

UNIVERZITET U NOVOM SADU

Medicinski fakultet

Doktorske studije



**PROGNOSTIČKI ZNAČAJ ODREĐIVANJA KONCENTRACIJA  
CITOKINA ČLANOVA SUPERFAMILIJE TUMOR NEKROZIS  
FAKTORA ALFA KOD OBOLELIH OD SEPSE**

DOKTORSKA DISERTACIJA

Mentor: prof. dr Snežana Brkić

Kandidat: asist. dr Dajana Lendak

Novi Sad, 2015. godina

**UNIVERZITET U NOVOM SADU  
MEDICINSKI FAKULTET**

**KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA**

Redni broj: RBR	
Identifikacioni broj: IBR	
Tip dokumentacije: TD	Monografska dokumentacija
Tip zapisa: TZ	Tekstualni štampani materijal
Vrsta rada (dipl., mag., dokt.): VR	Doktorska disertacija
Ime i prezime autora: AU	Dajana Lendak
Mentor (titula, ime, prezime, zvanje): MN	prof. dr Snežana Brkić, redovni profesor Medicinskog fakulteta u Novom Sadu
Naslov rada: NR	Prognostički značaj određivanja koncentracija citokina članova superfamilije tumor nekroze faktora alfa kod obolelih od sepse
Jezik publikacije: JP	srpski (latinica)
Jezik izvoda: JI	srp. / eng.
Zemlja publikovanja: ZP	Srbija
Uže geografsko područje: UGP	Vojvodina
Godina: GO	2015
Izdavač: IZ	autorski reprint
Mesto i adresa: MA	21000 Novi Sad, Hajduk Veljkova 3

Fizički opis rada: FO	(broj poglavlja 9/ stranica 135/ slika 5/ grafikona 28 / tabela 30/ referenci 132/ priloga 2)
Naučna oblast: NO	Medicina
Naučna disciplina: ND	Infektivne bolesti
Predmetna odrednica, ključne reči: PO	Faktor tumorske nekroze-alfa; B-limfociti; Biološki markeri; Član 13 super porodice tumorske nekroze; Faktor aktivacije B ćelija; Transmembranski aktivator i CAML interaktivni protein; Prognoza
UDK	616.94-097-037
Čuva se: ČU	U Biblioteci Medicinskog fakulteta u Novom Sadu, 21000 Novi Sad, Srbija, Hajduk Veljkova 3
Važna napomena: VN	

Izvod: IZ

Uvod: Nespecifičnost kliničke slike sepse, velike individualne razlike u odgovoru organizma na infekciju kao i neophodnost adekvatne inicijalne procene težine kliničke slike, toka i ishoda bolesti, čine istraživanja biomarkera koji bi doprineli pravovremenom postavljanju dijagnoze i adekvatnoj prognozi bolesti izuzetno značajnim. Do sada je ispitivano preko 200 biomarkera od kojih ni jedan nije pokazao zadovoljavajuću senzitivnost i specifičnost. Uloga B limfocita u patogenezi sepse pri tome je nedovoljno istražena. Članovi superfamilije tumor-nekrozis faktora alfa: *A proliferation inducing ligand* (APRIL), *Bcell activating factor* (BAFF) i solubilni *transmembrane activator and calcium modulator cyclophilin ligand interactor* (sTACI) su citokini koji imaju ključnu ulogu u homeostazi B limfocita.

Cilj istraživanja bio je da se ispita dijagnostički i prognostički značaj citokina članova superfamilije tumor nekrozis faktora alfa (APRIL, BAFF, sTACI) za procenu težine kliničke slike, razvoja multiorganske disfunkcije (MODS) u prvih 48h hospitalizacije i letalnog ishoda sepse.

Ispitanici i metode: Istraživanjem je obuhvaćeno 150 obolelih od sepse lečenih na Klinici za infektivne bolesti i Odeljenju anestezije i reanimacije Kliničkog centra Vojvodine i 30 zdravih dobrovoljnih davalaca krvi. Kod svih bolesnika evidentirani su demografski i ostali podaci iz istorije bolesti kao i laboratorijske analize u okviru rutinske dijagnostike sepse. Iz dodatnih 5ml venske krvi svim ispitanicima određene su koncentracije APRIL-a, BAFF-a, sTACI-ja ELISA metodom komercijalnim testovima proizvođača R&D Systems.

Rezultati pokazuju da su koncentracije sva tri citokina (APRIL, BAFF i sTACI) statistički značajno povišene kod obolelih od sepse u odnosu na zdravu populaciju

( $p < 0.001$ ), pri čemu APRIL pokazuje najveću senzitivnost (99%) i specifičnost (97%). Najveći dijagnostički značaj BAFF-a ogleda se u sposobnosti distinkcije između sepsi uzrokovanih Gram pozitivnim i Gram negativnim bakterijama ( $p = 0,03$ ). U predikciji razvoja MODS-a i letalnog ishoda sepse multivarijantnom regresionom analizom kao nezavisni prediktori pokazali su se jedino antiinflamatorni biomarker sTACI receptor i klinička procena pacijenta iskazana kroz APACHE II i SOFA skor. Senzitivnost i specifičnost sTACI receptora u predikciji razvoja MODS-a i letalnog ishoda daleko nadmašuje do sada rutinski korišćen prokalcitonin.

Zaključak: Dobijeni rezultati ukazuju na to da su citokini koji učestvuju u regulaciji funkcije B limfocita značajni dijagnostički i prognostički parametri u sepsi.

Predominacija antiinflamatornog odgovora na koju ukazuju povišene koncentracije sTACI receptora pokazala se pored APACHE II i SOFA skora kao jedini nezavisni prediktor razvoja MODS-a i letalnog ishoda septičnih bolesnika. Neophodna su dalja istraživanja u pravcu određivanja momenta kada u imunskom odgovoru organizam prelazi iz stanja dominacije proniflamatornog u dominaciju antiinflamatornog odgovora radi pravovremenog reagovanja imunomodulatornom terapijom.

Datum prihvatanja teme od strane NN veća: DP	
Datum odbrane: DO	
Članovi komisije: (ime i prezime / titula / zvanje / naziv organizacije / status) KO	predsednik: član: član:

University of Novi Sad  
ACIMSI  
Key word documentation

Accession number: ANO	
Identification number: INO	
Document type: DT	Monograph documentation
Type of record: TR	Textual printed material
Contents code: CC	PhD Thesis
Author: AU	Dajana Lendak, MD, teaching assistant
Mentor: MN	Prof. Snežana Brkić, MD, PhD
Title: TI	Concentrations of the tumor necrosis factor alfa superfamily members as a prognostic factors in sepsis
Language of text: LT	Serbian
Language of abstract: LA	eng. / srp.
Country of publication: CP	Serbia
Locality of publication: LP	Vojvodina
Publication year: PY	2015
Publisher: PU	Author reprint
Publication place: PP	21000 Novi Sad, Serbia, Hajduk Veljkova 3

Physical description: PD	Chapters 9/ pages 135/ pictures 5 / figures 28 / tables 30/ references 132 / annex 2
Scientific field SF	Medicine
Scientific discipline SD	Infectious diseases
Subject, Key words SKW	Sepsis; Tumor Necrosis Factor-alpha; B-Lymphocytes; Biological Markers; Tumor Necrosis Superfamily Member 13; B-Cell Activating Factor; Transmembrane Activator and CAML Interactor Protein; Prognosis
UC	616.94-097-037
Holding data: HD	Library of Medical Faculty Novi Sad, 21000 Novi Sad, Serbia, Hajduk Veljkova 3
Note: N	

**Abstract: AB**

Introduction: The nonspecific clinical presentation of sepsis and great individual response variations, as well as huge significance of adequate early prognosis of its clinical course and outcome made sepsis biomarkers research extremely significant. The properties of more than 200 biomarkers have been evaluated for prognostic value, but none have adequate specificity and sensitivity. The role of the B cells in sepsis pathogenesis also remains unclear. Tumor necrosis factor alpha (TNF- $\alpha$ ) superfamily members: *A proliferation inducing ligand* (APRIL), *Bcell activating factor* (BAFF) and soluble *transmembrane activator and calcium modulator cyclophilin ligand interactor* (sTACI) are key factors in B cell biology.

The aim of the study was to evaluate the diagnostic and prognostic significance of determining the concentrations of tumor necrosis factor alpha superfamily members for the prediction of MODS development in the first 48h of hospitalization as well as outcome prediction.

Subjects and methods: The study included 150 patients suffering from sepsis treated at the Clinic for infectious diseases and Department for anesthesiology and reanimatology of the Clinical center of Vojvodina, and 30 healthy volunteer blood donors. The demographic and other data regarding routine blood analysis performed during sepsis treatment of the patients has been acquired from their hospitalization documentation. Additional 5 ml of venous blood was taken from the patients and the concentrations of APRIL, BAFF and sTACI have been determined using the ELISA method by using R&D Systems commercial kit's.

Results: There is a statistically significant difference in concentrations of APRIL, BAFF and sTACI between healthy blood donors and septic patients ( $p < 0.001$ ). APRIL showed the highest sensitivity (99%) and specificity (97%) in distinguishing sepsis from healthy subjects. BAFF showed statistically significant higher concentrations in Gram positive than in Gram negative sepsis ( $p = 0.03$ ). In the multivariate logistic regression analysis, only anti-inflammatory cytokine sTACI and APACHE II or SOFA score remained significant predictors of MODS and lethal outcome. sTACI showed greater sensitivity and specificity for MODS and outcome prediction than the widely used procalcitonin.

Conclusions: The concentrations of TNF superfamily members, the main regulators of B cell function, have a significant diagnostic and prognostic value in predicting sepsis course and outcome. The predomination of the anti-inflammatory response, as being pointed out by elevated concentrations of sTACI receptors, has proved to be the only independent predictor, besides APACHE II and SOFA score, in MODS and lethal outcome development in sepsis. Further research is needed in order to accurately determine the exact moment when the immunological response shifts from the predominance of the pro-inflammatory response to the predominance of the anti-inflammatory response, so as to ensure the timely application of therapy that modulates the immunological response.

Accepted on Scientific Board on: AS	
Defended: DE	
Thesis Defend Board: DB	<p>president:</p> <p>member:</p> <p>member:</p>

*“The mediocre teacher tells.  
The good teacher explains.  
The superior teacher demonstrates.  
The great teacher inspires.”*

*William Arthur Ward*

*Ogromno hvala mentorki, na inspiraciji, podršci svim mojim idejama i razmišljanjima, i na “vetru u leđa” kad god zapnem.*

*Veliku zahvalnost dugujem i prof. dr Aleksandri Novakov-Mikić, bez čije bi otvorenosti za nove ideje put ka realizaciji ovog rada bio značajno teži.*

*Hvala prof. dr Tatjani Čebović na velikoj stručnoj pomoći prilikom izvođenja eksperimentalnog dela istraživanja.*

*Posebno se zahvaljujem prof. dr Milanu Ubaviću i osoblju laboratorije “Medlab” čija mi je pomoć prilikom izvođenja laboratorijskih analiza za deo rezultata veoma mnogo značila.*

*Želim da se zahvalim i Ivani i Ljubi na velikom doprinosu prilikom tenhičkog izvođenja laboratorijskih analiza.*

*Zahvaljujem se svom osoblju Klinike za infektivne bolesti i Odeljenja anestezije i reanimacije Urgentnog centra KCV, a posebno prof. dr Miltoki Fabri i dr Anici Ilić-Jajić na saradnji prilikom sakupljanja uzorka.*

*Veliko hvala asist. dr Dunji Mihajlović, mom najbližem saradniku i prijatelju na svim korisnim “raspravama” prilikom osmišljavanja, izvođenja i pisanja disertacije.*

*I ogromno hvala mojim roditeljima na bezrezervnoj ljubavi, razumevanju i podršci koju su mi pružili tokom školovanja, i na svim životnim načelima kojima su me naučili.*



# SADRŽAJ

<b>1</b>	<b>UVOD</b> .....	<b>1</b>
1.1	Definicija sepse.....	1
1.2	Epidemiologija.....	4
1.3	Etiologija.....	6
1.4	Patogeneza .....	7
1.4.1	Imunopatogeneza sepse .....	7
1.4.2	Uloga B-limfocita u patogenezi sepse .....	12
1.4.3	Članovi superfamilije TNF/TNFR.....	18
1.5	Biomarkeri sepse .....	22
<b>2</b>	<b>CILJEVI</b> .....	<b>27</b>
<b>3</b>	<b>HIPOTEZE</b> .....	<b>27</b>
<b>4</b>	<b>ISPITANICI I METODE</b> .....	<b>28</b>
4.1	Kriterijumi za uključivanje u studiju .....	29
4.2	Kriterijumi za neuključivanje u studiju.....	30
4.3	Ispitivani parametri.....	30
4.4	Statistička obrada podataka.....	36
<b>5</b>	<b>REZULTATI</b> .....	<b>38</b>
5.1	Faktori rizika od strane domaćina .....	43
5.2	Dužina trajanja bolesti pre hospitalizacije .....	45
5.3	APACHE II i SOFA skor.....	47
5.4	Rutinski laboratorijski parametri .....	49

5.5	Markeri članovi superfamilije TNF-a .....	54
5.5.1	Dijagnostički značaj koncentracija citokina članova superfamilije TNF-a .....	54
5.5.2	Prognostički značaj koncentracija citokina članova superfamilije TNF-a.....	58
5.6	Komponente komplementa .....	70
5.7	Korelacije koncentracija komponenti komplementa i članova superfamilije TNF-a .....	77
5.8	Koncentracije imunoglobulina.....	78
5.9	Prediktori razvoja MODS-a .....	81
5.10	Prediktori letalnog ishoda .....	86
<b>6</b>	<b>DISKUSIJA.....</b>	<b>91</b>
<b>7</b>	<b>ZAKLJUČCI.....</b>	<b>115</b>
<b>8</b>	<b>PRILOZI .....</b>	<b>117</b>
<b>9</b>	<b>LITERATURA.....</b>	<b>119</b>

# 1 UVOD

Još od antičkih vremena kada je sepsa prvi put prepoznata kao ozbiljan zdravstveni problem, ovaj sindrom okupira pažnju kako sa kliničkog tako i sa istraživačkog aspekta. Uprkos sve većem broju naučnih saznanja i široko primenjivanim merama intenzivne terapije uz adekvatnu antibiotsku terapiju, smrtnost od ovog oboljenja još uvek je visoka. Kamen spoticanja u lečenju sepse predstavljaju pre svega nedovoljno rasvetljenja pitanja patogenetskih zbivanja, iz kojih dalje proizilaze problemi u preciznom definisanju pojma sepse, kao i u terapijskom pristupu.

