcija mikrobiološkim nalazom, što ih i razlikuje od bolesnika sa sepsom. To je bio razlog da

se odredi dijagnostička tačnost biomarkera i pri razlikovanju bolesnika sa potvrđenom sepsom (grupa C2) i tzv. neinfektivnih pacijenata u koje su pored zdravih osoba uključene i osobe sa sistemskim inflamatornim odgovorom. Vrednost AUC za presepsin je bila najveća, 0,999 i dalje za sve parametre u intervalu od 0,957 do 0,853 koliko je iznosila za leukocite. Osetljivost je bila u opsegu od 73% za leukocite do 100% za presepsin i C-reaktivni protein. Najveću specifičnost od 98% imao je presepsin i dalje ostali parametri do najmanje vrednosti od 80% koju je zabeležena kod C-reaktivnog proteina. Određene su i optimalne "cutt-off" vrednosti i to za presepsin 630 pg/mL, za prokalcitonin 0,494 ng/mL kao i za ostale biomarkere (*Tabela XXXXXII* i *Slika 45*). Svi određivani parametri su pokazali jako dobru dijagnostičku tačnost, ali se presepsin sa svojom "cutt-off" vrednošću od 630 ng/mL za koju je deklarirana osetljivost 100% i specifičnost 98% izdvaja kao najznačajniji i najosetljiviji indikator sepse. "Cut-off" vrednost prokalcitonina od 0,494 ng/mL obezbeđuje osetljivost 87% i specifičnost 97% za ovaj parametar. Vrednost od 0,494 ng/mL za prokalcitonin je u skladu sa već utvrđenim referentnim intervalom, gde se vrednost manja od 0,5 tumači kao mali rizik od sepse (82).

Da bi se još više dokazala korisnost i dijagnostička tačnost odabranih biomarkera za stanja sepse primenjena je ROC analiza da se ispita da li se ovim markerima može utvrditi, preoperativno, razlika između bolesnika sa potvrđenom sepsom (C2) i bolesnika sa sistemski inflamatornim odgovorom (B2). Izračunate vrednosti za ROC AUC su bile sledeće: za presepsin 0,996, za prokalcitonin 0,912, za LBP 0,857, za interleukin 6 0,822, za C-reaktivni protein 0,857 i za leukocite 0,777. Dobijeni rezultati su ponovo pokazali da je presepsin najkorisniji marker za diferencijaciju bolesnika sa i bez sepse. Kao i u prethodnom slučaju, "cutt-off" vrednost od 630 pg/mL, gde je osetljivost 100%, a specifičnost 93%, obezbeđuje u potpunosti odvajanje bolesnika sa sepsom od onih sa sistemski inflamatornim odgovorom. Takođe, i kod prokalcitonina ostaje "cutt-off" vrednost od 0,494 ng/mL, pri čemu je osetljivost 87%, a specifičnost 93%. I ostali markeri (*Tabela XXXXXIII* i *Slika 46*) pokazali su veliku osetljivost, 97% interleukin 6 i LBP, C-reaktivni protein i leukociti nešto niže, 83% tj. 73%. Specifičnost je bila zadovoljavajuća, u intervalu od 70% do 80%, što ih i čini manje superiornim markerima u odnosu na prokalcitonin i pre svih presepsin.

Bolesnici sa peritonitisom obično imaju izuzetno visok nivo prokalcitonina u krvi. Peritoneum ispoljava aktivan imunološki odgovor, jer je organ sa jako dobro perfuzijom, tako da se peritonitis javlja u skoro svim slučajevima sa znacima sistemske inflamacije. Kada se jednom postavi dijagnoza peritonitisa nivo prokalcitonina ima ulogu prognostičkog markera. Kod bolesnika koji su u oporavku nivo prokalcitonina se smanjuje u sledeća tri dana, dok se povećani nivoi zadržavaju kod bolesnika sa negativnim ishodom. Literaturni podaci pokazuju da maksimalne koncentracije prokalcitonin postiže prvog ili drugog dana nakon operativnog zahvata, što su i naše studije dokazale. Kada nivo prokalcitonina poraste iznad 1,5 ng/mL, velika je verovatnoća od nastanka komplikacija odnosno razvoja sepse (82, 83). Svi naši bolesnici sa sepsom imali su vrednosti daleko veće od navedene.

Presepsin kao biomarker sepse, ponaša se vrlo slično kao i prokalcitonin, ali ne i isto. Kako su neke studije pokazale, presepsin pokazuje brži rast svojih vrednosti i to već 6 sati od nastanka žarišta infekcije i ima izraženiju specifičnost nego prokalcitonin. Vrednosti za presepsin koje mogu biti i 10 do 15 puta veće od normalnih, ukazuju na ozbiljnost stanja u kome se bolesnik nalazi (172). U našoj studiji nivoi presepsina bili su vrlo visoki i u pozitivnoj korelaciji sa vrednostima APACHE II skora kao indeksa težine i ozbiljnosti stanja. Time se presepsin dokazao i kao pokazatelj stepena težine sepse.

Da bi se smanjila stopa smrtnosti kod bolesnika sa sepsom, neophodna je brza dijagnoza i adekvatna terapija. Kao "zlatni standard" u dijagnozi sepse i dalje se smatra pozitivan mikrobiološki nalaz. Međutim, nekada je potrebno tri do pet dana da se dobiju rezultati koji često mogu biti nisko pozitivni. Za to vreme lečenje se zasniva na lekarskom iskustvu. Iz tog razloga neophodno je da se obavi ispitivanje koje će u kratkom vremenu omogućiti dijagnostikovanje sepse (173, 174). *International guidelines for management of severe sepsis and septic shock* iz 2012. godine preporučuje da se u roku od 6 sati od simptoma mora prepoznati mesto i žarište infekcije da bi se u roku od jednog sata pokrenula antibiotska terapija. Nakon sumnje u postojanje sepse vreme dijagnoze i dalji tretman su od ključnog značaja (18). Presepsin, prokalcitonin i ostali biomarkeri potvrdili su se kao sredstva za ranu dijagnostiku sepse.

Naravno, presepsin i prokalcitonin kao i ostali biomarkeri sepse nisu "čudotvorni" markeri jer da bi se postavila dijagnoza i sprovelo lečenje neophodna je veza sa svim ostalim biohemijskim i hematološkim parametrima, kliničkim znacima i mikrobiološkim nalazima.

## 6. ZAKLJUČAK

1. Intraabdominalne infekcije predstavljaju oboljenje koje započinje prodorom mikrobiološkog uzročnika u peritonealnu šupljinu, što se nastavlja napredovanjem infekcijskog i inflamatornog procesa. Ako se patološki proces ne zaustavi u stadijumu inflamatornog odgovora dolazi do daljeg razvoja patološkog procesa i nastanka sepse, teške sepse i septičnog šoka, koji se odlikuje sindromom multiple organske disfunkcije.
2. Klasifikacija sepse po principu **PIRO** omogućava stratifikaciju obolelih na osnovu **P**redispozicije (genetska varijabilnost, komorbiditet, stanje bolesnika pre nastanka sepse), prirode i jačine **I**nsulta (**I**nfekcija, trauma), prirode i jačine **R**eakcije organizma na insult i stepena **O**rganske disfunkcije. Vrednost PIRO modela ogleda se u činjenici da se na osnovu njega može razlikovati morbiditet koji je posledica infekcije od morbiditeta koji potiče od odgovora organizma na infekciju. Detekcija markera aktivisane inflamacije potpuno se uklapa u novi **PIRO** sistem.
3. Odgovor organizma u sepsi uključuje i oslobađanje raznih medijatora zapaljenja što navodi na činjenicu da se njihovo određivanje može koristiti kao znak infekcije i težine stanja u kome se organizam trenutno nalazi. Zbog svojih karakteristika (stabilnost, vreme poluživota, osetljivost, specifičnost) oni se koriste i u praćenju efekata primenjene terapije.
4. Bez savremene dijagnostike nije moguće utvrditi stepen intoksikacije i dejstva odbrambenih mehanizama organizma. Stepem intoksikacije se može prikazati kroz poremećaj vrednosti biomarkera infektivnog stanja. Pravovremena i tačna dijagnoza je neophodna u slučaju sepse. Idealan parametar treba da omogućí brzu i preciznu dijagnozu, da je reproducibilan i da ima veliku osetljivost i specifičnost.
5. Presepsin se može koristiti u dijagnozi sepse kao i pri razlikovanju kritično obolelih pacijenata od sepse. Povišeni nivoi presepsina ukazuju na sistemsku inflamaciju i sepsu, pa je ovaj biomarker prepoznat kao dragocen dijagnostički marker za stanje sepse.

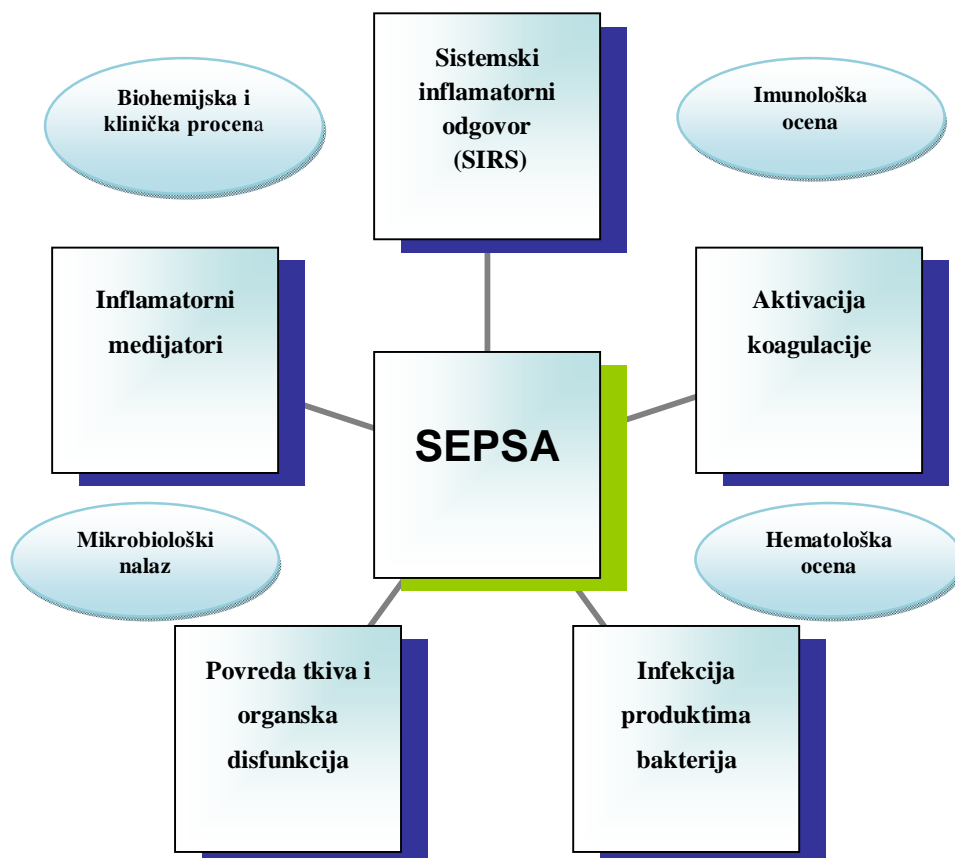


6. Kod preoperativnih vrednosti presepsina u bolesnika sa sepsom dobijena je statistički značajna razlika u odnosu na vrednosti zdravih osoba, ali i na preoperativne vrednosti bolesnika sa sistemski inflamatornim odgovorom (SIRS). "Cutt-off" vrednost za presepsin od 630 pg/mL, gde je postignuta osetljivost 100% i specifičnost 93%, obezbeđuje u potpunosti odvajanje bolesnika sa sepsom od onih sa sistemski inflamatornim odgovorom.
7. Dokazano je da je presepsin jako dobar pokazatelj težine stanja i stepena oštećenja organa koja podrazumevaju stanja teške sepse i septičkog šoka. U ovom radu dobijena je statistički značajna korelacija između vrednosti presepsina i APACHE II skora čime je potvrđena korisnost presepsina i kao markera težine i ishoda septičnog stanja.
8. Presepsin je koristan i u proceni uspešnosti terapije i može poslužiti pri uspostavljanju kliničkih protokola iz oblasti sepse. Zbog svojih dobrih hemijskih osobina i visoke stabilnosti, presepsin se može rutinski analizirati što omogućava laboratorijsko praćenje septičnih bolesnika i prevenciju nastanka komplikacija već ionako teškog stanja u kome se organizam nalazi.
9. Prokalcitonin je medijator sveopšte reakcije domaćina na infekciju, marker sepse, koji poseduje značajan imunomodulatorni efekat. Indukcija prokalcitonina i porast njegovog nivoa u plazmi povezani su sa širenjem i tipom sistemske inflamacije, a njegova koncentracija se naglo smanjuje nakon saniranja infektivnog žarišta.
10. Preoperativne vrednosti prokalcitonina kod pacijenata sa sepsom su pokazale statističku značajnost u odnosu na preoperativne vrednosti kod zdravih osoba i bolesnika sa sistemski inflamatornim odgovorom (SIRS), što ukazuje na visok dijagnostički značaj ovog parametra. "Cutt-off" vrednost za prokalcitonin od 0,494 ng/mL, pri čemu je postignuta osetljivost 87% i specifičnost 93% obezbeđuje u potpunosti odvajanje bolesnika sa sepsom od onih sa sistemski inflamatornim odgovorom.
11. Najveća srednja vrednost kod bolesnika sa sepsom kao i najveća izmerena vrednost za prokalcitonin zabeležena je drugog dana lečenja, dok nakon 72 sata, dakle trećeg dana postoperativno, vrednosti prokalcitonina počinju značajno da opadaju.