## 1.1 Definicija sepse

Iako prepoznata još u doba Hipokrata, prva zvanična definicija sepse data je tek 1992. godine na sastanku *American College of Chest Physicians* i *Society of Critical Care Medicine (ACCP/SCCM Consensus Conference Committee)* (1). Prema predloženoj definiciji sepsa predstavlja sistemski inflamatorni odgovor (SIRS) na infekciju. Za postavljanje dijagnoze sepse potrebno je da bolesnik ispunjava dva od četiri SIRS kriterijuma (telesna temperatura  $>38^{\circ}\text{C}$  ili  $<36^{\circ}\text{C}$ , srčana frekvencija  $>90/\text{min}$ , frekvencija disanja  $>20/\text{min}$  ili  $\text{PaCO}_2 <32\text{mmHg}$ , broj leukocita  $>12 \times 10^9$  ćelija/l ili  $<4 \times 10^9$  ćelija/l ili  $>10\%$  nezrelih oblika) uz suspektnu ili dokazanu infekciju (1). Prednost date definicije leži u njenoj jednostavnosti, ali su tokom rutinskog rada uočeni i njeni nedostaci, pre svega nedovoljna specifičnost (2,3), te se javila potreba za njenom revizijom što je i učinjeno 2001. godine na konsenzus konferenciji *Society of Critical Care*

*Medicine, The European Society of Intensive Care Medicine, The American College of Chest Physicians, The American Thoracic Society i The Surgical Infection Society (SCCM/ESICM/ACCP/ATS/SIS) (4), a zatim i 2012. godine u okviru Surviving sepsis campaign (5). Novije definicije rezultat su boljeg razumevanja patogeneze sepse i pored navedenih kriterijuma uključuju i:*

- laboratorijske parametre inflamacije
  - porast vrednosti C-reaktivnog proteina (CRP) za 2 standardne devijacije (SD) iznad referentnih vrednosti
  - porast vrednosti prokalcitonina (PCT) za 2SD iznad referentnih vrednosti
- hemodinamske pokazatelje
  - arterijska hipotenzija (sistolni pritisak <90mmHg; srednji arterijski pritisak <70mmHg ili pad sistolnog arterijskog pritiska za 40mmHg kod odraslih, ili pad za 2SD u odnosu na referentni opseg za godine života)
  - saturacija kiseonikom mešane venske krvi (SvO<sub>2</sub>) >70%
  - srčani indeks >3,5 l/min/m<sup>2</sup>
- pokazatelje disfunkcije organa
  - akutna oligurija (<0,5ml/kg/h tokom dva sata, uprkos adekvatnoj nadoknadi tečnostima) ili pozitivan bilans tečnosti >20ml/kg tokom 24h ili porast kreatinina ≥44,2 μmol/l u odnosu na bazalne vrednosti ili prisustvo značajnih edema
  - hiperbilirubinemija (ukupni bilirubin >70μmol/l)
  - hiperglikemija >7,7mmol/l u odsustvu diabetes melitusa
  - patološke vrednosti parametara koagulacije (*international normalized ratio* (INR) >1,5 ili PTT>60s)

- trombocitopenija (broj trombocita  $<100,000/\mu\text{l}$ )
- arterijska hipoksemija ( $\text{PaO}_2/\text{FiO}_2 <300$ )
- ileus (odsustvo čujne peristaltike)
- pokazatelje tkivne hipoperfuzije
  - povišene vrednosti laktata ( $>1\text{mmol/l}$  prema *Surviving Sepsis Campaign* odnosno  $>3\text{mmol/l}$  prema *SCCM/ESICM/ACCP/ATS/SIS*)
  - smanjeno kapilarno punjenje (4,5).

Definicije težih oblika bolesti ne razlikuju se značajno od inicijalno datih preporuka. Teška sepsa predstavlja sepsu udruženu sa hipotenzijom ili disfunkcijom organa koja se definiše kao vrednost *Sequential Organ Failure Assessment* (SOFA) skora veća ili jednaka sa 2, za sistem organa čija se funkcija procenjuje. SOFA skor konstruisan je upravo radi objektivizacije i kvantifikacije stepena disfunkcije ili insuficijencije organskih sistema na osnovu stepena odstupanja vrednosti parametara funkcije datog sistema od referentnih vrednosti (6). U vrednost SOFA skora ulaze numerički parametri funkcije respiratornog, kardiovaskularnog, bubrežnog, centralnog nervnog sistema, hepatobilijarnog trakta i koagulacionog sistema (Prilog 1).

Septičkim šokom smatra se sepsom indukovana hipotenzija koja perzistira uprkos adekvatnoj nadoknadi cirkulatornog volumena, odnosno kao stanje koje je praćeno laktatnom acidozom ili hipoperfuzijom organa, a koje se ne može poboljšati intravenskom nadoknadom tečnosti (1,4,5).

Osnovni nedostatak novijih definicija je njihova kompleksnost koja otežava implementaciju u rutinsku kliničku praksu. Redefinisanje pojma sepse pri tom nije donelo očekivano povećanje specifičnosti u odnosu na definiciju iz 1992. godine. Upravo iz tih razloga u novijoj literaturi se pojavljuju predlozi za reviziju datih definicija (3), što će sigurno biti i urađeno kao rezultat dinamičnog procesa implementacije novih naučnih dostignuća. Do tada važeće definicije ostaju u širokoj kako naučnoj tako i stručnoj upotrebi, jer bolje za sada ne postoje (7).

## **1.2 Epidemiologija**

Iz različitosti definicija proizilaze i razlike u epidemiološkim podacima objavljenim u studijama širom sveta. Sve epidemiološke procene su pri tom zasnovane na podacima iz razvijenih zemalja, s obzirom na manjkavost epidemioloških podataka iz zemalja u razvoju i nerazvijenih zemalja. Postoje podaci koji govore da od svih indikacija za hospitalizaciju sepsa čini čak 2%, tj. svaki pedeseti čovek koji je primljen na bolničko lečenje biva primljen zbog sepse (7). Veliki broj ovih bolesnika, oko 50%, zbog težine bolesti biva primljeno u jedinice intenzivnog lečenja (JIL). Stoga ne čudi podatak da je sepsa uzrok 6-30% prijema u JIL (7). Ovaj procenat varira zbog različite prirode jedinica intenzivnog lečenja, pri čemu se manji procenat sepse beleži u kardiološkim JIL, u odnosu na JIL koje hospitalizuju na primer traumatizovane bolesnike gde je taj procenat svakako veći. Veliki broj epidemioloških izveštaja beleži porast incidencije sepse u poslednje dve decenije (7).

U odnosu na primenjene kriterijume za definiciju sepse, smrtnost u jedinicama intenzivnog lečenja (JIL) varira od 30% do 60%. Sve studije saglasne su sa činjenicom da u jedinicama intenzivnog lečenja širom Evrope i severne Amerike sepsa predstavlja vodeći uzrok smrti (8). Ništa manje ne variraju ni podaci iz studija koje se bave procenom globalne incidence i mortaliteta na nivou populacije. Najnoviji podaci sistematskog pregleda epidemioloških studija koje se bave globalnom procenom na nivou populacije saopšteni na 35. Internacionalnom simpozijumu intenzivne nege i urgentne medicine održanom u Briselu u martu ove godine iznose sledeće procene:

- incidencija sepse je u porastu: sa 256/100,000 pacijenata godišnje u periodu do 2003. godine na 427/100.000 osoba godišnje koliko se beleži u poslednjih 10 godina. Takođe, zabeležen je i porast incidencije teške sepse sa 151/100.000 na 331/100.000 osoba godišnje.
- Ekstrapolacijom navedenih podataka godišnja globalna procena u apsolutnim vrednostima iznosi 30.700.000 slučajeva sepse i 23.800.000 slučajeva teške sepse godišnje.
- Procene mortaliteta na nivou populacije manje su od mortaliteta u JIL i iznose 15% za sepsu i 25% za tešku sepsu.
- Ekstrapolacijom dolazi se do brojke od 6.000.000 smrtnih slučajeva uzrokovanih sepsom godišnje, na globalnom nivou (9).

Uprkos procentualnom smanjenju mortaliteta, kontinuirani porast incidencije dovodi do povećanja apsolutnog broja bolesnika umrlih od sepse iz godine u godinu. U Sjedinjenim Američkim Državama sepsa predstavlja deseti vodeći uzrok smrti, u rangu sa infarktom

miokarda, i daleko ispred broja smrtnih ishoda uzrokovanih HIV infekcijom i karcinomom dojke (7).

### 1.3 Etiologija

Razvoj sistema zdravstvene zaštite u celini pored promene u incidenciji i mortalitetu doneo je i promene u strukturi mikrobioloških uzročnika sepse. Naime, produženje životnog veka i sve bolja kontrola hroničnih bolesti dovela je do povećanja procentualnog učešća osoba sa narušenim imunološkim odgovorom. Prosečna starost obolelih od sepse iznosi 60 godina. Stoga se u današnje vreme beleži sve veća učestalost sepsi uzrokovanih komensalnom florom (*Enterococcus spp*, *Acinetobacter spp*, *Stenotrophomonas spp*, *Candida spp...*), u odnosu na ranije beležene striktno patogene uzročnike: *Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus grupe A*, *Staphylococcus aureus*, *Hemophilus influenzae*, *Neisseria meningitidis* i bakterije iz roda *Salmonella*. Za razliku od prethodnog perioda, sada se beleži i sve veća učestalost Gram pozitivnih u odnosu na Gram negativne uzročnike. Najčešće izolovane bakterije u današnje vreme su *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus spp. koagulaza-negativni* i bakterije iz roda *Enterococcus*. Nije zanemarljivo pomenuti ni sve veći broj sepsi uzrokovanih gljivicama iz roda *Candida*. Ipak, kod 30-50% bolesnika mikrobiološki uzročnik ne bude potvrđen ni hemokulturom ni kulturom sa mesta ishodišta sepse (7,10,11).



## 1.4 Patogeneza

Uprkos brojnim istraživanjima kako bazičnih nauka tako i kliničkih ispitivanja, patogeneza sepse ostala je nedovoljno poznata. Poteškoće u razumevanju patogenetskih procesa proizilaze u velikoj meri od kompleksnosti reakcija koje su pokrenute istovremeno na različitim nivoima homeostaznih mehanizama i različitog su intenziteta, a koje uključuju reakciju imunološkog sistema, promene na endotelu, poremećaje u koagulacionoj kaskadi, neuroendokrinu aktivaciju, oslobađanje velike količine kiseoničnih radikala, kao i međusobne interakcije svih ovih procesa i njihovo zajedničko delovanje na organe i sisteme organa, koja može da dovede do disfunkcije mehanizmima hipoksije, smanjene tkivne potrošnje kiseonika, metaboličkim poremećajima, kongestijom ili toksičnim oštećenjima (12,13).

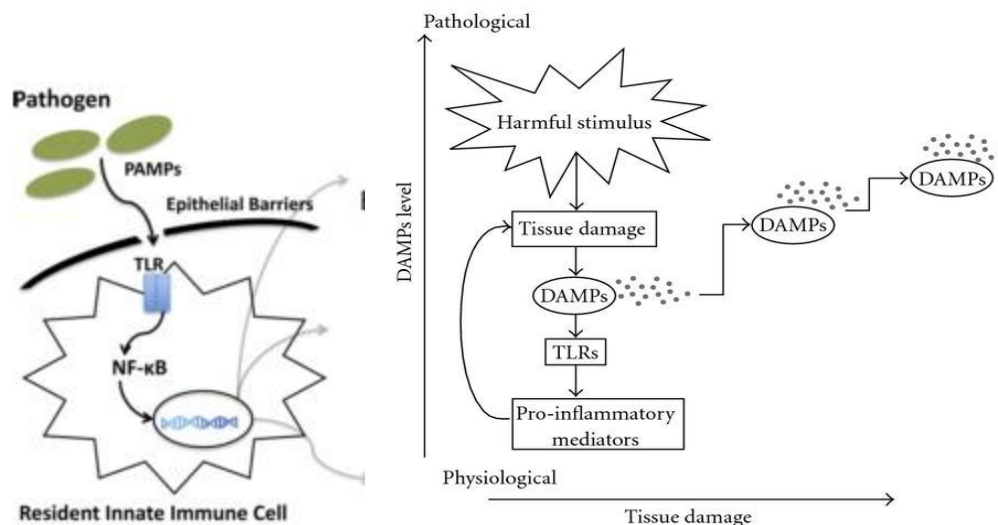
### 1.4.1 Imunopatogeneza sepse

Kako to u nauci često biva, prva saznanja koja nisu u skladu sa važećom dogmom često ostaju neprepoznata od strane savremenika. Tako i zaključak Wiliama Oslera (1849–1919) da „pacijenti umiru od posledica reakcije organizma na infekciju pre nego od infekcije same po sebi“ (7) nije naišao na razumevanje šire naučne javnosti, i sve do kasnih osamdesetih godina dvadesetog veka pažnja istraživača bila je usmerena ka uzročniku i pokušaju zaustavljanja njegovog širenja i prodora u krvotok (14). Ceo koncept patogeneze sepse zasnivao se na teoriji o „trovanju krvi“ mikrobiološkim uzročnicima (7). Tek kasnih 80-ih sa otkrićem patogenetske uloge tumor nekroze faktora (TNF), interleukina (IL) i ostalih citokina i medijatora inflamatornog odgovora, dolazi do preusmeravanja pažnje istraživača na ulogu imunog sistema u

odgovoru na prisustvo mikroorganizma, pri čemu je upravo reakcija imunog sistema prepoznata kao ključni faktor od kojeg zavisi dalji tok i ishod bolesti (14), čime je potvrđena Oslerova pretpostavka data čitavo stoleće ranije. Savremene definicije prepoznaju sepsu kao heterogeni sindrom čiji nastanak, prezentacija i ishod zavise od interakcije domaćina i patogena (15,16). Brojna istraživanja pokazala su da kvalitet i kvantitet imunog odgovora imaju mnogo veći uticaj na tok i ishod bakterijskih infekcija nego osobine samog uzročnika. Koji faktori određuju karakter tog odgovora još uvek je nedovoljno poznato. Pretpostavlja se da su u pitanju pre svega genetski faktori, a zatim i starost bolesnika, njegov nutritivni status, kao i prisustvo komorbiditeta (14–16). Interesantan podatak iznose Sorensen i saradnici koji navode da je uticaj genetskih faktora na ishod bolesti veći kod infekcija nego kod kardiovaskularnih bolesti. Naime, rezultati njihovog istraživanja pokazuju da usvojena deca čiji su biološki roditelji umrli od infekcije imaju 5,8 puta veći rizik od umiranja od infekcije u odnosu na opštu populaciju, dok je za kardiovaskularne bolesti taj rizik 4,5 puta povišen (17).

Kada dođe do proboja mikroorganizma kroz epitelnu barijeru on biva prepoznat od strane antigen prezentujućih ćelija (APĆ): tkivnih makrofaga, dendritičnih ćelija i monocita zahvaljujući ekspresiji takozvanih *pattern-recognition receptors (PRR)*. PRR prepoznaju sastavne delove mikroorganizma (lipopolisahard (LPS) ćelijskog zida Gram negativnih bakterija, peptidoglikan Gram pozitivnih bakterija, lipopeptid flagela, bakterijsku DNK i dr. koji se jednim imenom označavaju kao *pathogen-associated molecular patterns (PAMPs)*. Interakcija PAMP i PRR (na prvom mestu *toll-like* receptora 4 (TLR4)) aktivira serin fosfokinazu koja pokreće reakcije oksidacije sa ciljem da se aktivira nuklearni faktor- $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B). Aktivacija NF- $\kappa$ B promoviše transkripciju gena za sekreciju medijatora inflamatornog odgovora (citokina, hemokina, alarmina) čime je pokrenuta kaskada imunološkog odgovora na infekciju (11,18).

Endogeni molekuli sekretovani u ovom inicijalnom odgovoru (alarmini), zajedno sa egzogenim molekulima patogena (PAMPs) vrše dalju stimulaciju sekrecije citokina, takođe putem interakcije sa TLR4. Endogeni alarmini i egzogeni PAMPs jednim imenom nazivaju se *damage-associated molecular patterns (DAMPs)* (Slika 1). Zbog velike količine kvantitativno i kvalitativno različitih citokina sekretovanih od strane APC patofiziološki proces sekrecije ovih signalnih molekula simbolčno je nazvan „oluja citokina“ (19). U prvom redu dokazane su povišene koncentracije tumor nekrosis faktora alfa (TNF- $\alpha$ ), interleukina 1-beta (IL-1 $\beta$ ) i interleukina-6 (IL-6) kao glavnih proinflamatornih citokina i pokazano da njihove koncentracije značajno koreliraju sa težinom kliničke slike sepse i sa smrtnim ishodom (18). Pored ova tri, proinflamatornim citokinima sekretovanim od strane APC smatraju se još i interferon-gama (IFN- $\gamma$ ), interleukin 8 (IL-8), *monocyte chemoattractant protein-1* (MCP-1) i mnogi drugi (19).



Slika 1. Mehanizam reagovanja ćelija urođenog imuniteta na prisustvo patogena (20,21)

U zavisnosti od za sada nedovoljno ispitanih faktora domaćina i osobina uzročnika i njihove međusobne interakcije, prvobitna sekrecija proinflammatoryh citokina može da se zaustavi na lokalnom nivou, ili da izazove sistemski inflamatorni odgovor, koji pored aktivacije urođenog i stečenog imuniteta, paralelno i istovremeno uključuje i aktivaciju drugih homeostaznih sistema: sistema komplementa, oštećenje endotela, pokretanje koagulacione kaskade, te pokretanje neuroendokrinog odgovora na sistemsku inflamaciju. Poteškoće u razumevanju patogeneze sepse proizilaze upravo iz kompleksnosti reakcija koje se pokreću i odvijaju paralelno i istovremeno različitim mehanizmima.

S obzirom na činjenicu da je lanac patogenetskih zbivanja u sepsi pokrenut sekrecijom proinflammatoryh citokina, prvi pokušaji terapijskog delovanja bili su usmereni ka antiinflamatornoj terapiji i pokušaju zaustavljanja samooštećenja organizma uzrokovanog „olujom“ proinflammatoryh citokina (14,18,19). Nakon prvobitnih ohrabrujućih rezultata zabeleženih na animalnim modelima, pokušana je primena antagonista TNF- $\alpha$  i IL-1, blokada TLR4 i antagonista endotoksina na humanoj populaciji. Sprovedeno je 30-ak kliničkih istraživanja koja nisu dala zadovoljavajuće rezultate. Naprotiv, neke studije čak beleže lošiji ishod kod bolesnika lečenih antiinflamatornom terapijom, u odnosu na pacijente kod kojih nije primenjivana imunomodulatorna terapija. Kod svega 10-ak procenata pacijenata zabeležen je pozitivan efekat antiinflamatorne terapije na tok i ishod bolesti (22).

Sa ciljem pokušaja pronalaska odgovora na pitanje zašto antiinflamatorna terapija nije dala očekivane rezultate nastavljena su istraživanja patogeneze sepse i postavljena je nova teorija o sepsi kao stanju u kojem je za visok mortalitet odgovorna pre svega imunosupresija koja nastaje kao posledica patogenetskih zbivanja tokom sepse, za čega postoje brojni dokazi. Iako

izvestan procenat pacijenata umire u prvih nekoliko dana od početka bolesti od posledica „oluje“ proinflammatoryh citokina, zahvaljujući resuscitacionim merama u JIL i intenzivnoj antibiotskoj terapiji veliki procenat bolesnika (>70%) preživi tu prvobitnu dominaciju proinflammatoryh odgovora (22). Kod ovih pacijenata zabeležene su česte superinfekcije oportunističkim bakterijama i gljivicama (*Enterococcus spp*, *Acinetobacter spp*, *Stenotrophomonas spp*, *Candida spp*) kao i reaktivacija virusa iz grupe herpes virusa kod prethodno imunokompetentnih osoba, što je dokaz da je imuni sistem kod takvih bolesnika suprimiran (22). Dalji dokazi za sepsu kao novonastalo „stanje imunoparalize“ kod imunokompetentnih osoba dolaze od otkrića da pojedini septični bolesnici gube sposobnost reagovanja po tipu kasne preosetljivosti. Još jedan dokaz pružaju post-mortem studije koje pokazuju da kod 76.6% obolelih od sepse septični fokus nije saniran (23). Opisano „stanje imunoparalize“ može se objasniti pre svega povišenim koncentracijama antiinflammatoryh citokina (interleukina-10 (IL-10), interleukina-4 (IL-4), solubilnih TNF receptora, IL-1 receptora i drugih), povišenim nivoima adrenalina i kortizola, aktivacijom antioksidativnog odgovora i smanjenom ekspresijom *human leukocyte antigen* (HLA-DR). Ovu teoriju potkrepljuje i tzv. stanje hibernacije ćelija imunog sistema te masivna apoptoza limfocita koja je takođe dokazana post-mortem studijama na pacijentima umrlim od sepse i koja se javlja podjednako u svim uzrasnim kategorijama septičnih bolesnika (22,24). Supresija imuniteta opisana je na gotovo svim ćelijama koje participiraju u imunom odgovoru (25).

Prvobitne studije na animalnim modelima pretpostavile su da sekrecija antiinflammatoryh citokina sledi nakon proinflammatoryh faze, međutim kasnija ispitivanja pokazala su da se kod ljudi taj proces dešava praktično istovremeno (22). Ipak, istraživači su saglasni sa činjenicom da je inicijalno nakon kontakta sa patogenom dominantan proinflammatoryh odgovor koji se

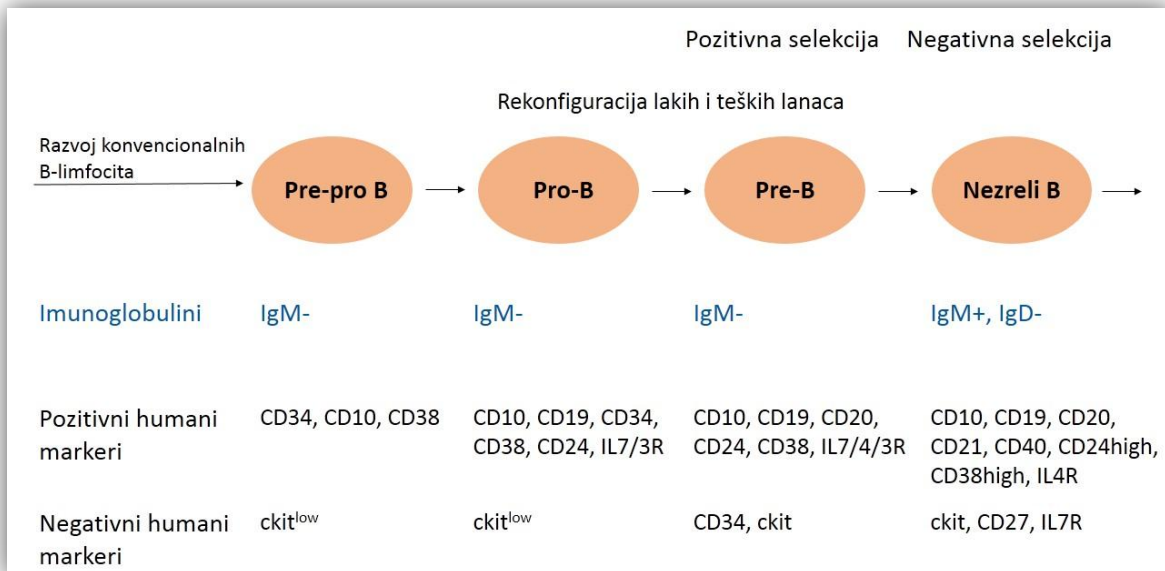
karakteriše simptomima povišene temperature, šoka i ubrzanim metabolizmom. Intenzitet proinflamatornog i antiinflamatornog odgovora kao i njihov međusobni odnos zavise od brojnih faktora uključujući uzrast bolesnika, prisutne komorbiditete, nutritivni status, kao i patogenost i virulenciju uzročnika (25). Stoga današnje teorije patogeneze sepse ističu potrebu za individualizacijom pristupa pacijentu obolelom od sepse, u smislu preciznih analiza koje bi odredile da li se bolesnikov imuni sistem u datom trenutku nalazi u fazi hiperinflamacije ili imunosupresije, radi dalje odluke od terapijskom pristupu (13,18,24,25).

Pokušaji imunostimulativne terapije faktorom stimulacije rasta kolonije granulocitno-monocitne loze (*granulocyte-macrophage colony-stimulating factor* – GM-CSF), zatim interleukinom-7 (IL-7) i interferonom- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) kod bolesnika za koje se pretpostavlja da su u fazi imunosupresije daju obećavajuće rezultate (22).

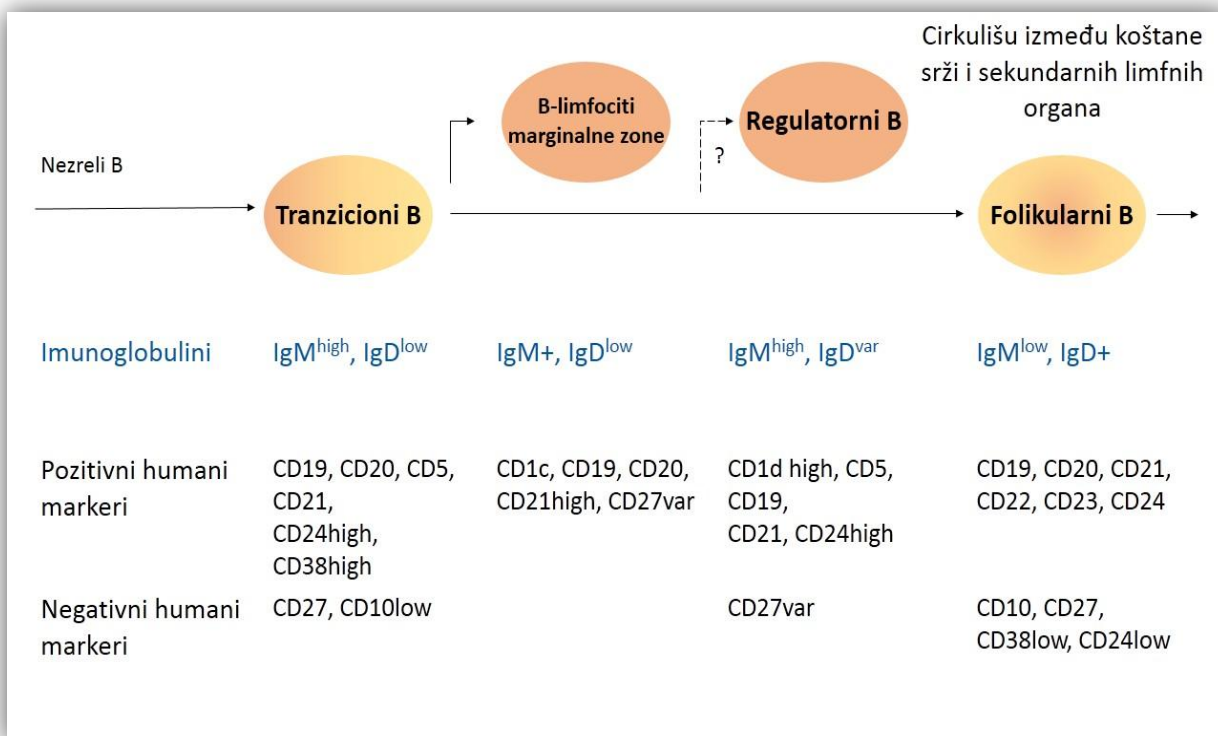
#### **1.4.2 Uloga B-limfocita u patogenezi sepse**

Tokom istraživanja patogeneze sepse, kao i funkcije imunog sistema u celini, godinama unazad akcenat je dominantno stavljan na ulogu urođenog imuniteta i T limfocita (22,26), dok je uloga B limfocita ostala na marginama (27). Najnovija istraživanja pokazuju da upravo B limfociti imaju jednu od ključnih uloga u patogenetskim zbivanjima odgovora na infekciju (28), ne samo kao efektorne ćelije specifičnog imuniteta koje sekretuju imunoglobuline, nego i kao imunoregulatorne ćelije koje sekrecijom citokina i svojom ulogom kao APC učestvuju u T-B kooperaciji, čime moduliraju imunološki odgovor na infekciju (27,29,30).

B limfociti od momenta nastanka do funkcionalne zrelosti prolaze kroz različite razvojne stadijume. Na slikama 2 i 3 prikazan je razvojni put B limfocita pre izlaganja antigenu, a na Slici 4 nakon prvog kontakta sa antigenom. Tokom sazrevanja i diferencijacije na njihovoj površini kao i intracelularno dolazi do ekspresije različitih molekula, što omogućava njihovu identifikaciju (slike 2, 3 i 4). S obzirom na različitosti humanih i animalnih modela na slikama su prikazani samo markeri koji su karakteristični za humane B limfocite.



Slika 2. Razvojni put B limfocita u kostnoj srži (31)



Slika 3. Razvojni put B limfocita od napuštanja kostne srži do kontakta sa antigenom (31)

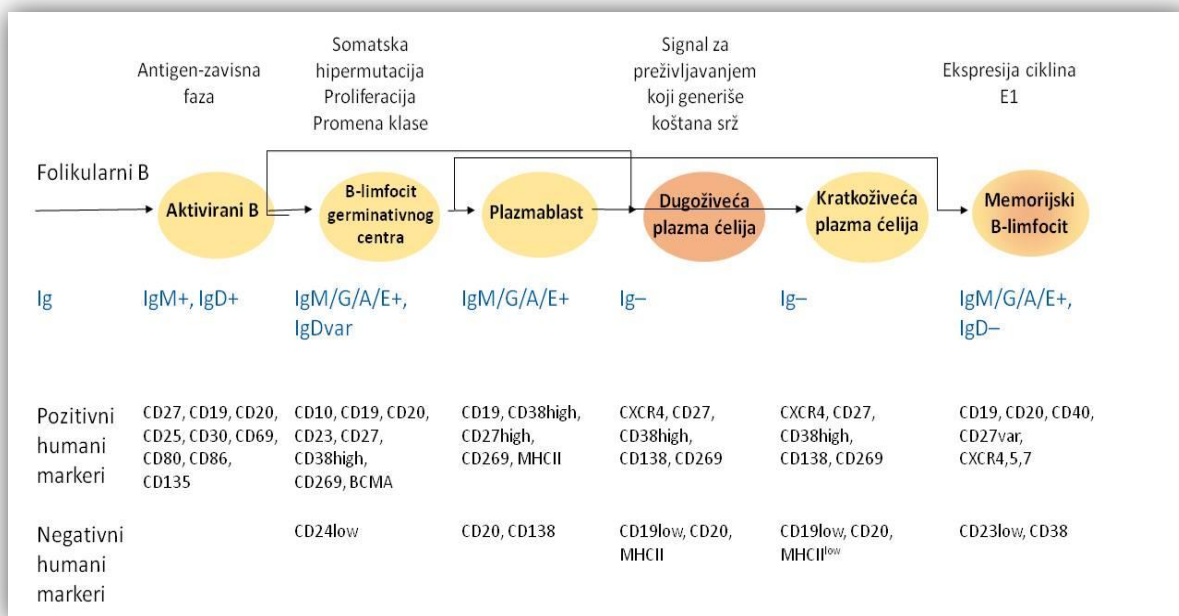
B limfociti potiču od zajedničke matične ćelije hematopoeze u kostnoj srži gde prolaze prve faze razvoja (pre-pro-, pro-, pre-B limfociti i nezreli B limfociti). Ove još uvek nezrele ćelije nakon početnih faza diferencijacije migriraju u sekundarno limfno tkivo (tranzicioni B limfocit). U sekundarnom limfnom tkivu tranzicioni B limfociti se diferenciraju u različite tipove ćelija koje se na osnovu fenotipskih, funkcionalnih i topografskih karakteristika mogu podeliti na:

- ćelije slične ćelijama urođenog imuniteta (tzv. *innate-like B lym*) i
- klasične ćelije stečenog imuniteta (32).