12. Visoke koncentracije prokalcitonina kod bolesnika sa sepsom imale su prognostičke implikacije, pa prokalcitonin nije samo dobar dijagnostički već i prognostički parametar, marker toka septičkog procesa pouzdan za procenu (ne)uspeha terapijskog tretmana.
13. Zbog poluživota od oko 24 časa *in vivo* i visoke stabilnosti u serumu *ex vivo* prokalcitonin poseduje idealne osobine za dnevno određivanje koncentracija u serumu, što je korisno za dijagnozu i praćenje bolesnika kod kojih postoji rizik od razvoja sepse ili je ona već potvrđena.
14. Indukcija C-reaktivnog proteina desila se kod svih bolesnika sa inflamacijom, tj. bolesnika sa sistemski inflamatornim odgovorom (SIRS) i bolesnika sa sepsom s tim da su vrednosti statistički značajno više u odnosu na vrednosti kod zdravih osoba. Zato je korišćenje C-reaktivnog proteina korisno i opravdano u kombinaciji sa više drugih akutnih biomarkera.
15. Kod pacijenata sa potvrđenom sepsom dobijena je statistički značajna razlika u vrednostima aktivnosti antitrombina III i proteina C, ne samo u odnosu na zdrave osobe već i u odnosu na pacijente sa dijagnozom SIRS, što ih čini korisnim biomarkerima sepse. Kod pacijenata sa sepsom su izraženije niske vrednosti i svoj minimum beleže drugog postoperativnog dana. Određivanje antitrombina III i proteina C ima ne samo dijagnostičku već i prognostičku vrednost. Substitucionom terapijom ovih preparata postiže se inhibicija koagulacionog sistema čime se sprečava njegova preterana ekscitacija i nastanak DIK-a, kao česta komplikacija septičnog šoka.
16. Akutni medijator inflamacije, interleukin 6, i protein koji vezuje lipopolisaharid uzročnika, LBP, svojim povišenim vrednostima pokazali su da su dobri markeri inflamacije i težine oboljenja.
17. Hematološki parametri nisu pokazali veliku doslednost neophodnu za odlučivanje i postavljanje dijagnoze jer imaju manju specifičnost, ali je njihovo određivanje korisno u daljem praćenju lečenja i planiranju terapijskih postupaka.
18. Određivanje biohemijskih parametara (ukupni proteini, albumin, kalijum i neorganski fosfor) značajno je sa aspekta praćenja primenjenih terapijskih procedura u cilju normalizacije osmolarnosti i elektrolitnog balansa u organizmu.

19. U danima nakon operativnog zahvata povišene ili smanjene preoperativne vrednosti određivanih parametara, prema svojoj dinamici, a zavisno od vremena poluživota i nove produkcije, napreduju ka svojim utvrđenim referentnim intervalima, i pokazatelj su stabilizacije i normalizacije infekcijom napadnutog organizma.
20. Na osnovu izračunatih koeficijenata korelacije može se zaključiti da postoji značajna korelacija između velikog broja određivanih parametara, markera sepse. To se lako objašnjava činjenicom da su odabrani markeri vrlo važni faktori u funkcionisanju pod sistema koji su međusobno povezani i zajedno čine uređen sistem kao što je ljudski organizam.
21. *International guidelines for management of severe sepsis and septic shock* iz 2012. godine preporučuje da se u roku od 6 sati od simptoma mora prepoznati mesto i žarište infekcije da bi se u roku od jednog sata pokrenula antibiotska terapija. Nakon sumnje u postojanje sepse vreme dijagnoze i dalji tretman su od ključnog značaja.
22. Laboratorijski testovi imaju za cilj da identifikuju ugrožen sistem ili organe, uključujući pokazatelje inflamatornog odgovora u perifernoj krvi (proinflamatorne markere i reaktante akutne faze) kao i markere organskih oštećenja.

*Zato što je zdravlje dragoceno, znanje mora da raste i da mu ispuni sve neophodne potrebe.*



## 7. LITERATURA

1. Gaieski DF, Edwards JM, Kallan MJ, Carr BG. Benchmarking the incidence and mortality of severe sepsis in the US. *Crit Care Med* 2013; 41(5): 1167–74.
2. Martin GS. Sepsis, severe sepsis and septic shock: changes in incidence, pathogens and outcomes. *Expert Rev Anti Infect Ther* 2012; 10(6): 701–6.
3. Die Deutsche Sepsis-Gesellschaft e.V. Krankheitsbild Sepsis. Universitätsklinikum Jena.
4. Mandoff LC, Kasper DL. Infectious diseases. Host –Pathogen interactions. *Harrison's Principles of Internal Medicine*, 18<sup>th</sup> Edition Textbook, 2011.
5. Menichetti F, Sganga G. Definition and classification of intra-abdominal infection. *J Chemother* 2009; 21 (Suppl 1): 3–4.
6. Rotstein OD, Pruet TL, Simmons RL. Mechanisms of microbial synergy in polymicrobial surgical infections. *Rev Infect Dis* 1985; 7(2): 151–70.
7. Šukalo M. Korelativni odnos intraabdominalne infekcije, septičkog šoka i sindroma multipnih oštećenja. Doktorska disertacija. Medicinski fakultet. Univerzitet u Beogradu 1995.
8. Solomkin JS, Mazuski JE, Bradley JS, Rodvold KA, Goldstein EJC, Baron EJ, O'Neill PJ, Chow AW, Dellinger RP. Diagnosis and Management of Complicated Intra-abdominal Infection in Adults and Children: Guidelines by the Surgical Infection Society and the Infectious Diseases Society of America Complicated Intra-abdominal Infection Guidelines. *Clin Infect Dis* 2010; 50(2): 133–64.
9. Lopez N, Kobayashi L, Coimbra RA. Comprehensive review of abdominal infections. *World J Emerg Surg* 2011; 6: 7.
10. Sharma S, Kumar A. A Septic Shock, Multiple Organ Failure and Acute Respiratory Distress Syndrome. *Curr Opin Pulm Med* 2003; 9(3): 199–200.
11. ACCP/SCCM Consensus Conference Committee. Definitions for sepsis and organ failure and guidelines for use of innovative therapies in sepsis. *Crit Care Med* 1992; 20: 867–74.

12. Levy MM, Fink MP, Marshall JC, Abraham E, Angus D, Cook D, et al. International Sepsis Definitions Conference, 2001 SCCM/ESICM/ACCP/ATS/SIS. *Intensive Care Med* 2003; 29: 530–8.
13. Angus DC, Burgner D, Wunderink R, Mira JP, Gerlach H, Widermann CJ, Vincent JL. The PIRO concept: P is for predisposition. *Critical Care* 2003; 7: 248–51.
14. Rubulotta F, Marshall JC, Ramsay G, Nelson D, Levy M, Williams M. Predisposition, insult/infection, response and organ dysfunction: A new model for staging severe sepsis. *Crit Care Med* 2009; 37(4): 1329–35.
15. Howell MD, Talmor D, Schuetz P, Hunziker S, Jones AE, Shapiro NI. Proof of principle: the predisposition, infection, response, organ failure sepsis staging system. *Crit Care Med* 2011; 39(2): 322–7.
16. Nguyen HB, Van Ginkel C, Batech M, Banta J, Corbett SW. Comparison of Predisposition, Insult/Infection, Response, and Organ dysfunction, Acute Physiology And Chronic Health Evaluation II, and Mortality in Emergency Department Sepsis in patients meeting criteria for early goal-directed therapy and the severe sepsis resuscitation bundle. *J Crit Care* 2012; 27(4): 362–9.
17. Dellinger RP, Levy MM, Carleet JM, Bion J, Parker MM, Jaeschke R, Reinhart K, Angus DC, Gerlach H, Vincent JL, et al. Surviving Sepsis Campaign: International guidelines for management of severe sepsis and septic shock. *Critical Care Med* 2008; 34(1): 17–60.
18. Dellinger RP, Levy MM, Rhodes A, Djillali A, Gerlach H, Opal SM, Sevransky JE, Sprung CL, Douglas IS, et al. Surviving Sepsis Campaign: International guidelines for management of severe sepsis and septic shock: 2012. *Critical Care Med* 2013; 41(2): 580–637.
19. Levy MM, Dellinger RP, Townsend SR, Linde-Zwirble WT, Marshall JC, Bion J, Schorr C, Artigas A, Ramsay G, Beale R, Parker MM, Gerlach H, Reinhart K, et al. SSC Results of an international guideline-based performance improvement program targeting severe sepsis. *Crit Care Med* 2010; 38(2): 367–74.
20. Levy B. Lactate and shock state: the metabolic view. *Curr Opin Crit Care* 2006; 12: 315–21.
21. Ball SG. Metabolic and Endocrine Changes in Sepsis and the Catabolic State. In: *Sepsis*. Springer London 2008.