„*Innate-like*“ B limfociti su B1 limfociti i limfociti marginalne zone (MZ). Njihova prvenstvena uloga ogleda se u reakciji na antigene koji se vezuju direktno sa TLR ekspimiranim na površini B limfocita, nezavisno od saradnje sa T limfocitima, tzv. *T-cell independent antigens*. Interakcija *T-cell independent* antigena sa TLR odgovorna je za veoma brz razvoj B1 limfocita i limfocita MZ u plazmablaste koji sekretuju antitela klase IgM niskog afiniteta, najznačajnija u ranom imunom odgovoru. B1 limfociti dominantno sekretuju imunoglobuline klase A, dok su limfociti marginalne zone odgovorni za sekreciju imunoglobulina klase M. *T cell independent* antigeni su pre svega antigeni inkapsulisanih bakterija. Dokaz da *innate-like* B limfociti imaju ključnu ulogu u reakciji imunog sistema na inkapsulisane bakterije leži i u povećanoj osetljivosti osoba sa urođenim nedostatkom B1 limfocita i B limfocita marginalne zone (*Wiskot-Aldrich* sindrom, hipogamaglobulinemija i agamaglobulinemija), splenektomiranih osoba kao i dece uzrasta do 2 godine ka infekcijama inkapsulisanim bakterijama (32). Pored brze diferencijacije u imunoglobulin-sekretujuće plazmablaste, druga funkcija B limfocita MZ sastoji se u ulozi kao APC. Prezentujući T limfocitima antigene vezane za TLR predstavljaju most između urođenog i stečenog imuniteta (32).

S druge strane, klasične ćelije stečenog imuniteta su folikularni B limfociti koji preko antigen-specifičnog B ćelijskog receptora (BCR) prepoznaju antigen prezentovan uz pomoć T limfocita. Ova interakcija generiše dalji razvoj u aktivirane B limfocite, B limfocite germinativnog centra (GC), dugoživeće plazmocyte i memorijske B limfocite (slika 4). Aktivacija B limfocita preko antigen-specifičnog BCR generiše sporu sintezu antitela visokog afiniteta.



Slika 4. Razvojni put B limfocita nakon kontakta sa antigenom – klasičan put (31)

Posebnu subpopulaciju B limfocita čine B regulatorne ćelije (Bregs) koje imaju sposobnost sekrecije značajnih količina IL-10 i *transforming growth factor beta 1* (TGF- $\beta$ -1). IL-10 predstavlja imunoregulatorni citokin koji suprimira infamaciju blokadom sekrecije proinflammatoryh citokina, suprimiranjem T<sub>H</sub>1 (proinflammatorynog) odgovora i svojom ulogom u diferencijaciji i adekvatnoj funkciji T regulatornih limfocita, što je dokazano kako u animalnim tako i humanim studijama (33). Regulatorna uloga B limfocita dokazana je kod bolesnika sa sistemskim lupus eritematosusom (SLE) i multiplom sklerozom (MS) dok se u infektivnim bolestima spominje isključivo u kontekstu helmintijaza (33).

Pre tri godine Raugh i saradnici opisali su fenotipski i funkcionalno nove B limfocite, različite od svih do sada opisanih, koji sekretuju GM-CSF i zbog njihove patofiziološke uloge nazvali ih *innate response activator B lymphocyte (IRA-B lym)*. Na animalnom modelu dokazano

je da deplecija ove subpopulacije B limfocita dovodi do smanjenja mogućnosti klirensa bakterija, pogoršava citokinsku oluju i ubrzava razvoj septičkog šoka (34). Pored navedenih najnovijih otkrića, uloga B limfocita kao efektivnih ćelija koje sekretuju imunoglobuline nikako nije zanemarljiva. Naime, pokazano je da u sepsi klirens bakterija u najvećoj meri zavisi od koncentracije cirkulišućih IgM.

Dokaze koji podržavaju ulogu B limfocita u patogenezi sepse pružaju i rezultati autopsija preminulih pacijenata u JIL koji nedvosmisleno pokazuju značajno izraženiju limfopeniju kod umrlih od sepse u odnosu na stepen limfopenije kod preminulih od drugih oboljenja (22). Izražena apoptoza B i T limfocita registrovana je kako na animalnim tako i na humanim modelima (25). Ostalo je nejasno da li apoptoza limfocita igra ključnu ulogu u patogenezi sepse ili je samo epifenomen drugih patofizioloških događaja (25). U prilog teoriji o suštinskoj ulozi B limfocita u patogenezi sepse govore brojne studije koje su različitim pristupima blokadi apoptoze koji uključuju primenu citokina koji zaustavljaju apoptozu, inhibitora kaspaze kao i antagonista takozvanih „*death receptor*“-a pokazale da terapijski modaliteti usmereni ka inhibiciji apoptoze limfocita dovode do smanjenja mortaliteta (25,28).

Zbog svih navedenih uloga B limfocita u patogenezi sepse, može se pretpostaviti da povratak njihove funkcije ili stimulacija produkcije novih aktivnih limfocita može doprineti poboljšanju ishoda sepse (28).

### 1.4.3 Članovi superfamilije TNF/TNFR

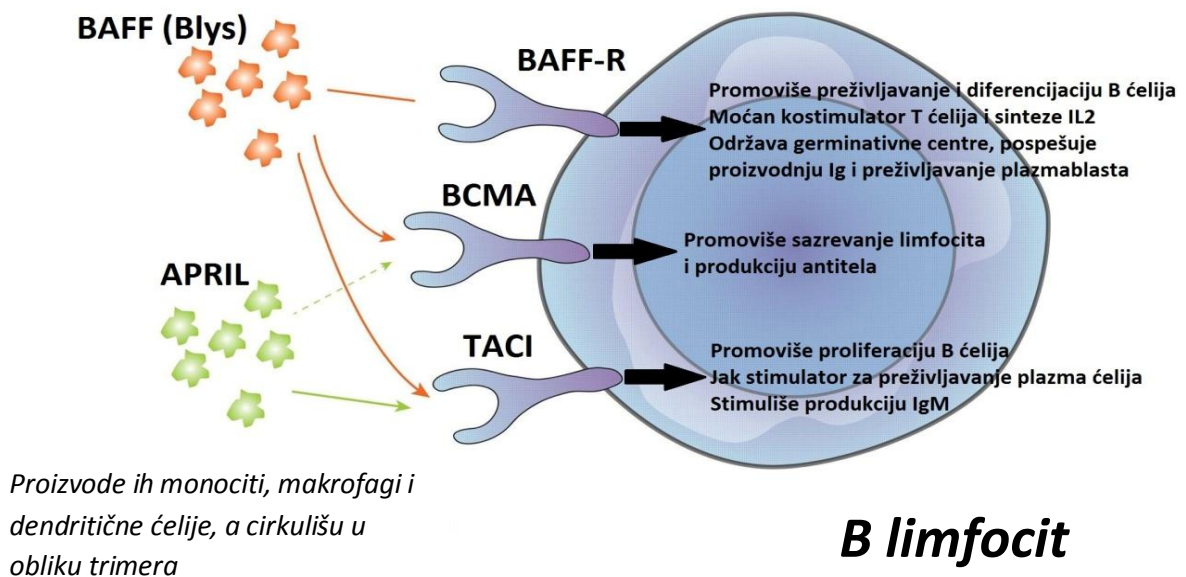
U svetlu svih istraživanja i najnovijih teorija o patogenezi sepse u kojima se sve više naglašava uloga B limfocita, pretpostavili smo da članovi superfamilije TNF-a koji igraju ključnu ulogu u aktivaciji i proliferaciji B limfocita mogu biti korisni prognostički biomarkeri sepse. Uprkos bliske povezanosti TNF-a i sepse, poveznost ostalih članova superfamilije tumor nekroza faktor – tumor nekroza faktor receptor (TNF/TNFR) sa sepsom, do sada je malo ispitivana. Superfamiliju TNF/TNFR sačinjava preko 40 proteina, od kojih su 19 ligandi a 29 receptori (35,36). U nama dostupnoj literaturi postoji samo jedan rad objavljen 2013. godine koji se bavi ispitivanjem dijagnostičkog i prognostičkog značaja jednog od članova ove superfamilije kod obolelih od sepse (37). Ostali članovi u kontekstu sepse do sada nisu ispitivani, iako je uloga TNF-a u sepsi već godinama poznata.

Familija faktora stimulacije B limfocita pripada porodici TNF/TNFR i čine je 5 članova:

- *A proliferation inducing ligand (APRIL)*,
- *B cell activating factor (BlyS/BAFF)*
- *Transmembrane activator and calcium modulator cyclophilin ligand interactor (TACI)*,
- *B cell maturation antigen (BCMA)*,
- *BAFF receptor (BAFF-R) (38,39)*.

Ova superfamilija se u literaturi prvi put pominje ne tako davne 1998. godine kada je opisan APRIL, a sledeće godine i BAFF (40). Narednih 15 godina usledila su istraživanja kojima su otkriveni i ostali članovi ove superfamilije, njihove međusobne interakcije i biološke uloge. Dokazano je da su APRIL i BAFF transmembranski proteini tipa II. Proteolitičkim cepanjem pod

dejstvom enzima konvertaze oslobađaju se u solubilnoj formi. Proteolitičko cepanje APRIL-a događa se intracelularno na Goldžijevom aparatu, te on postoji isključivo u solubilnoj formi, za razliku od BAFF-a koji osim solubilne forme može postojati vezan za membranu, najverovatnije kao posledica nekompletnog cepanja (41). APRIL i BAFF sekretovani su prvenstveno od strane antigen-prezentujućih ćelija: tkivnih makrofaga i dendritičnih ćelija. Svoje biološke uloge ostvaruju vezivanjem za preostala tri člana ove superfamilije koji predstavljaju receptore za koje se APRIL i BAFF vezuju sa različitim afinitetom. Dokazano je da BAFF može da se veže za sva tri receptora, sa najvećim afinitetom za BAFF-R, dok APRIL svoja fiziološka dejstva ispoljava vezujući se sa podjednakim afinitetom za TACI i BCMA, a za BAFF-R se ne vezuje (39,42). TACI pokazuje veći afinitet vezivanja APRIL-a nego BAFF-a (43). Interakcije članova ove superfamilije prikazane su na Slici 5.



Slika 5. *B cell activation factor* (BAFF), *a proliferation inducing ligand* (APRIL) i njihovi receptori (44)

APRIL i BAFF se smatraju ključnim faktorima u održavanju homeostaze B limfocita. Odgovorni su za preživljavanje B limfocita, regulaciju njihove diferencijacije i apoptoze. APRIL je dokazani stimulator rasta B limfocita, dok je BAFF označen kao ključni činilac njihove maturacije i preživljavanja, kao i glavni induktor produkcije imunoglobulina (42,45). APRIL je takođe prepoznat i kao faktor koji omogućuje preživljavanje plazmocita (46). Imajući u vidu njihovu ključnu ulogu u humoralnom imunitetu do sada su ispitivani u kontekstu autoimunih i malignih bolesti. Pokazano je da su kod bolesnika sa sistemskim lupusom, reumatoidnim artritismom, Sjogrenovim sindromom, multiplom sklerozom i drugim autoimunim bolestima značajno povišeni nivoi APRIL-a i BAFF-a (39,47–49). Povišeni nivoi BAFF-a i APRIL-a dokazani su i kod nekoliko malignih bolesti, pre svega B ćelijskih maligniteta – hronične limfocitne leukemije, multiplog mijeloma i B ćelijskih limfoma (39,45,50–52). Kao ključni činiooci u sprečavanju apoptoze B limfocita prepoznati su kao meta za terapijski pristup lečenju autoimunih bolesti. Blokodom dejstva APRIL-a i BAFF-a smanjuje se njihov protektivni efekat na B limfocite, indukuje apoptoza, smanjuje broj cirkulišućih limfocita čime se poboljšava tok autoimunih bolesti. Rezultati istraživanja na pacijentima obolelim od sistemskog lupusa, multiple skleroze i reumatoid artritisa pokazali su da primena antagonista APRIL-a ili BAFF-a ima pozitivne efekte na tok bolesti, dok je taj efekat još izraženiji blokodom i APRIL-a i BAFF-a istovremeno (39). Slične ideje primenjuju se i u istraživanju potencijalne terapije hronične limfocitne leukemije. Smatra se da bi onemogućavanjem APRIL-a i BAFF-a da ostvare svoju funkciju bila postignuta veća apoptoza B limfocta što bi smanjilo njihov broj kod obolelih od leukemije (45). S obzirom na sve istaknutiju ulogu humoralnog imuniteta u patogenezi sepse, kao i na nespornu ulogu APRIL-a i BAFF-a u održavanju homeostaze B limfocita, pretpostavljamo da bi koncentracije ovih biomarkera funkcije imunog sistema mogle poslužiti

kao značajni prediktori toka i ishoda sepse. Poznata je činjenica da sepsa i maligniteti u velikoj meri pokazuju zajedničke karakteristike imunoloških deficita, te se pretpostavlja da uspješni imunomodulatorne terapije maligniteta mogu doneti potencijalni benefit i kod septičnih bolesnika (22).

TACI receptor je eksprimiran na B limfocitima svih razvojnih stadijuma koji slede nakon napuštanja kostne srži, od tranzicionih, preko regulatornih, B limfocita marginalne zone, folikularnih, kao i aktiviranih B limfocita i plazmocita (dominantno kratkoživećih). Ipak, najviši nivo ekspresije zabeležen je na tzv. zrelih *innate-like* B limfocitima: B limfocitima marginalne zone (39,41) i B1 limfocitima (42), što implicira njegovu ključnu ulogu u imunom odgovoru na *T-cell independent* antigene. Naime, signalni put posredovan TLR na površini B limfocita je nezavistan od T limfocita i glavni je činilac odgovora organizma na inkapsulisane bakterije što je pokazano in vivo studijama na humanoj populaciji (32). Upravo je interakcija *T-cell independent* antigena sa TLR na površini B limfocita najjači stimulator ekspresije TACI receptora na ovim ćelijama (38). Ove dve činjenice navode na pretpostavku da upravo TACI može da posluži kao jedan od korisnih biomarkera sepse. Takođe, kod bolesnika sa različitim oblicima imunodefijencija dokazane su mutacije gena za TACI receptor. Kod ovih bolesnika klinička slika se manifestuje učestalim bakterijskim infekcijama, a u laboratorijskim nalazima zapažaju se snižene vrednosti cirkulišućih imunoglobulina (53).