22. Khardori R, Castillo D. Endocrine and metabolic changes during sepsis: an update. *Med Clin North Am* 2012; 96(6): 1095–1105.
23. Umipierrez GE, Isaacs SD, Bazargan N, et al. Hyperglycemia: an independent marker of in-hospital mortality in patients with undiagnosed diabetes. *J Clin Endocrinol Metab* 2002; 87: 978–82.
24. Taylor JH, Beilman GJ. Hyperglycemia in the intensive care unit: no longer just a marker of illness severity. *Surg Infect (Larchmt)* 2005; 6: 233–45.
25. Riedemann NC, Guo RF, Ward PA. Novel strategies for the treatment of sepsis. *Nat Med* 2003; 9: 517–24.
26. Deitch E, Vincent JL, Windsor A. Sepsis and Multiple Organ Dysfunction: A Multidisciplinary Approach. WB Saunders 2002.
27. Haldane J.S. Respiration. Yale University Press, New Haven 1922.
28. Baudouin SV. Introduction and Epidemiology. In: Sepsis. Springer London 2008.
29. Kendrick SFW, Jones DEJ. Mechanisms of Innate Immunity in Sepsis. In: Sepsis. Springer London 2008.
30. Snowden BC, Cosgrove J. Cardiac, Circulatory, and Microvascular Changes in Sepsis and Multiorgan Dysfunction Syndrome. In: Sepsis. Springer London 2008.
31. Lee WL, Slutsky AS. Sepsis and Endothelial Permeability *N Engl J Med* 2010; 363(7): 689–91.
32. Gamulin S, Marušić M, Kovač Z. Patofiziologija. V izdanje Medicinska naklada Zagreb 2002.
33. Angus DC, van der Poll T. Severe sepsis and septic shock. *N Engl J Med* 2013; 369: 840–51.
34. Gortzis LG, Sakellaropoulos F, Ilias I, Stamoulis K, Dimopoulou I. Predicting ICU survival: a meta-level approach. *BMC Health Serv Res* 2008; 26 (8): 157.
35. Donahoe L, McDonald E, Kho ME, MacLennan M, Stratford PW, Cook DJ. Increasing reliability of APACHE II scores in a medical-surgical intensive care unit: a quality improvement study. *Am J Crit Care* 2009; 18(1): 58–64.
36. Strand K, Flaatten H. Severity scoring in the ICU: a review. *Acta Anaesthesiol Scand* 2008; 52(4): 467–78.

37. Knaus WA, Zimmermann JE, Wagner DP. APACHE - Acute Physiology and Chronic Health Evaluation a physiologically based classification system. *Crit Care Med* 1981; 9(8): 591–7.
38. Knaus WA, Draper EA, Wagner DP, Zimmerman JE. APACHE II: a severity of disease classification system. *Crit Care Med* 1985; 13: 818–29.
39. Kollef MH, Schuster DP. Predicting intensive care unit outcome with scoring systems. Underlying concepts and principles. *Crit Care Clin* 1994; 10(1): 504–6.
40. Zimmerman JE, Kramer AA, McNair DS, Malila FM. Acute Physiology and Chronic Health Evaluation (APACHE) IV: Hospital mortality assessment for today's critically ill patients. *Crit Care Med* 2006; 34: 1297–1310.
41. Zaleznik DF, Kasper D. Intraabdominal Infections and Abscesses. *Harrison's Principles of Internal Medicine, 18<sup>th</sup> Edition Textbook*, 2011.
42. Loksley RM. Staphylococcal Infections. *Harrison's Principles of Internal Medicine, 18<sup>th</sup> Edition Textbook*, 2011.
43. Wessels MR. Streptococcal Infections. *Harrison's Principles of Internal Medicine, 18<sup>th</sup> Edition Textbook*, 2011.
44. Kasper D. Gas Gangrene and Other Clostridial Infections. *Harrison's Principles of Internal Medicine, 18<sup>th</sup> Edition Textbook*, 2011.
45. Eisenstein BI. Diseases Caused by Gram-Negative Enteric Bacilli. *Harrison's Principles of Internal Medicine, 18<sup>th</sup> Edition Textbook*, 2011.
46. van der Poll T, Lowry SF. Modulation of the inflammatory response in severe sepsis. Tellado JM, Forse RA, Solomkin JS, editors. Basel Switzerland: Karger 1995. p. 18–32.
47. Haynes BF, Fauci AS. The Immune System in Health and Disease. *Harrison's Principles of Internal Medicine, 18<sup>th</sup> Edition Textbook*, 2011.
48. Rittirsch D, Flierl MA, Peter A. Harmful molecular mechanisms in sepsis. *Ward Nature Reviews Immunology* 2008; 8: 776–787.
49. Kindt TJ, Goldsby RA, Osborne BA, Kuby J. *Kuby Immunology (6 Ed.)*. New York: WH Freeman and company 2006.
50. Santos AA, Wilmore DW. The systemic inflammatory response: perspective of human endotoxemia. *Shock* 1996; 6(Suppl 1): S50–56.
51. Chang S, Li L. Metabolic Endotoxemia: A Novel Concept in Chronic Disease Pathology. *J Med Sci* 2011; 31(5): 191–209.



52. Fong YM, Marano MA, Moldawer LL, Wei H, Calvano SE, Kenney JS, Allison AC, Cerami A, Shires GT, Lowry SF. The acute splanchnic and peripheral tissue metabolic response to endotoxin in humans. *J Clin Invest* 1990; 85(6): 1896–1904.
53. Siracusano L, Girasole V. Glucose and lipid metabolism in sepsis and endotoxemia. *Acta Anaesthesiol Scand* 2009; 53(3): 413–4.
54. Munford RS. Sepsis and septic shock. *Harrison's Principles of Internal Medicine*, 18<sup>th</sup> Edition Textbook, 2011.
55. Verhamme P, Hoylaerts MF. Haemostasis and inflammation: two of a kind? *Thromb J* 2009; 7: 15.
56. Bonar R, Favalaro EJ, Adcock DM. Quality in coagulation and haemostasis testing. *Biochem Med* 2010; 20: 184–99.
57. Arnout J, Hoylaerts MF, Lijnen HR. Haemostasis. *Handb Exp Pharmacol* 2006; 1–41.
58. Levi M, van der Poll T. Inflammation and coagulation. *Crit Care Med* 2010; 38: S26–S34.
59. Levi M, ten Cate H, van der Poll T. Endothelium: interface between coagulation and inflammation. *Crit Care Med* 2002; 30: S220–4.
60. Löwenberg EC, Meijers JCM, Levi M. Platelet-vessel wall interaction in health and disease. *Neth J Med* 2010; 68: 242–51.
61. Gawaz M, Langer H, May AE. Platelets in inflammation and atherogenesis. *J Clin Invest* 2005; 115: 3378–84.
62. Cimmino G, D'Amico C, Vaccaro V, D'Anna M, Golino P. The missing link between atherosclerosis, inflammation and thrombosis: is it tissue factor? *Expert Rev Cardiovasc Ther* 2011; 9: 517–23.
63. Schouten M, Wiersinga WJ, Levi M, van der Poll T. Inflammation, endothelium and coagulation in sepsis. *J Leukoc Biol* 2008; 83: 536–45.
64. Margetic S. Inflammation and hemostasis. *Bioch Med* 2012; 22(1): 49–62.
65. Esmon CT. The impact of the inflammatory response on coagulation. *Thromb Res* 2004; 114: 321–7.
66. Gando S. Microvascular thrombosis and multiple organ dysfunction syndrome. *Crit Care Med* 2010; 38(Suppl): S35–42.
67. Levi M, Opal SM. Coagulation abnormalities in critically ill patients. *Crit Care Med* 2006; 10: 222–8.

68. Witko-Sarsat V, Ngyen-Khoa T, Jungers P, Drueke TB, Descamps-Latscha B. Advanced oxidation protein products as a novel molecular basis of oxidative stress in uraemia. *Nephrol Dial Transplant* 1999; 14(Suppl 1): 76–8.
69. Witko-Sarsat V et al. Advanced oxidation protein products as a novel mediators of inflammation and monocyte activation in chronic renal failure. *J Immunol* 1998; 161: 2524–2532.
70. Redl H, Schlag G. *Cytokines in Severe Sepsis and Septic Shock. Progress in Inflammation Research.* Basel, Boston, Berlin Birkhäuser Verlag 2003.
71. Danner RL, Elin RJ, Hosseini JM, Wesley RA, Reilly JM, Parillo JE. Endotoxemia in human septic shock. *Chest* 1991; 99(1): 169–175.
72. Martin MA, Silverman HJ. Gram-negative sepsis and the adult respiratory distress syndrome. *Clin Infect Dis* 1992; 14: 1213–28.
73. Russell JA. Management of sepsis. *N Engl J Med* 2006; 355: 1699–713.
74. Archer GL, Polk RE. *Treatment and Prophylaxis of Bacterial Infections. Harrison's Principles of Internal Medicine, 18<sup>th</sup> Edition Textbook, 2011.*
75. Herzog T, Chromic Am, Uhl W. Treatment of complicated intra-abdominal infections in the era of multi-drug resistant bacteria. *Eur J Med Res* 2010; 15(12): 525–32.
76. Moya F, Nieto A, R-Candell JL. Calcitonin biosynthesis: evidence for a precursor. *Eur J Biochem* 1975; 55(2): 407–13.
77. Meisner M. *PCT, Procalcitonin – a new, innovative infection parameter. 2000. Georg Thieme Verlag, Stuttgart ISBN: 3-13-105503-0.*
78. Reinhart K, Karzai WI, Meisner M. Procalcitonin as a marker of the systemic inflammatory response to infection. *Intensive Care Med* 2000; 26(9): 1193–200.
79. Weglöhner W, Struck J, Fischer-Schulz C, Morgenthaler NG, Oto A, Bohuon C, Bergmann A. Isolation and characterization of serum procalcitonin from patients with sepsis. *Peptides* 2001; 86: 396–404.
80. Ivančević N, Radenković D, Bumbaširević V, Karamarković A, Jeremić V, Kalezić N, Vodnik T, Beleslin B, Milić N, Gregorić P, Žarković M. Procalcitonin in preoperative diagnosis of abdominal sepsis. *Langenbecks Archives of Surgery* 2008; 393(3): 397–403.

81. Nylen ES, Whang KT, Snider RH, Steinwald PM, White JC, Becker KL. Mortality is increased by procalcitonin and decreased by an antiserum reactive to procalcitonin in experimental sepsis. *Crit Care Med* 1998; 26(6): 1001–6.
82. Clech C, Fosse JP, Karoubi P, Vincent F, Chouahi I, Cohen Y, Cupa M et al. Diferential diagnostic value of procalcitonin in surgical and medical patients with septic shock. *Crit Care Med* 2006; 34(1): 102–7.
83. Jensen J, Heslet L, Jensen T, Espersen K, Steffensen P, Tvede M. Procalcitonin increase in early identification of critically ill patients at high risk of mortality. *Crit Care Med* 2006; 34: 2596–602.
84. Cheng A, O'Brien M, Jacups S, Anstey N, Currie B. CRP in the diagnosis of melioidosis. *Am J Trop Med Hyg* 2004; 70(5): 580–2.
85. Müller B, Schuetz P, Trampuz A. Circulating biomarkers as surrogates for bloodstream infections. *Int J Antimicrob Agents* 2007; 30 (Suppl 1): S16–23.
86. Heumann D, Roger T. Initial responses to endotoxins and Gram-negative bacteria. *Clin Chim Acta* 2002; 323(1-2): 59–72.
87. Heumann D, Lauener R, Ryffel B. The dual role of LBP and CD14 in response to Gram-negative bacteria or Gram-negative compounds. *J Endotoxin Res* 2003; 9(6): 381–4.
88. Vreugdenhil AC, Dentener MA, Snoek AM, Greve JW, Burman WA. Lipopolysaccharide binding protein and serum amyloid A secretion by human intestinal epithelial cells during the acute phase response. *J Immunol* 1999; 163: 2792–8.
89. Kirschning C, Unbehau A, Lamping N, Pfeil D, Herrmann F, Schumann R. Control of transcriptional activation of the lipopolysaccharide binding protein (LBP) gene by proinflammatory cytokines. *Cytokines Cell Mol Ther* 1997; 3: 59–62.
90. Gutschmann T, Müller M, Carroll SF, MacKenzie RC, Wiese A, Seydel U. Dual Role of Lipopolysaccharide (LPS)-Binding Protein in Neutralization of LPS and Enhancement of LPS-Induced Activation of Mononuclear Cells. *Infect Immun* 2001; 69(11): 6942–50.
91. Thompson PA, Kitchens RL. Native high-density lipoprotein augments monocyte responses to lipopolysaccharide (LPS) by suppressing the inhibitory activity of LPS-binding protein. *Immunol* 2006; 177(7): 4880–7.

92. Zweigner J, Schumann R, Weber JR. The role of lipopolisaccharide-binding protein in modulating the innate immune response. *Microbes Infect* 2006; 8(3): 946–52.
93. Kaden J, Zweren P, Lambrecht HG, Dostatni R. Lipopolisaccharide-binding protein as a new and reliable infection marker after kidney transplantation. *Transpl Int* 2002; 15: 163–72.
94. Vanden Berghe W, Vermeulen L, De Wilde G. Signal transduction by tumor necrosis factor and gene regulation of the inflammatory cytokine interleukin 6. *Biochem Pharmacol* 2000; 60: 1185–95.
95. Patel RT, Deen KI, Youngs D, et al. Interleukin 6 is a prognostic indicator of outcome in severe intra- abdominal sepsis. *Br J Surg* 1994; 81: 1306–8.
96. Kellum JA, Kong L, Fink MP, Weissfeld LA, Yealy DM, Pinsky MR, et al. Understanding the inflammatory cytokine response in pneumonia and sepsis. *Arch Intern Med* 2007; 167(15): 1655–63.
97. Oberholzer A, Souza SM, Tschoeke SK, Oberholzer C, Abouhamze A, Pribble JP, et al. Plasma cytokines measurements augment prognostic scores as indicators of outcome in patients with severe sepsis. *Shock* 2005; 23(6): 488–93.
98. Bernardo A, Ball C, Nolasco L, et al: Effects of inflammatory cytokines on the release and cleavage of the endothelial cell-derived ultralarge von Willebrand factor multimers under flow. *Blood* 2004; 104: 100–6.
99. Mokart D, Merlin M, Sannini A, Brun JP, Delpero JR, Houvenaeghel G, et al. Procalcitonin, interleukin 6 and systemic inflammatory response syndrome (SIRS): early markers of postoperative sepsis after major surgery. *Brit J Anaes* 2005; 94: 767–73.
100. Tillet WS, Francis TJR. Serological reactions in pneumonia with a non-protein somatic fraction of pneumococcus. *J Exp Med* 1930; 52: 561–71.
101. Grant GH, Silverman LM, Christenson RH. Aminoacids and proteins. Philadelphia. W.B. Saunders Company 1999: 301–360.
102. Karamarković A, Đukić V, Stefanović B, Ilić M, Popović N, Vukosavljević D, Vodnik T. Protein C as diagnostic and predictive biomarker of sepsis during severe intra-abdominal infections. *Jugoslov Med Bioh* 2003; 22(3): 229–36.
103. Thomas Lothar. Hemostasis. In: Thomas L, 1. ed. *Clinical laboratory diagnostics*. Frankfurt/Main: TH– Books– Verl.– Ges., 1998; 548–640.