Pored transmembranske forme, dokazano je postojanje TACI receptora i u solubilnoj formi (54), čije se koncentracije tehnički jednostavno određuju ELISA (*enzyme-linked immunosorbent assay*) testovima, što ga čini pogodnim za rutinsku primenu. Istraživanja su pokazala da serumske koncentracije solubilnog TACI-ja (sTACI) snažno koreliraju sa količinom

transmembranski vezanog receptora (54). Takođe, pokazano je da se sTACI funkcionalno ne razlikuje od transmembranske forme. Naime, sTACI u serumu vezuje APRIL i BAFF na isti način kao i transmembranska forma receptora, sa istim funkcionalnim efektom: blokadom NF- $\kappa$ B aktivacije, negativnim uticajem na preživljavanje B limfocita (42,54) i na produkciju imunoglobulina klase IgM (45). Solubilni TACI vezivanjem za APRIL blokira APRIL-om posredovanu proliferaciju B limfocita (55), te se smatra glavnim negativnim regulatorom broja B limfocita (42). Prednost određivanju serumskih koncentracija solubilnog TACI receptora u odnosu na transmembransku formu, kod septičnih bolesnika, pored tehnički lakše izvodljivosti i dokaznih istih funkcija, daje i činjenica da se TACI u solubilnoj formi u većim koncentracijama oslobađa tek nakon aktivacije B limfocita od strane različitih stimulusa (54).

BAFF-R je eksprimiran na B limfocitima nakon sticanja BCR, i smatra se ključnim za preživljavanje i maturaciju nezrelih B limfocita (42), dok je BCMA receptor eksprimiran isključivo na dugoživećim plazmocitima i memorijskim B limfocitima (41). Ova dva receptora postoje samo u transmembranskoj formi.

## **1.5 Biomarkeri sepse**

Imajući u vidu sva navedena razmatranja u vezi sa patogeneзом sepse, ono što je svakako nesporno je neophodnost da se pravovremeno i adekvatno reaguje kako u prepoznavanju sepse i razlikovanju SIRS-a infektivne i neinfektivne etiologije, tako i u proceni težine kliničke slike bolesti i verovatnoće za razvoj komplikacija i letalnog ishoda. Ispravna procena omogućuje pravovremeno smeštanje bolesnika u JIL, primenu adekvatnih resuscitacionih mera, antibiotske i



suportivne terapije. Postavljanje dijagnoze i procena težine kliničke slike sepse u velikoj meri su otežane različitosti, individualnošću i nespecifičnošću simptoma i znakova bolesti (56,57).

U svrhu procene težine kliničke slike sepse lekarima u značajnoj meri pomažu prediktivni skorovi, u prvom redu APACHE II i SOFA skor. Konstruisani radi kvantifikacije težine bolesti pacijenata hospitalizovanih u jedinicama intenzivnog lečenja (JIL) i predikcije razvoja komplikacija i letalnog ishoda sa velikim procentom uspešnosti koriste se u rutinskoj praksi (58–60).

Ipak, u literaturnim podacima navodi se da procena težine sepse samo na osnovu prediktivnih skorova koji obuhvataju uzrast bolesnika, prisustvo komorbidnih stanja i aktuelnu kliničku sliku u smislu organske disfunkcije nisu dovoljni za adekvatnu procenu razvoja komplikacija i letalnog ishoda (56,61). Upravo iz tog razloga pažnja istraživača usmerena je ka pronalasku biomarkera dovoljno senzitivnog i specifičnog, kako u dijagnostičkom tako i u prognostičkom smislu, koji će istovremeno biti dostupan kliničarima i tehnički jednostavan za analizu iz telesnih tečnosti (pre svega seruma ili plazme). Značaj brze i adekvatne orijentacije o težini kliničke slike bolesti je nemerljiv, s obzirom na podatak da svaki sat odlaganja uvođenja adekvatne antibiotske terapije povećava smrtnost za čak 10% (62).

Dugogodišnja istraživanja usmerena u tom pravcu dovela su do impozantnog broja od oko 180 različitih biomarkera iz krvi koji su ispitivani kao potencijalni dijagnostički i/ili prognostički markeri sepse (56). Pored navedenih, uloga biomarkera ogleda se i u praćenju odgovora na terapiju, diferencijaciji sepse uzrokovane Gram pozitivnim ili Gram negativnim bakterijama, predikciji razvoja komplikacija i predikciji letalnog ishoda (56). Najispitivaniji i

najčešće korišćeni biomarkeri su proteini akutne faze zapaljenja, pre svega C-reaktivni protein i prokalcitonin (56,63).

C-reaktivni protein je nespecifični protein akutne faze koji se sintetise u jetri kao odgovor na prisustvo inflamacije (63). Do porasta koncentracija CRP-a pored infekcije dovode i opekotine, hirurške intervencije, infarkt miokarda, kao i reumatološke bolesti (13).

Prokalcitonin predstavlja trenutno najkorišćeniji biomarker sepse. Kod zdravih osoba luči se od strane C ćelija štitaste žlezde i predstavlja prekursor hormona kalcitonina, dok se kao odgovor na različite stresore luči od strane brojnih parenhimskih neendokrinih ćelija koje nemaju potencijal konvertovanja prokalcitonina u kalcitonin (61) te porast nivoa prokalcitona sekretovanih od strane parenhimskih neendokrinih tkiva tokom sepse ne dovodi do poremećaja metabolizma kalcijuma. Nivo PCT-a raste unutar 3-6h nakon aplikacije LPS Gram-negativnih bakterija (61). Patofiziološka uloga PCT-a ogleda se u proinflamatornom efektu koji ostvaruje povećavajući broj receptora na neutrofilima i limfocitima, stimulacijom sekrecije drugih proinflamatornih citokina te povećanjem intracelularne koncentracije kalcijumovih jona slično kao i ostali proinflamatorni citokini (64). Klinički najznačajnije informacije koje se mogu dobiti merenjem serumskih nivoa prokalcitonina su:

1. Niske vrednosti sa velikom verovatnoćom isključuju dijagnozu sepse (56). Nasuprot tome, povišene vrednosti prokalcitonina „a priori“ ne znače da je u pitanju bakterijska infekcija, s obzirom na činjenicu da su povišene koncentracije prokalcitonina zabeležene i kod opekotina, politraume, akutnog pankreatitisa i ostalih faktora koji dovode do razvoja sistemskog inflamatornog odgovora (64).

2. Drugi klinički značajan benefit određivanja serumskih koncentracija prokalcitonina ogleda se u činjenici da na osnovu njegovih vrednosti uspešno može da se prati odgovor organizma na započetu antibiotsku terapiju, u smislu da pad vrednosti PCT-a znači povoljan odgovor na antibiotik. Najveći značaj prokalcitonina je u tome što se na osnovu njegovih vrednosti može doneti odluka o prekidanju antibiotske terapije (63). Inicijalne vrednosti prokalcitonina mogu da ukažu na težinu kliničke slike sepse, kao i da predvide ishod, ali je značaj ovog biomarkera u datom kontekstu daleko manji od značaja praćenja koncentracija ovog markera tokom vremena (57,65,66). Prednost praćenja nivoa PCT-a u odnosu na CRP i ostale proteine akutne faze upale daje mu njegovo relativno kratko vreme poluživota koje iznosi 22-26h (63).

Do sada ni jedan biomarker nije pokazao dovoljnu senzitivnost i specifičnost kako u dijagnostičkom tako ni u prognostičkom smislu. Obećavajuće rezultate pokazuju studije koje za predikciju ishoda sepse koriste kombinacije različitih biomarkera (13,56,57,63,66).

Novi ispitivani biomarkeri sepse kao što su *Soluble triggering receptor expressed on myeloid cells-1* (sTREM-1), *Soluble urokinase-type plasminogen activator receptor* (suPAR), *Proadrenomedulin* (pro-ADM), *Presepsin* (63), *High-mobility group box 1* (HMGB1) *protein*, *Macrophage migration inhibitory factor* (MIF), *Angiopoietin-1* i *Angiopoietin-2* (13) daju obećavajuće rezultate s obzirom na prihvatljivu senzitivnost i specifičnost. Neki od njih pokazuju bolju dijagnostičku, a neki bolju prognostičku vrednost od PCT-a (13,63).

U svetlu pomenutih istraživanja o regulatornoj ulozi humoralnog imuniteta, kao i ispitivanja markera članova superfamilije TNF-a kao značajnih činilaca u regulaciji homeostaze B limfocita, ispitivanje prediktivnog značaja ovih markera kod obolelih od sepse i njihova

implementacija u već postojeće skorove može da doprinese kako preciznijoj predikciji razvoja težih oblika bolesti i smrtnog ishoda, tako i boljem razumevanju patogeneze sepsa.

## **2 CILJEVI**

1. Ispitati mogućnost primene određivanja koncentracija citokina članova superfamilije tumor nekrosis faktora (APRIL, BAFF i sTACI receptora) za procenu težine kliničkih oblika sepse.
2. Ispitati mogućnost upotrebe članova superfamilije tumor nekrosis faktora (APRIL, BAFF i sTACI receptora) za procenu ishoda bolesti kod obolelih od sepse.

## **3 HIPOTEZE**

1. Više vrednosti koncentracija članova superfamilije tumor nekrosis faktora (APRIL, BAFF i sTACI) prediktori su težih oblika bolesti.
2. Povišene koncentracije članova superfamilije tumor nekrosis faktora (APRIL, BAFF i sTACI) značajni su prediktori smrtnog ishoda sepse.

## 4 ISPITANICI I METODE

Istraživanje je koncipirano kao prospektivna studija preseka. U istraživanje je uključeno 150 bolesnika obolelih od sepse hospitalizovanih na Klinici za infektivne bolesti i na Odeljenju anestezije i reanimacije Urgentnog centra Kliničkog centra Vojvodine (KCV) i 30 zdravih dobrovoljnih davalaca krvi uzrasta između 18 i 55 godina, nepušača, i indeksa telesne težine (BMI) manjeg od 35, koji su činili kontrolnu grupu. Kontrolna grupa dobrovoljnih davalaca krvi neophodna je zbog toga što za pojedine ispitivane parametre za čije se određivanje koriste komercijalni testovi za sada dostupni samo za istraživačke svrhe, ne postoje definisane referentne vrednosti za zdravu populaciju. Uzorci krvi dobrovoljnih davalaca sakupljeni su u Zavodu za transfuziju krvi Vojvodine.

Dijagnoza sepse postavljena je prema kriterijumima definisanim 1992. godine na sastanku *American College of Chest Physicians* i *Society of Critical Care Medicine (ACCP/SCCM Consensus Conference Committee)* (1) i revidiranim 2001. godine na Internacionalnoj konsenzus konferenciji za definisanje sepse od strane *Society of Critical Care Medicine, The European Society of Intensive Care Medicine, The American College of Chest Physicians, The American Thoracic Society* i *The Surgical Infection Society (SCCM/ESICM/ACCP/ATS/SIS)* (4), a zatim i 2012. godine u okviru *Surviving sepsis campaign* (5). Prema navedenim preporukama bolesnici su prema težini kliničke slike klasifikovani u kategorije: sepsa, teška sepsa, septički šok i multiorganska disfunkcija (MODS).

Svakom ispitaniku ili njegovoj porodici ukoliko bolesnik nije u mogućnosti da svesno učestvuje u studiji zbog zdravstvenog stanja, uzeti su detaljni anamnestički podaci i objašnjen cilj

istraživanja, proces dijagnostičke obrade i njihovo učešće u njemu, nakon čega im je dato da pročitaju tekst informacije za ispitanika i potpuno potpišu informisani pristanak za učešće u studiji.

Na osnovu anamnestičkih podataka, podataka iz istorije bolesti, druge medicinske dokumentacije, kao i drugih pokazatelja kliničkog stanja, isključeni su oni bolesnici koji ne odgovaraju u potpunosti kriterijumima za uključivanje u ispitivanje.

Za navedeno ispitivanje dobijena je saglasnost Etičkog komiteta Kliničkog centra Vojvodine i Etičkog odbora Medicinskog fakulteta u Novom Sadu.

#### **4.1 Kriterijumi za uključivanje u studiju**

Punoletni pacijenti oba pola lečeni na Klinici za infektivne bolesti ili na Odeljenju anestezije i reanimacije Urgentnog centra KCV koji ispunjavaju kriterijume za postavljanje dijagnoze sepse, definisane 1992. godine na ACCP/SCCM Konsenzus konferenciji o sepsi i insuficijenciji organa (1) i revidirane na Internacionalnoj konferenciji za definisanje sepse 2001. godine (4), a zatim i 2012. godine u okviru *Surviving sepsis campaign* (5), za koje postoji potpisan informisani pristanak za učešće u studiji.

## **4.2 Kriterijumi za neuključivanje u studiju**

- Politraumatizovani bolesnici
- bolesnici sa opekotinama
- bolesnici sa dijagnozom pankreatitisa
- oboleli od sistemskih inflamatornih bolesti
- oboleli od autoimunih bolesti
- bolesnici sa pridruženom malignom bolešću
- bolesnici sa jetrenom insuficijencijom
- bolesnici sa srčanom insuficijencijom
- trudnice
- ispitanici koji nisu potpisali pristanak za učešće u ispitivanju.

## **4.3 Ispitivani parametri**

Kod svih bolesnika uključenih u studiju evidentirani su demografski i ostali podaci iz istorije bolesti: uzrast, pol, podaci o komorbiditetima i dužini trajanja bolesti pre prijema u bolnicu. U okviru rutinske dijagnostike kod sumnje na sepsu svim bolesnicima su pri prijemu bile načinjene sledeće analize:



- kompletna krvna slika sa diferencijalnom krvom slikom
- vrednost glikemije
- koncentracije uree i kreatinina
- koncentracije elektrolita – natrijuma i kalijuma u serumu
- bilirubinemija (ukupni i direktni bilirubin), koncentracije alanin-aminotransferaze (ALT), aspartat-aminotransferaze (AST) i gama-glutamil-peptidtransferaze (GGT)
- gasne analize arterijske krvi
- koncentracije inflamatornih parametara: C reaktivnog proteina (CRP), prokalcitonina (PCT) i fibrinogena
- Parametri hemostaznog mehanizma: protrombinsko vreme (PT) i INR, aktivisano parcijalno tromboplastinsko vreme (aPTT), trombinsko vreme (TT).

Navedene laboratorijske analize su u zavisnosti od doba dana prijema u bolnicu vršene u laboratoriji Urgentnog centra ili u laboratoriji Centra za laboratorijsku dijagnostiku Kliničkog centra Vojvodine.

Za dodatne laboratorijske analize predviđene istraživanjem u istom aktu venepunkcije u epruvetu sa 3,2% natrijum-citratom uzeto je dodatnih 5ml venske krvi, uzorci su centrifugirani 10 minuta na sobnoj temperaturi brzinom 4000 obrtaja u minuti, na aparatu Nuve NF800, a potom zamrzavani na -70°C do momenta analize uzoraka. Iz navedenih uzoraka određene su koncentracije sledećih parametara:

1. **imunoglobulina klase IgM, IgG i IgA** – imunoturbidimetrijskom metodom, komercijalnim reagensima proizvođača *Biosystems S.A. Barcleona, Spain* na aparatu *Olympus AU 400*, u laboratoriji MEDLAB Novi Sad. Referentne vrednosti za zdrave odrasle osobe prema uputstvu proizvođača su:

- IgA: 0,7-4,0 g/l
- IgG: 7,0-16,0 g/l
- IgM: 0,4-2,4 g/l

2. **komponenti komplekta C3 i C4** - imunoturbidimetrijskom metodom, komercijalnim reagensima proizvođača *Biosystems S.A. Barcleona, Spain* na aparatu *Olympus AU 400*, u laboratoriji MEDLAB Novi Sad. Referentne vrednosti za zdrave odrasle osobe prema uputstvu proizvođača su:

- C3: 0,9-2,1 g/l
- C4: 0,1-0,4 g/l

3. ***A proliferation inducing ligand-a (APRIL)*** – sendvič ELISA (*enzyme-linked immunosorbent assay*) tehnikom komercijalnim reagensima proizvođača *R&D Systems Europe*, a ekstinkcije su očitane automatski na spektrofotometru – Chemwell, USA. Prema specifikaciji proizvođača za najviši standard preporučena je koncentracija od 60ng/ml. Kako ne postoje definisane referentne vrednosti za zdravu populaciju, kao ni istraživanja u kojima su koncentracije ovog biomarkera određivane kod obolelih od sepse, nismo mogli da pretpostavimo kolike su očekivane koncentracije kod septičnih

bolesnika, zbog čega je standardna kriva konstruisana na osnovu većeg broja standardnih merenja u odnosu na preporučene. Za najviši standard postavljen je nerazblažen standardni rastvor koncentracije od 1440 ng/ml, a zatim su napravljena sukcesivna razblaženja (prvo razblaženje 1:10, a nakon toga još 8 razblaženja 1:2) do najniže koncentracije standarda od 0,56 ng/ml.

**4. *B cell activating factor (BAFF/BLyS)*** – sendvič ELISA tehnikom komercijalnim reagensima proizvođača *R&D Systems Europe*, prema uputstvu proizvođača, a ekstinkcije su očitane automatski na spektrofotometru – Chemwell, USA.

**5. *solubilnog Transmembrane activator and calcium modulator cyclophilin ligand interactor (sTACI)*** – sendvič ELISA tehnikom komercijalnim reagensima proizvođača *R&D Systems Europe*, a ekstinkcije su očitane automatski na spektrofotometru – Chemwell, USA. Prema specifikaciji proizvođača za najviši standard preporučena je koncentracija od 6000 pg/ml. Kako ne postoje definisane referentne vrednosti za zdravu populaciju, kao ni istraživanja u kojima su koncentracije ovog biomarkera određivane kod obolelih od sepse, nismo mogli da pretpostavimo kolike su očekivane koncentracije kod septičnih bolesnika, zbog čega je standardna kriva konstruisana na osnovu većeg broja standardnih merenja u odnosu na preporučene. Za najviši standard postavljen je nerazblažen standardni rastvor koncentracije od 130ng/ml, a zatim su napravljena sukcesivna razblaženja (prvo razblaženje 1:10, a nakon toga još 8 razblaženja 1:2) do najniže koncentracije standarda od 50 pg/ml.

Ishodište sepse identifikovano je laboratorijskim analizama, radiološkim procedurama i fizikalnim pregledom, dok su za mikrobiološku identifikaciju uzročnika korišćene kulture telesnih tečnosti uzorkovanih pri prijemu i poslatih na analizu u Centar za mikrobiologiju Instituta za javno zdravlje Vojvodine, ili su uzročnici određeni PCR (*poliymerase chain reaction*) analizom – *SeptiFast*, u Urgentnom centru KCV-a.

Na osnovu potrebnih parametara u toku prvih 24 sata svim bolesnicima izračunati su prediktivni APACHE II i SOFA skor.

Prema kriterijumima definisanim na pomenutim konferencijama bolesnici su prema težini kliničke slike pri prijemu svrstani u četiri kategorije: bolesnici sa sepsom, teškom sepsom, septičkim šokom i multiorganskom disfunkcijom.

**Teška sepsa** je definisana kao sepsa udružena sa hipotenzijom ili disfunkcijom organa. U pokazatelje disfunkcije organa se ubrajaju: vrednosti laktata iznad referentnog opsega; poremećaj stanja svesti; diureza manja od 0,5 ml/kg/h u periodu dužem od 2h uprkos adekvatnoj nadoknadi tečnostima; akutno oštećenje pluća- ALI (*Acute lung injury*): odnos PaO<sub>2</sub>/FiO<sub>2</sub> indeksa manji od 250 u odsustvu pneumonije kao izvora infekcije, odnosno manji od 200 ukoliko je pneumonija izvor infekcije; vrednost kreatinina veća od 176,8μmol/l; vrednost bilirubin veća od 34,2μmol/l; broj trombocita manji od 100 000/μl; prisustvo koagulopatije (INR veći od 1,5).

**Septički šok** je definisan kao sepsom indukovana hipotenzija, koja se održava uprkos adekvatnoj nadoknadi cirkulatornog volumena, odnosno stanje koje je praćeno laktatnom acidozom ili hipoperfuzijom organa, a koje se ne može poboljšati intravenskom nadoknadom tečnosti.

**MODS** je definisan kao prisustvo insuficijencije dva ili više organskih sistema, čija se homeostaza ne može održati primenom interventnih postupaka, prema prethodno navedenim kriterijumima disfunkcije organa u sepsi.

S obzirom na definicije teške sepse i septičkog šoka, na osnovu rutinskih parametara i inicijalne kliničke slike praktično je nemoguće odmah pri prijemu odrediti koji će hipotenzivni pacijent adekvatno reagovati na supstituciju volumenom a koji neće, odnosno kod kojeg bolesnika će doći do razvoja septičkog šoka i MODS-a. Procenu razvoja težih oblika bolesti otežavaju nespecifičnost kliničkih manifestacija, kao i kompenzatorni mehanizmi organizma koji prilikom prvog pregleda bolesnika često maksiraju stvarnu težinu bolesti. Imajući u vidu daleko veću smrtnost od septičkog šoka i MODS-a u odnosu na tešku sepsu, brzinu popuštanja kompenzatornih mehanizama organizma koja se često meri satima, kao i značaj adekvatne rane predikcije razvoja multiorganske disfunkcije pre nego što ona postane očigledna u kliničkoj slici, parametar koji bi omogućio adekvatnu ranu predikciju razvoja MODS-a našao bi veoma značajno mesto u rutinskoj primeni. Predikcija razvoja MODS-a izuzetno je značajna pre svega prilikom trijaže bolesnika tokom prvog pregleda i donošenja adekvatne odluke o pravovremenom smeštanju bolesnika u JIL, zato što je dokazano da odlaganje prijema u JIL pogoršava ishod (67–70). Imajući u vidu navedene činjenice praćeno je zdravstveno stanje svih pacijenata inicijalno prezentovanih lakšim oblicima bolesti i evidentiran je razvoj MODS-a u prvih 48 sati hospitalizacije.

Zdravstveno stanje bolesnika je praćeno tokom 28 dana od trenutka uključivanja u studiju i nakon tog perioda je evidentiran ishod lečenja u smislu preživljavanja ili smrtnog ishoda.

## 4.4 Statistička obrada podataka

Statistička obrada podataka rađena je uz pomoć softvera *IBM SPSS Statistics ver 20.0*.

Utvrđivanje statističke značajnosti razlika između kategorijalnih varijabli sprovedeno je  $\chi^2$  testom. Nakon provere raspodele vrednosti i homogenosti varijanse kontinuiranih varijabli utvrđeno je da za većinu parametara raspodela značajno odstupa od normalne i da su varijanse nehomogene, te su za poređenje statističke značajnosti razlika između grupa korišćeni neparametrijski testovi:

- *Mann-Whitney U* test za poređenje dve grupe ispitanika (zdravi – bolesni, grupe podeljene u odnosu na razvoj MODS-a u prvih 48h hospitalizacije i u odnosu na ishod bolesti),
- *Kruskal-Wallisov* test ukoliko se vrši poređenje između više od dve grupe bolesnika (podela u odnosu na težinu kliničke slike – sepsa, teška sepsa, septički šok i MODS). Za parametre za koje je *Kruskal-Wallisovim* testom utvrđeno da postoji statistički značajna razlika između posmatranih grupa, radi utvrđivanja koje se grupe međusobno razlikuju urađene su *post hoc* analize uz Bonferonijevu korekciju alfa vrednosti.

Statistički značajnom razlikom smatrane su vrednosti  $p < 0,05$ .

Raspodele koncentracija ispitivanih parametara prikazane su grafički pomoću pravougaonih dijagrama (engl. *boxplot*). Središnja horizontalna linija koja prolazi kroz pravougaonik predstavlja medijanu, dok sam pravougaonik označava interkvartilnu vrednost

(Q1-Q3) tj. raspon vrednosti ispitivanog obeležja koje su zabeležene kod 50% slučajeva (onih koji se nalaze u sredini distribucije frekvencije) . Tzv. “repovi” koji izlaze iz pravougaonika idu od najnižih do najviših zabeleženih vrednosti. Kružićima su označene netipične vrednosti (engl. *outlayer*) kojima se smatra svaka izmerena vrednost koja je od ivica pravougaonika udaljena više od 1,5 njegove dužine, dok se ekstremnim vrednostima smatra svaka izmerena vrednost koja je od ivica pravougaonika udaljena više od 3 njegove dužine.

Radi utvrđivanja značaja pojedinačnih parametara u predviđanju razvoja MODS-a i letalnog ishoda, kao i radi određivanja graničnih (*cut-off*) vrednosti koncentracija ispitivanih biomarkera za parametre koji su prvobitnim analizama pokazali prediktivni značaj, konstruisane su *Receiver operating curve (ROC)* krive, izračunate površine ispod krive (*Area under the curve – AUC*), te određene granične vrednosti koje sa najboljim odnosom senzitivnosti i specifičnosti predviđaju ishod, odnosno razvoj MODS-a.

Za istovremenu ocenu uticaja više faktora na razvoj MODS-a i letalni ishod sepse i određivanje veličine uticaja svakog od posmatranih parametara, sprovedena je multivarijantna regresiona analiza metodom binarne logističke regresije. Konstruisani su regresioni modeli u koje su kao zavisne promenljive uključeni razvoj MODS-a u prvih 48h hospitalizacije odnosno letalni ishod sepse. Za nezavisne promenljive koje su uključene u model izabrani su oni parametri koji su prvobitnom univarijantnom analizom pokazali prediktivni značaj. U slučaju postojanja multikolinearnosti između parametara u model je uključen onaj parametar koji je univarijantnom analizom pokazao veći prediktivni značaj.

S obzirom na prirodu podataka za utvrđivanje postojanja veze između varijabli korišćena je Spirmanova korelacija ranga.

## 5 REZULTATI

Uzorak je činilo 150 bolesnika obolelih od sepse hospitalizovanih na Klinici za infektivne bolesti i na Odeljenju za anesteziju i reanimaciju Urgentnog centra KCV koji su ispunjavali kriterijume za uključivanje u studiju.

Prosečna starost bolesnika bila je  $60.20 \pm 16.27$  godina (raspon 18-87).

Distribucija po polu pokazuje veću zastupljenost muškog u odnosu na ženski pol: 87 (58%) bolesnika muškog i 63 (42%) ženskog pola, što je na granici statističke značajnosti ( $\chi^2=3.840$ ,  $p=0.05$ ).

Prosečno su bolesnici bili hospitalizovani trećeg dana od početka bolesti (Me=3,  $\bar{x}=3.35$ , SD=2.96, raspon 1-21), a dužina trajanja hospitalizacije iznosila je u proseku 16 dana ( $\bar{x}=15.85$ , SD=11.33, raspon 1-62 dana).

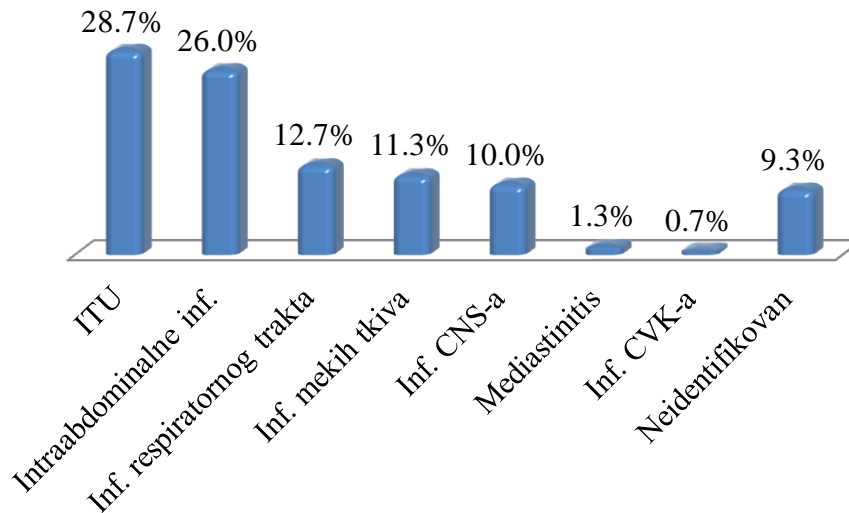
Struktura komorbiditeta prikazana je u Tabeli 1. Najveći broj bolesnika bolovao je od kardiovaskularnih bolesti i bolesti endokrinog sistema, od kojih su na našem uzorku zabeleženi samo dijabetes melitus i hipotireoza. Trećina bolesnika nije imala ni jedan komorbiditet, 70 (46.7%) pacijenata je imalo jednu pridruženu bolest, njih 25 (16.7%) je bolovalo istovremeno od bolesti dva organska sistema, dok je kod 5 (3.3%) bolesnika zabeleženo po tri komorbiditeta.

Ishodište sepse bilo je klinički i/ili mikrobiološki identifikovano kod 90.7% bolesnika dok je kod 9.3% ostalo neidentifikovano. Najčešće ishodište bili su urinarni trakt (28.7% obolelih) i abdomen (26.0%), dok su medijastinitis i infekcije centralnog venskog katetera (CVK) bile najmanje zastupljene (1.3% i 0.7%). Rezultati su prikazani na Grafikonu 1.