104. Stefanović S. i sar. Hematologija. Medicinska knjiga, Beograd – Zagreb, 1989.
105. Mizutani A, Okajima K, Uchiba M, Isobe H, Harada N, Mizutani S, et al. Antithrombin reduces ischemia/reperfusion-induced renal injury in rats by inhibiting leukocyte activation through promotion of prostacyclin production. *Blood* 2003; 101: 3029–36.
106. Esmon CT. The role of protein C and thrombomodulin in the regulation of blood coagulation. *J Biol Chem* 1989; 264: 4743–46.
107. Bauer KA, Kass BL, Beeler DL, Rosenberg RD. Detection of Protein C activation in humans. *J Clin Invest* 1984; 74: 2033–41.
108. Gruber A, Griffin JH. Direct detection of activated Protein C in blood from human subjects. *Blood* 1992; 79: 2340–48.
109. Weiler H. Regulation of inflammation by the protein C system. *Crit Care Med* 2010; 38: S18-S25.
110. Dettenmeier P, Swindell B, Stroud M, Arkins N, Howard A. Role of activated protein C in the pathophysiology of severe sepsis. *Am J Crit Care* 2003; 12: 518–24.
111. Esmon CT. Coagulation inhibitors in inflammation. *Bioch Soc Trans* 2005; 33: 401–5.
112. Toltl LJ, Swystun LL, Pepler L, Liaw PC. Protective effects of activated protein C in sepsis. *Thromb Haemost* 2008; 100: 582–92.
113. Koh SCL, Chew CYC, Viegas OAC, Choo M, Ratnam SS. Influence of circulating D-Dimer Levels on Assays of Fibrinogen. *Ann Acad Med Singapore* 1994; 23: 856–60.
114. Bounameaux H, Moerloose P, de Perrier A, Reber G. Plasma measurement of D-dimer as diagnostic aid in suspected venous thromboembolism. *Thromb Haemost* 1994; 71: 1.
115. Yaegashi Y, Shirakawa K, Sato N, Suzuki Y, Kojika M, Imai S, et al. Evaluation of a newly identified soluble CD14 subtype as a marker for sepsis. *J Infect Chemother* 2005; 11(5): 234–8.
116. Golenbock DT, Bach RR, Lichenstein H, Juan TS, Tadavarthy A, Moldow CF. Soluble CD14 promotes LPS activation of CD14-deficient PNH monocytes and endothelial cells. *J Lab Clin Med* 1995; 125: 662–71.
117. Spanuth E, Wilhelm J, Loppnow H, Ebelt H, Ivandic B, Werdan K. Diagnostic and Prognostic Value of Presepsin (Soluble CD14 Subtype) in Emergency Patients with Early Sepsis Using the New Assay PATHFAST Presepsin. *IFCC World Lab/EuroMedLab Proceedings* 2011.

118. Naitoh K, Shirakawa K, Hirose J, Nakamura M, Takeuchi T, Hosaka Y, et al. The new sepsis marker, sCD14-ST (PRESEPSIN), induction mechanism in the rabbit sepsis models. Presentation of SEPSIS 2010.
119. Furusako S, Shirakawa K. Methods for detecting human low molecular weight CD14. United States patent 2008; US7465547 B2.
120. Furusako S, Shirakawa K. Soluble CD14 antigen. United States patent 2009; US7608684 B2.
121. Okamura Y, Yokoi H. Development of a point-of-care assay system for measurement of presepsin (sCD14-ST). *Clin Chim Acta* 2011; 412(23-24): 2157–61.
122. Shozushima T, Takahashi G, Matsumoto N, Kojika M, Okamura Y, Endo S. Usefulness of presepsin (sCD14-ST) measurements as a marker for the diagnosis and severity of sepsis that satisfied diagnostic criteria of systemic inflammatory response syndrome. *J Infect Chemother.* 2011; 17(6): 764–9.
123. Internal Data of Mitsubishi Chemical Medience Corporation, Tokyo, Japan.
124. Ignjatović S. Biohemijski parametri akutnog pankreatitisa: analitička i klinička vrednost. Doktorska disertacija. Farmaceutski fakultet. Univerzitet u Beogradu, 1997.
125. Zveig MH, Campbell G. Receiver operating characteristic (ROC) plots: a fundamental evaluation tool in clinical medicine. *Clin Chem* 1993; 39(4): 561–77.
126. Sach L. Applied statistics – a handbook of techniques. Second edition. New York: Springer – Verlag, 1984.
127. Vodnik T, Kaljević G, Tadić T, Majkić-Singh N. Presepsin (sCD14-ST) in preoperative diagnosis of abdominal sepsis. *Clin Chem Lab Med* 2013; 51(10): 2053–62.
128. Kosanke R, Beier W, Lipecky R, Meisner M. Clinical benefits of procalcitonin. *Tanaffos* 2008; 7: 14–18.
129. Reinhart K, Karzai W, Meisner M. Procalcitonin as a marker of the systemic inflammatory response to infection. *Intensive Care Med* 2000; 26: 1193–200.
130. Meynaar IA, Droog W, Batstra M, Vreede R, Herbrink P. In Critically Ill Patients, Serum Procalcitonin Is More Useful in Differentiating between Sepsis and SIRS than CRP, IL-6, or LBP. *Crit Care Res Pract* 2011: Article ID 594645, 6 pages.
131. Nguyen HB, Corbett SW, Steele R, Banta J, Clark RT, Hayes SR, et al. Implementation of a bundle of quality indicators for the early management of severe sepsis and septic shock is associated with decreased mortality. *Crit Care Med* 2007; 35: 1105–12.