Tabela 1. Struktura komorbiditeta kod obolelih od sepse

Komorbiditet	DA		NE		Ukupno	
	n	%	n	%	n	%
Oboljenja kardiovaskularnog sistema	71	47.30%	79	52.70%	150	100%
Oboljenja endokrinog sistema	28	18.70%	122	81.30%	150	100%
Oboljenja respiratornog sistema	10	6.70%	140	93.30%	150	100%
Psihijatrijska oboljenja	20	13.30%	130	86.70%	150	100%
Ostali komorbiditeti	8	5.30%	142	94.70%	150	100%



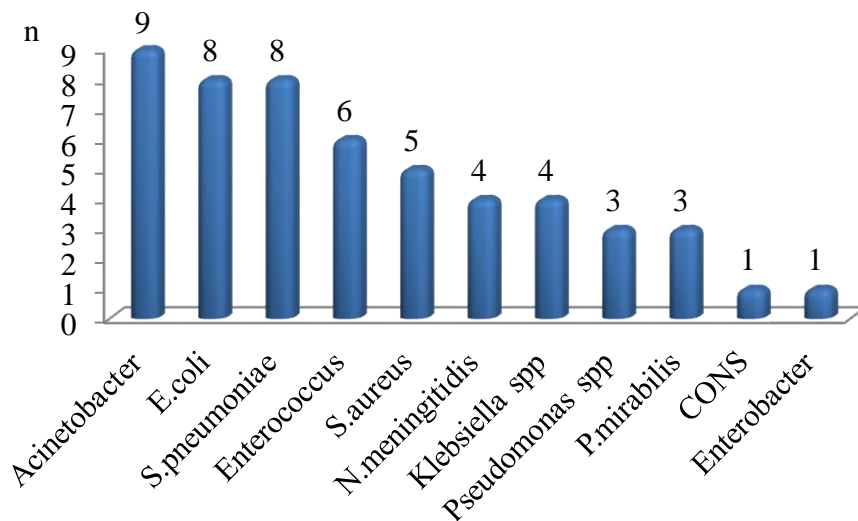
Grafikon 1. Ishodište sepse

ITU – infekcija urinarnog trakta  
 CNS – centralni nervni sistem  
 CVK – centralni venski kateter

Uzročnik infekcije je mikrobiološki (hemokulturom i/ili izolacijom iz žarišta infekcije) potvrđen kod 52 (34.7%) bolesnika, dok kod ostalih nije identifikovan. Nalaz hemokulture bio je pozitivan kod 30 (20%) bolesnika, kod njih 85 (56.7%) hemokulture su ostale negativne, dok kod 35 (23.3%) pacijenata iz tehničkih razloga i povremenog nedostatka podloga, hemokulture nisu uzete. Iz žarišta infekcije uzročnik je izolovan kod 31 bolesnika (20.7%).

Od 52 pozitivna izolata kod 33 bolesnika (63,4%) sepsa je bila uzrokovana Gram negativnim, a kod 19 bolesnika (36,6%) Gram pozitivnim bakterijama. Sepse uzrokovane gljivicama nisu identifikovane.

Struktura pozitivnih izolata prikazana je na Grafikonu 2.



Grafikon 2. Struktura pozitivnih izolata

CONS – koagulaza negativni S.aureus

Prema kriterijumima definisanim na ACCP/SCCM konsenzus konferenciji o sepsi i insuficijenciji organa i revidiranim na Internacionalnoj konferenciji za definisanje sepse 2001. i 2012. godine, bolesnici su pri prijemu bili podeljeni prema težini kliničke slike u 4 grupe: sepsa, teška sepsa, septički šok i MODS. Najveći procenat bolesnika (44%) je pri prijemu zadovoljavao kriterijume za tešku sepsu (Tabela 2).

Tabela 2. Težina kliničke slike pri prijemu

	n	%
Sepsa	35	23.3
Teška sepsa	66	44.0
Septički šok	21	14.0
MODS	28	18.7
Ukupno	150	100.0

Zbog izuzetnog kliničkog značaja što preciznije inicijalne procene daljeg toka bolesti u smislu potencijalnog razvoja MODS-a u prvih 48h hospitalizacije, pratili smo prediktivni značaj svih posmatranih kliničkih i laboratorijskih parametara za razvoj MODS-a unutar prvih 48h hospitalizacije kod onih bolesnika koji su pri prijemu prezentovani lakšim oblicima bolesti (sepsa, teška sepsa i septički šok). Na našem uzorku od 122 bolesnika koji su pri prijemu imali

kliničku sliku sepse, teške sepse ili septičkog šoka kod njih 30 (24.6%) došlo je do razvoja MODS-a u prvih 48h hospitalizacije.

Ishod bolesti bio je povoljan kod 104 (69.3%) bolesnika, dok je kod njih 46 (30.7%) zabeležen letalan ishod.

Kao potencijalni prediktori težine kliničke slike, razvoja MODS-a unutar 48h od prijema u bolnicu i letalnog ishoda bolesti ispitivani su:

3. Faktori rizika od strane domaćina (pol, uzrast, broj i vrsta komorbiditeta)
4. Dužina trajanja bolesti pre prijema u bolnicu
5. Rutinski prediktivni skorovi (APACHE II i SOFA skor)
6. Koncentracije biomarkera koji se rutinski koriste kod obolelih od sepse (Lkc, CRP, PCT, fibrinogen, Trc, PT)
7. Koncentracije markera članova superfamilije TNF- $\alpha$  (APRIL, BAFF i sTACI)
8. Koncentracije komponenti komplementa (C3 i C4)
9. Koncentracije cirkulišućih imunoglobulina (IgA, IgG i IgM)

Pored navedenog, ispitan je i značaj svakog navedenog parametra za predviđanje da li je uzročnik sepse iz grupe Gram pozitivnih ili Gram negativnih bakterija.

## 5.1 Faktori rizika od strane domaćina

Na našem uzorku potvrđeno je da muškarci češće oboljevaju od sepse (87 bolesnika muškog i 63 ženskog pola,  $\chi^2=3.840$ ,  $p=0.05$ ), ali u odnosu na težinu kliničke slike, razvoj MODS-a u prvih 48h, kao ni ishod bolesti ne postoji statistički značajna razlika između muškog i ženskog pola (Tabela 3). Takođe ne postoji statistički značajna razlika između muškaraca i žena u odnosu na uzročnika infekcije (Tabela 3).

Tabela 3. Uticaj pola na težinu kliničke slike, uzročnika infekcije, tok i ishod bolesti

		Muški pol		Ženski pol		Ukupno		$\chi^2$	p
		n	%	n	%	n	%		
Težina kliničke slike	sepsa	19	21.8	16	25.4	35	23.3	4.116	0.249
	teška sepsa	36	41.4	30	47.6	66	44.0		
	septički šok	11	12.7	10	15.9	21	14.0		
	MODS	21	24.1	7	11.1	28	18.7		
Uzročnik	Gram +	10	31.2	9	45.0	19	36.5	0.498	0.480
	Gram -	22	68.8	11	55.0	33	63.5		
MODS 48h	DA	17	25.8	13	23.2	30	24.6	0.013	0.909
	NE	49	74.2	43	76.8	92	75.4		
Ishod	povoljan	59	67.8	45	71.4	104	69.3	0.087	0.769
	letalna	28	32.2	18	28.6	46	30.7		

U Tabeli 4 prikazan je uticaj godina života na težinu kliničke slike, tok i ishod sepse. Iako su bolesnici koji su razvili MODS unutar prvih 48h hospitalizacije kao i bolesnici sa letalnim ishodom prosečno stariji od bolesnika koji su preživeli, razlike nisu statistički značajne (Tabela 4).

Tabela 4. Uticaj godina života na težinu kliničke slike, uzročnika, tok i ishod bolesti

Godine života		$\bar{x}$	SD	Min	Max	Me	$\chi^2$ */U**	p
	sepsa	56.89	18.49	18	83	62.0		
Težina kliničke slike	teška sepsa	62.15	15.70	19	87	63.0	2.066*	0.559
	septički šok	63.05	9.87	47	80	63.0		
	MODS	57.16	18.09	25	83	61.0		
Uzročnik	Gram +	55.26	15.12	29	80	58.0	295.0**	0.725
	Gram -	55.85	18.55	19	81	61.0		
MODS 48h	DA	59.27	16.62	18	63.0	63.0	1117.5**	0.118
	NE	65.47	12.26	35	65.5	65.5		
Ishod	povoljan	58.44	16.94	18	87	62.5	1937.5**	0.064
	letalno	64.17	14.01	32	83	65.0		

\*Kruskal-Wallis test

\*\*Mann-Whitney test

Broj i vrsta komorbiditeta takođe nisu statistički značajno povezani sa težinom kliničke slike, razvojem MODS-a unutar prvih 48h hospitalizacije niti sa ishodom bolesti (Tabela 5).  $\chi^2$  test je pokazao da se grupe bolesnika kod kojih je došlo do razvoja MODS-a 48h od prijema u bolnicu i onih kod kojih se MODS nije razvio ne razlikuju statistički značajno u prisustvu KVB ( $\chi^2=0.012$ ,  $p=0.912$ ), endokrinoloških ( $\chi^2=0.550$ ,  $p=0.459$ ), plućnih ( $\chi^2=0.029$ ,  $p=0.864$ ) niti psihijatrijskih bolesti ( $\chi^2=0.040$ ,  $p=0.842$ ). Po istim posmatranim parametrima ne razlikuju se ni grupe preživelih i umrlih bolesnika (KVB  $\chi^2=0.066$ ,  $p=0.797$ , endokrinološke bolesti  $\chi^2=0.035$ ,  $p=0.851$ , plućne bolesti  $\chi^2=0.162$ ,  $p=0.687$ , psihijatrijske bolesti  $\chi^2=0.507$ ,  $p=0.477$ ).

Tabela 5. Uticaj broja komorbiditeta na težinu kliničke slike, tok i ishod bolesti

Broj komorbiditeta		$\bar{x}$	SD	Min	Max	Me	$\chi^2^*/U^{**}$	P
Težina kliničke slike	sepsa	0.94	0.84	0	3	1	1.245*	0.742*
	teška sepsa	0.92	0.83	0	3	1		
	septički šok	0.71	0.72	0	2	1		
	MODS	0.93	0.72	0	3	1		
MODS 48h	DA	0.92	0.78	0	3	1	1310.0**	0.655**
	NE	0.87	0.90	0	3	1		
Ishod	povoljan	0.87	0.76	0	3	1	2232.0**	0.481**
	letalno	0.98	0.86	0	3	1		

\*Kruskal-Wallis test

\*\*Mann-Whitney test

Na našem uzorku pokazano je da faktori rizika od strane domaćina ne utiču statistički značajno na težinu kliničke slike, razvoj MODS-a unutar prvih 48h od prijema u bolnicu, niti na ishod bolesti.

## 5.2 Dužina trajanja bolesti pre hospitalizacije

Rezultati našeg istraživanja pokazuju da su oboleli od sepse najčešće bili hospitalizovani trećeg dana bolesti. U Tabeli 6 prikazan je uticaj dužine trajanja bolesti pre prijema u bolnicu na težinu kliničke slike, razvoj MODS-a u prvih 48 sati hospitalizacije, ishod bolesti kao i na pripadnost grupi sepsi uzrokovanih Gram pozitivnim ili Gram negativnim bakterijama.

Tabela 6. Dužina trajanja bolesti pre hospitalizacije u odnosu na težinu kliničke slike, razvoj MODS-a unutar prvih 48h hospitalizacije i ishod bolesti

Dan prijema u bolnicu		$\bar{x}$	SD	Min	Max	Me	$\chi^2^*/U^{**}$	p
	sepsa	3.51	3.70	1	21	3		
Težina kliničke slike	teška sepsa	3.89	3.25	1	20	3	9.680*	<b>0.021</b>
	septički šok	2.19	1.75	1	7	2		
	MODS	2.71	1.18	1	5	3		
Uzročnik	Gram +	3.11	1.52	1	8	3	313.0**	0.992
	Gram -	4.45	4.92	1	21	3		
MODS 48h	DA	2.73	2.26	1	10	2	1079.0**	0.068
	NE	3.74	3.46	1	21	3		
Ishod	povoljan	3.25	2.79	1	21	3	2290.5**	0.673
	letalno	3.57	3.34	1	20	3		

\*Kruskal-Wallis test

\*\*Mann-Whitney test

Rezultati našeg istraživanja pokazuju da postoji statistički značajna razlika u dužini trajanja bolesti pre prijema u bolnicu u odnosu na težinu kliničke slike bolesti. Naknadnim (*post hoc*) analizama pokazano je da značajnost razlike potiče od činjenice da se bolesnici sa septičkim šokom značajno ranije javljaju u bolnicu u odnosu na pacijente sa teškom sepsom (*Mann-Whitney*  $U=394.0$ ,  $p=0.002$ ), dok se ostale grupe bolesnika ne razlikuju statistički značajno. Iako se bolesnici kod kojih je došlo do razvoja MODS-a u prvih 48h hospitalizacije ranije javljaju u bolnicu razlika je ostala na granici statističke značajnosti.



### 5.3 APACHE II i SOFA skor

U tabelama 7 i 8 prikazane su vrednosti SOFA i APACHE II skora koji su se pokazali kao dobri prediktori razvoja MODS-a i letalnog ishoda, dok između sepsi uzrokovanih Gram pozitivnim i Gram negativnim uzročnicima nema statistički značajne razlike u vrednostima APACHE II i SOFA skora.

Tabela 7. Značaj APACHE II i SOFA skora za predikciju razvoja MODS-a u prvih 48h hospitalizacije

	MODS 48h	n	$\bar{x}$	SD	Min	Max	Me	Mann- Whitney U	r	p
APACHE II	NE	92	11.44	5.18	3	32	11.0	323.5	0.570	<b><u>0.000</u></b>
	DA	30	18.30	3.40	13	26	18.0			
SOFA	NE	92	3.60	1.98	0	8	3.0	274.5	0.600	<b><u>0.000</u></b>
	DA	30	7.33	1.97	4	11	8.0			

Tabela 8. Značaj APACHE II i SOFA skora u predikciji ishoda bolesti

	Ishod	n	$\bar{x}$	SD	Min	Max	Me	Mann- Whitney U	r	p
APACHE II	povoljan	104	12.88	5.97	3	33	12.0	1109.5	0.427	<b><u>0.000</u></b>
	letalni	46	20.13	8.02	9	44	17.5			
SOFA	povoljan	104	4.68	3.05	0	13	4.0	1221.0	0.366	<b><u>0.000</u></b>
	letalni	46	7.98	4.11	3	19	7.0			

Za procenu veličine uticaja ispitivanog parametra na zavisnu promenljivu prilikom upotrebe Mann-Whitney U testa koristi se “r” vrednost. Prema Koenovim kriterijumima, ako je vrednost  $r > 0.5$  uticaj ispitivanog parametra na zavisnu promenljivu smatra se velikim. Vrednosti  $0.3 < r < 0.5$  ukazuju na uticaj srednjeg intenziteta, dok se za  $r < 0.3$  uticaj smatra malim, iako je statistički značajan. U skladu sa ovim, APACHE II i SOFA skor u predikciji razvoja MODS-a pokazuju veliki uticaj ( $r > 0.5$ ), dok su za predviđanje ishoda sepse performanse oba skora nešto manje i pokazuju uticaj srednjeg intenziteta ( $r > 0.3$ ).

U odnosu na uzročnika sepse, ni SOFA ni APACHE skor nisu pokazali prediktivni značaj. Iako su vrednosti SOFA skora manje kod bolesnika kod kojih je sepsa uzrokovana Gram negativnim u odnosu na Gram pozitivne uzročnike, ta razlika nije statistički značajna (Tabela 9).