132. Kortgen A, Niederprum P, Bauer M. Implementation of an evidence-based standard operating procedure and outcome in septic shock. *Crit Care Med* 2006; 34: 943–9.
133. Meisner M, Adina H, Schmidt J. Correlation of procalcitonin and C-reactive protein to inflammation, complications, and outcome during the intensive care unit course of multiple-trauma patients. *Crit Care* 2006; 10: R1.
134. Kofteridis D, Samonis G, Karatzanis AD, Fragiadakis GM, Bourolias CA, Maraki S, et al. C-Reactive protein and serum procalcitonin levels as markers of bacterial upper respiratory tract infections. *Am J Infect Dis* 2009; 5: 292–7.
135. Becker KL, Snider R, Nylen ES. Procalcitonin assay in systemic inflammation, infection and sepsis: Clinical utility and limitations. *Crit Care Med* 2008; 36: 941–52.
136. Suberviola B, Castellanos-Ortega A, Gonzales-Castro A, Garcia-Astudillo LA, et al. Prognostic value of procalcitonin, C-reactive protein and leukocytes in septic shock. *Med Intensiva* 2012; 36: 177–84.
137. Castelli GP, Pognani C, Cita M, Paladini R. Procalcitonin as a prognostic and diagnostic tool for septic complications after major trauma. *Crit Care Med* 2009; 37: 1845–9.
138. Becker KL, Snider R, Nylen ES. Procalcitonin in sepsis and systemic inflammation: a harmful biomarker and a therapeutic target. *Br J Pharmacol* 2010; 159: 253–64.
139. Luzzani A, Polati E, Dorizzi R, Rungatscher A, Pavan R, Merlini A. Comparison of procalcitonin and C-reactive protein as markers of sepsis. *Crit Care Med* 2003; 31: 1737–41.
140. Vermeire S, van Assche G, Rutgeerts P. The role of C-reactive protein as an inflammatory marker in gastrointestinal diseases. *Nat Clin Pract Gastroenterol Hepatol* 2005; 2: 580–6.
141. Gürleyik G, Emir S, Kilicoglu G, Arman A, Saglam A. Computerized tomography severity index, APACHE II score and serum CRP concentration for predicting the severity of acute pancreatitis. *JOP* 2005; 10: 562–7.
142. Rau BM, Frigerio I, Buchler MW, Wegscheider K, Bassi C, Puolakkainen PA, Beger HG, Schilling MK. Evaluation of procalcitonin for predicting septic multiorgan failure and overall prognosis in secondary peritonitis: a prospective, international multicenter study. *Arch Surg* 2007; 142: 134–42.

143. Castelli GP, Pognani C, Meisner M, Stuani A, Bellomi D, Sgarbi L. Procalcitonin and C-reactive protein during systemic inflammatory response syndrome, sepsis and organ dysfunction. *Crit Care* 2004; 8: R234–R242.
144. Bernard GR, Vincent JL, Laterre PF, LaRosa SP, Dhainaut JF, Lopez-Rodriguez A, Steingrub JS, Garber GE, Helterbrand JD, Ely EW, Fisher CJ. Recombinant human Protein C Worldwide Evaluation in Severe Sepsis (PROWESS) study group. Efficacy and safety of recombinant human activated protein C for severe sepsis. *N Engl J Med* 2001; 344(10): 699–709.
145. Levi M. Platelet in sepsis. *Hematology* 2005; 10: 129–31.
146. Vanderschueren S, De Weerd A, Malbrain M, Vankersschaever D, Frans E, Wilmer A, Bobbaers H. Thrombocytopenia and prognosis in intensive care. *Crit Care Med* 2000; 28: 1871–76.
147. Kibe S, Adams K, Barlow G. Diagnostic and prognostic biomarkers of sepsis in critical care. *J Antimicrob Chemother* 2011; 66: 1133–40.
148. Harbarth S, Holeckova K, Froidevaux C, et al. Diagnostic value of procalcitonin, interleukin-6 and interleukin-8 in critically ill patients admitted with suspected sepsis. *Am J Respir Crit Care Med* 2001; 3: 396–402.
149. Simon L, Gauvin F, Amre DK, Saint-Louis P, Lacroix J. Serum procalcitonin and C-reactive protein levels as markers of bacterial infection: a systematic review and meta-analysis. *Clin Infect Dis* 2004; 39: 206–17.
150. Ugarte H, Silva E, Mercan D, De Mendonca A, Vincent JL. Procalcitonin used as a marker of infection in the intensive care unit. *Crit Care Med* 1999; 27: 498–504.
151. Suffredini AF, Munford RS. Novel therapies for septic shock over the past 4 decades. *JAMA* 2011; 306(2): 194–9.
152. Elias AC, Matsuo T, Grion CM, Cardoso LT, Verri PH. Incidence and risk factors for sepsis in surgical patients: a cohort study. *J Crit Care* 2012; 27(2): 159–66.
153. Ventetuolo CE, Levy MM. Biomarkers: diagnosis and risk assessment in sepsis. *Clin Chest Med* 2008; 29: 591–603.
154. Coelho FR, Martins JO. Diagnostic methods in sepsis: the need of speed. *Rec Assoc Med Bras* 2012; 58(4): 498–504.



155. Kojika M, Takahashi G, Matsumoto N, Kikkawa T, Hoshikawa K, Shioya N, et al. Serum levels of soluble CD14 subtype reflect the APACHE II and SOFA Scores. *Medical Postgraduates* 2010; 48(1): 46–50.
156. Takahashi G, Suzuki Y, Kojika M, Matsumoto N, Shozushima T, Makabe H, et al. Evaluation of responses to IVIG therapy in patients with severe sepsis and septic shock by soluble CD14 subtype monitoring. *Medical Postgraduates* 2010; 48(1): 19–24.
157. Herzum I, Renz H. Inflammatory markers in SIRS, sepsis and septic shock. *Curr Med Chem* 2008; 15(6): 581–7.
158. Skrupky LP, Kerby PW, Hotchkiss RS. Advances in the management of sepsis and the understanding of the key immunologic defects. *Anesthesiology* 2011; 115: 1349–62.
159. Esteban RR, Sarabia PR, Delgado EG, Aguado CB, Cuervo-Arango JA, Varela M. Procalcitonin and C-reactive protein levels as diagnostic tools in febrile patients admittes to a General Internal Medicine ward. *Clin Biochem* 2012; 45(1-2): 22–5.
160. Alves-Filho JC, de Freitas A, Spiller F, Souto FO, Cunha FQ. The role of neutrophils in severe sepsis. *Shock* 2008; Suppl 1: 3–9.
161. Stevens DL, Root RK, Rosen H, Dale DC. Differential white blood cell count: underutilized or overrated. *Curr Opin Infect Diseases* 2000; 13: 205–7.
162. Yilmaz FM, Yilmaz G, Akay H, Duranay M, Yucel D. Evaluation of a card test for procalcitonin in continuous ambulatory peritoneal dialysis peritonitis. *Ann Clin Biochem* 2007; 44: 482–4.
163. Danese S, Vetrano S, Zhang L, Poplis VA, Castellino FJ. The protein C pathway in tissue inflammation and injury: pathogenic role and therapeutic implications. *Blood* 2010; 115(6): 1121–30.
164. Delaney AP, Dan A, McCaffrey J, Finfer S. The role of albumin as a resuscitation fluid for patients with sepsis: a systematic review and meta-analysis. *Crit Care Med* 2011; 39(2): 386–91.
165. Buckley JF , Singer M, Clapp LH. Role of  $K_{ATP}$  channels in sepsis. *Cardiovasc Res* 2006; 72 (2): 220–30.
166. Geerse DA, Bindels AJ, Kuiper MA, Roos AN, Spronk PE, Schultz MJ. Treatment of hypophosphatemia in the intensive care unit. *Critical Care* 2010; 14: R147.

167. Charles PE, Tinel C, Barbar S, Aho S, Prin S, DoiseJM, et al. Procalcitonin kinetics within the first days of sepsis: relationship with the appropriateness of antibiotic therapy and the outcome. *Crit Care* 2009; 13: R38.
168. Karlsson S, Heikkinen M, Pettila V, Alila S, Vaisanen S, Pulkki K, et al. Predictive value of procalcitonin decrease in patients with severe sepsis: a prospective observational study. *Crit Care Med* 2010; 14: R205.
169. Amour J, Birenbaum A, Langeron O, Le Manach Y, Bertrand M, Coriat P, et al. Influence of renal dysfunction on the accuracy of procalcitonin for the diagnosis of postoperative infection after vascular surgery. *Crit Care Med* 2008; 36: 1147–54.
170. Vodič za prevenciju dijagnostiku i lečenje sepse, teške sepse i septičnog šoka. Institut za javno zdravlje Republike Srbije " Dr Milan Jovanović Batut", Beograd 2012.
171. Finfer S, McEvoy S, Bellomo R, McArthur C, Myburgh J, Norton R. Impact of albumin compared to saline on organ function and mortality of patients with severe sepsis. *Intensive Care Med* 2011; 37(1): 86–96.
172. Endo S, Suzuki Y, Takahashi G, Shozushima T, Ishikura H, Murai A, Nishida T, Irie Y, Miura M, et al. Usefulness of presepsin in the diagnosis of sepsis in a multicenter prospective study. *J Infect Chemother* 2012; 18: 891–7.
173. Hall TC, Bilku DK, Al-Leswas D, Horst C, Dennison AR. Biomarkers for the differentiation of sepsis and SIRS: the need for the standardisation of diagnostic studies. *Ir J Med Sci* 2011; 180(4): 793–8.
174. Shirakawa K, Naitou K, Hirose J, Takahashi T, Furusako S. Presepsin (sCD14-ST): development and evaluation one-step ELISA with a new standard that is similar to the form of presepsin in septic patients. *Clin Chem Lab Med* 2011; 49(5): 937–9.

## **BIOGRAFIJA**

Tatjana Vodnik je rođena 2. marta 1969.g. u Zemunu gde je završila osnovnu školu i Prvu Zemunsku gimnaziju 1987.g. sa odličnim uspehom, kao nosilac diplome "Vuk Karadžić". Iste godine upisala se na Farmaceutski fakultet u Beogradu koji je završila 26. marta 1993.g. Nakon obavljenog pripravničkog staža i položenog stručnog ispita 1994.g. ostaje da radi u laboratoriji Urgentnog centra Instituta za medicinsku biohemiju KCS. Poslediplomske studije završila je na Farmaceutskom fakultetu 2001.g. odbranivši magistarski rad na temu "Izbor parametara hemostaze za praćenje normalne i komplikovane trudnoće". Bila je saradnik-istraživač u projektu Ministarstva nauke, tehnologije i zaštite životne sredine, pod rukovodstvom prof. dr. Nade Majkić-Singh. Decembra 2005.g. završava specijalističke studije iz medicinske biohemije na Farmaceutskom fakultetu i stiče zvanje specijaliste medicinske biohemije. Maja 2012.g. odlukom Ministarstva zdravlja, a prema odluci Farmaceutskog društva Srbije stiče zvanje primarijusa.

U Centru za medicinsku biohemiju KCS od 2005.g. obavlja dužnost rukovodioca kvaliteta prema zahtevima ISO standarda tj. rukovodioca Odseka za kontrolu QMS-a. Rešenjem Ministarstva zdravlja RS imenovana je za stručnog nadzornika za spoljašnju proveru kvaliteta stručnog rada.

Član je Izvršnog odbora i generalni sekretar Društva medicinskih biohemičara Srbije, a od 2006.g. član Skupštine Komore biohemičara Srbije. Od 2003.g. je tehnički ocenjivač ATS-a za ISO/IEC 17025, a od marta 2009.g. i vodeći ocenjivač za standard ISO 15189. 2008. g. aktivno se uključuje u rad Agencije za akreditaciju ZU i kao njen spoljašnji ocenjivač. 2011.g. postaje član Radne grupe za akreditaciju i ISO/CEN standarde pri EFLM. Od 2008. g. je član Instituta za standardizaciju, a od oktobra 2013.g. član Komisije za standarde iz oblasti laboratorijske medicine.

Kao autor ili koautor objavila je 14 radova u celini i preko 20 sažetaka koji su objavljeni u časopisima sa SCI liste. Tematika radova se odnosi na ispitivanje biohemijskih i parametara hemostaze za procenu i praćenje intenziteta inflamacije kod pacijenata sa sepsom kao i u trudnoći. Učesnik je i organizator većeg broja skupova na temu akreditacije i menadžmenta sistemom kvaliteta u medicinskim laboratorijama i zdravstvenim ustanovama.

**Прилог 1.**

**Изјава о ауторству**

Потписани-а Водник Татјана  
број индекса \_\_\_\_\_

**Изјављујем**

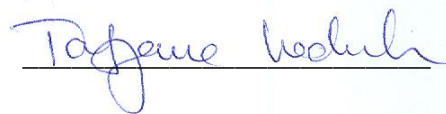
да је докторска дисертација под насловом

Значај преоперативног и постоперативног одређивања биомаркера сепсе за дијагнозу и прогнозу интраабдоминалних инфекција

- резултат сопственог истраживачког рада,
- да предложена дисертација у целини ни у деловима није била предложена за добијање било које дипломе према студијским програмима других високошколских установа,
- да су резултати коректно наведени и
- да нисам кршио/ла ауторска права и користио интелектуалну својину других лица.

**Потпис докторанда**

У Београду, 12. фебруара 2014.г.

  
\_\_\_\_\_

**Прилог 2.**

**Изјава о истоветности штампане и електронске верзије  
докторског рада**

Име и презиме аутора Водник Татјана

Број индекса \_\_\_\_\_

Студијски програм Медицинска биохемија

Наслов рада Значај преоперативног и постоперативног одређивања биомаркера сепсе за дијагнозу и прогнозу интраабдоминалних инфекција

Ментор Проф др Нада Мајкић - Singh

Потписани/а Водник Татјана

Изјављујем да је штампана верзија мог докторског рада истоветна електронској верзији коју сам предао/ла за објављивање на порталу **Дигиталног репозиторијума Универзитета у Београду**.

Дозвољавам да се објаве моји лични подаци везани за добијање академског звања доктора наука, као што су име и презиме, година и место рођења и датум одбране рада.

Ови лични подаци могу се објавити на мрежним страницама дигиталне библиотеке, у електронском каталогу и у публикацијама Универзитета у Београду.

**Потпис докторанда**

У Београду, 12. фебруара 2014.г.

Татјана Водник

### Прилог 3.

## Изјава о коришћењу

Овлашћујем Универзитетску библиотеку „Светозар Марковић“ да у Дигитални репозиторијум Универзитета у Београду унесе моју докторску дисертацију под насловом:

Значај преоперативног и постоперативног одређивања биомаркера сепсе за дијагнозу и прогнозу интраабдоминалних инфекција

која је моје ауторско дело.

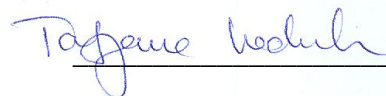
Дисертацију са свим прилозима предао/ла сам у електронском формату погодном за трајно архивирање.

Моју докторску дисертацију похрањену у Дигитални репозиторијум Универзитета у Београду могу да користе сви који поштују одредбе садржане у одабраном типу лиценце Креативне заједнице (Creative Commons) за коју сам се одлучио/ла.

1. Ауторство
2. Ауторство – некомерцијално
3. Ауторство – некомерцијално – без прераде
4. Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима
5. Ауторство – без прераде
6. Ауторство – делити под истим условима

**Потпис докторанда**

У Београду, 12. фебруара 2014.г.



Tamas Kocub