Tabela 9. Značaj APACHE II i SOFA skora za predikciju pripadnosti uzročnika grupi Gram pozitivnih ili Gram negativnih bakterija

	Uzročnik	n	$\bar{x}$	SD	Min	Max	Me	Mann-Whitney U	r	p
APACHE II	G+	19	16.79	9.92	3	44	16.0	269.5	0.116	0.402
	G-	33	13.64	4.70	4	26	13.0			
SOFA	G+	19	7.53	4.94	2	19	7.0	215.5	0.260	0.061
	G-	33	4.88	2.87	0	13	4.0			

SOFA i APACHE II skor pokazali su se kao dobri prediktori razvoja MODS-a u prvih 48h hospitalizacije kao i letalnog ishoda sepse, pri čemu SOFA skor bolje predviđa razvoj MODS-a, a APACHE II bolje predviđa ishod bolesti.

## 5.4 Rutinski laboratorijski parametri

Vrednosti rutinskih laboratorijskih parametara za procenu težine kliničke slike, predviđanje komplikacija i letalnog ishoda prikazani su u tabelama 10, 11 i 12.

U proceni težine kliničke slike sepse, od rutinskih laboratorijskih parametara statističku značajnost pokazuju parametri hemostaze, što je i očekivano s obzirom na to da broj trombocita i protrombinsko vreme predstavljaju deo kriterijuma na osnovu kojih se bolesnici i svrstavaju u određene kategorije prema težini kliničke slike, dok od laboratorijskih parametara iz zapaljenskog sindroma prediktivni značaj pokazuju prokalcitonin i fibrinogen. Kod prokalcitonina je zabeležen linearni porast vrednosti od sepse preko teške sepse do septičkog šoka, nakon čega vrednosti naglo padaju (kako aritmetička sredina tako i medijana) kod bolesnika sa MODS-om, što je verovatno posledica iscrpljenja homeostaznih rezervi. Naknadnim (*post hoc*) analizama pokazano je da je statistički značajna prediktivna vrednost fibrinogena u smislu procene težine kliničke slike bolesti zapravo posledica naglog pada vrednosti ovog parametra kod bolesnika sa težim oblicima bolesti (septičkim šokom i MODS-om), dok među ostalim grupama nema statistički značajne razlike.

Tabela 10. Prediktivni značaj rutinskih laboratorijskih parametara za procenu težine kliničke slike sepsa

		n	$\bar{x}$	SD	Min	Max	Me	$\chi^2^*$	p
LKC	sepsa	35	16.01	9.18	2.63	44.90	14.3	7.718	0.052
	teška sepsa	66	17.26	12.72	1.30	72.00	15.4		
	septički šok	21	10.68	7.20	1.20	27.61	8.4		
	MODS	28	18.03	16.90	1.60	81.50	15.5		
CRP	sepsa	35	210.65	76.02	82.10	462.30	201	3.317	0.345
	teška sepsa	66	228.29	91.06	6.80	477.30	239		
	septički šok	21	210.43	83.35	60.90	337.80	212		
	MODS	28	257.74	143.95	30.00	730.00	217		
PCT	sepsa	35	33.77	70.82	0.40	270.00	5.9	17.913	<b>0.000</b>
	teška sepsa	66	65.74	125.11	0.50	611.50	16.5		
	septički šok	21	77.57	84.30	1.76	365.80	74.4		
	MODS	28	69.59	101.21	0.56	468.70	26.6		
FIBR	sepsa	35	5.65	1.58	0.98	9.07	5.5	13.341	<b>0.004</b>
	teška sepsa	66	5.39	1.43	1.66	8.24	5.5		
	septički šok	21	4.36	2.07	1.96	11.38	3.9		
	MODS	28	4.66	1.95	0.83	8.42	4.9		
TRC	sepsa	35	238.96	126.05	7.60	560.00	213	10.242	<b>0.017</b>
	teška sepsa	66	195.12	134.41	9.00	641.00	169		
	septički šok	21	188.52	100.89	47.00	513.00	158		
	MODS	28	146.81	117.75	3.00	441.00	130		
PT	sepsa	35	1.30	0.37	0.94	2.77	1.22	26.823	<b>0.000</b>
	teška sepsa	66	1.53	0.58	0.88	3.48	1.37		
	septički šok	21	1.99	1.06	1.06	5.35	1.69		
	MODS	28	2.14	1.01	1.12	5.44	1.79		

\*Kruskal-Wallis test

Tabela 11. Rutinski laboratorijski parametri kao prediktori razvoja MODS-a u prvih 48h hospitalizacije

	MODS 48h	n	$\bar{x}$	SD	Min	Max	Me	Mann- Whitney U	r	p
Lkc	NE	92	16.47	11.67	1.20	72.0	15.34	1163.0	0.117	0.197
	DA	30	13.61	8.53	3.40	37.0	11.00			
CRP	NE	92	224.36	81.07	6.80	477.3	224.0	1235.5	0.078	0.390
	DA	30	207.26	98.10	23.0	397.8	205.0			
PCT	NE	92	39.92	77.52	0.40	497.0	10.27	720.0	0.355	<b>0.000</b>
	DA	30	115.90	153.70	0.84	611.5	73.39			
Fibr.	NE	92	5.39	1.58	0.98	9.07	5.53	1037.5	0.171	0.058
	DA	30	4.96	1.79	2.15	11.38	4.78			
Trc	NE	92	218.48	13.33	7.60	641	196.0	995.5	0.207	<b>0.022</b>
	DA	30	170.00	22.24	9.00	538	141.5			
PT	NE	92	1.47	0.55	0.88	3.89	1.30	1182.0	0.009	0.309
	DA	30	1.76	0.94	1.06	5.35	1.34			

Od rutinskih laboratorijskih parametara za procenu razvoja MODS-a unutar prvih 48h hospitalizacije značajnim su se pokazali PCT sa srednjim uticajem ( $r > 0.3$  prema Koenovim kriterijumima) i trombociti sa malim uticajem ( $r > 0.1$  prema Koenovim kriterijumima). Ostali ispitivani parametri nisu pokazali prediktivni kapacitet.

Tabela 12. Rutinski laboratorijski markeri kao prediktori letalnog ishoda sepse

	Ishod	n	$\bar{x}$	SD	Min	Max	Me	Mann-Whitney U	r	p
Lkc	povoljan	104	15.47	10.65	1.2	72.0	13.75	2276.0	0.386	0.636
	letalni	46	17.82	15.69	1.6	81.5	14.94			
CRP	povoljan	104	228.72	76.93	23.0	477.33	224.0	2141.5	0.083	0.307
	letalni	46	223.67	138.65	6.8	730.0	215.0			
PCT	povoljan	104	66.84	113.97	0.4	611.5	17.35	2328.0	0.021	0.794
	letalni	46	46.66	80.42	0.5	468.7	17.66			
Fibr.	povoljan	104	5.54	1.51	0.98	11.38	5.53	1389.5	0.323	<b>0.000</b>
	letalni	46	4.31	1.85	0.83	8.42	4.26			
Trc	povoljan	104	205.44	130.58	3.0	641.0	179.5	2033.0	0.119	0.143
	letalni	46	172.73	118.84	11.8	538.0	153.0			
PT	povoljan	104	1.49	0.65	0.88	5.35	1.27	1226.5	0.379	<b>0.000</b>
	letalni	46	2.03	0.92	1.12	5.44	1.71			

U predikciji ishoda sepse značajnim laboratorijskim markerima pokazali su se fibrinogen koji je niži kod bolesnika sa letalnim ishodom i protrombinsko vreme koje je kod bolesnika sa letalnim ishodom značajno produženo. Interesantno je da su srednje vrednosti fibrinogena kod bolesnika sa letalnim ishodom u granicama referentnih vrednosti za zdravu populaciju, dok su kod bolesnika sa lakšim oblicima bolesti te vrednosti povišene. Povišene vrednosti kod bolesnika sa lakšim oblicima bolesti verovatno su posledica lučenja fibrinogena kao zapaljenskog parametra, dok je pad vrednosti zabeležen kod težih oblika bolesti najverovatnije posledica potrošnje tokom procesa hemostaze.

Posmatrajući samo bolesnike sa dokazanim uzročnikom infekcije koncentracije ni jednog od posmatranih laboratorijskih parametara ne pokazuju statistički značajnu razliku između bolesnika kod kojih je infekcija uzrokovana Gram pozitivnim u odnosu na Gram negativne uzročnike (Tabela 13).

Tabela 13. Prediktivni značaj rutinskih laboratorijskih parametara u odnosu na grupe uzročnika

	Bojenje po Gramu	n	$\bar{x}$	SD	Min	Max	Me	Mann-Whitney U	r	p
Lkc	G+	19	18.07	13.03	1.60	60.0	16.0	224.5	0.234	0.091
	G-	33	12.69	8.49	1.30	33.0	9.9			
CRP	G+	19	260.97	27.74	48.80	526.0	246.8	227.0	0.228	0.100
	G-	33	224.57	21.87	72.00	730.0	214.4			
PCT	G+	19	67.70	112.48	0.50	468.7	10.7	283.0	0.080	0.562
	G-	33	50.52	71.84	0.40	267.8	20.0			
Fibr	G+	19	5.22	1.84	0.83	8.42	5.0	290.5	0.061	0.662
	G-	33	5.51	1.86	2.15	11.38	5.2			
Trc	G+	19	151.78	109.99	11.8	465.0	140.0	273.0	0.107	0.441
	G-	33	185.91	123.13	3.0	524.0	154.0			
PT	G+	19	1.67	0.71	0.97	3.45	1.31	246.0	0.178	0.199
	G-	33	1.44	0.54	0.90	3.12	1.26			

## 5.5 Markeri članovi superfamilije TNF-a

*A proliferation inducing ligand* (APRIL), *B cell activating factor* (BAFF) i solubilni *transmembrane activator and calcium modulator cyclophilin ligand interactor* (sTACI) su pokazatelji funkcije imunološkog sistema koji se za sada koriste samo u istraživačke svrhe za koje postoje komercijalni testovi za određivanje njihovih koncentracija u telesnim tečnostima. Za APRIL i sTACI u uputstvu proizvođača kao ni u nama dostupnoj literaturi ne postoje jasno definisane referentne vrednosti koncentracija u zdravoj populaciji, te smo ispitali koncentracije ovih parametara u serumima 30 zdravih ispitanika (dobrovoljnih davalaca krvi).

### 5.5.1 Dijagnostički značaj koncentracija citokina članova superfamilije TNF-a

Koncentracije sva tri ispitivana markera (APRIL, BAFF i sTACI) bile su statistički značajno povišene kod pacijenata obolelih od sepse u odnosu na zdrave ispitanike, što je prikazano u Tabeli 14. Raspodele koncentracija svakog od ispitivanih biomarkera prikazane su pravougaonim dijagramima na grafikonima 3, 4 i 5. Na ovim grafikonima zapaža se da je sva tri markera karakteristična pojava pacijenata kod koji su zabeležene ekstremno povišene koncentracije ovih citokina.

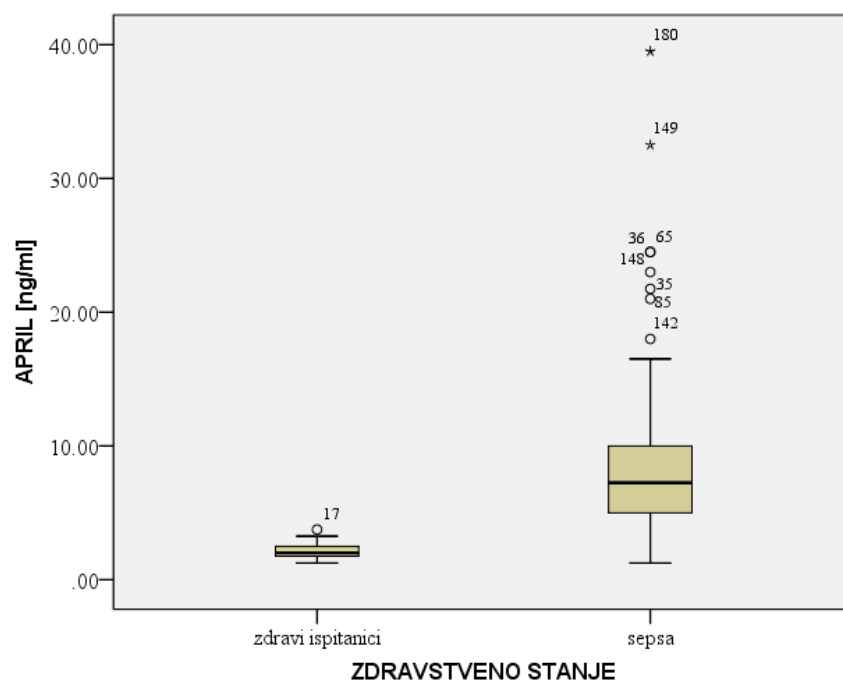


Tabela 14. Koncentracije članova superfamilije TNF-a kod zdravih ispitanika i kod obolelih od sepsa

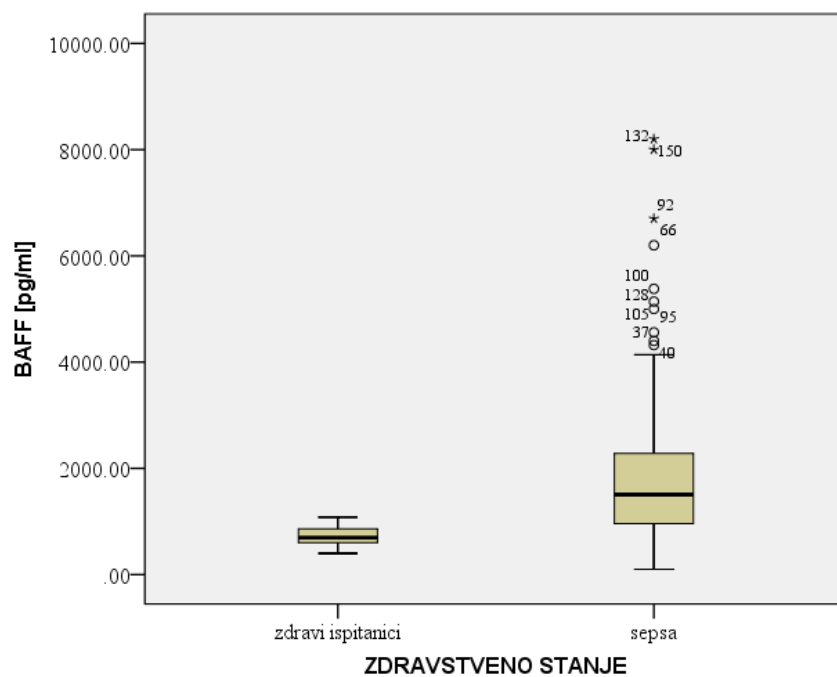
		n	$\bar{x}$	SD	Min	Max	Me	Mann Witney U	r	p
APRIL*	zdravi	30	2.17	0.55	1.25	3.75	2.00	64.5	0.626	<b><u>0.000</u></b>
	sepsa	150	8.60	5.33	1.25	39.50	7.25			
BAFF**	zdravi	30	712.36	166.36	400.00	1080.00	695.00	570.0	0.481	<b><u>0.000</u></b>
	sepsa	150	1873.67	1357.23	100.00	8200.00	1505.00			
sTACI**	zdravi	30	260.83	161.44	50.00	750.00	200.00	1405.0	0.242	<b><u>0.001</u></b>
	sepsa	150	673.80	669.44	50.00	3675.00	550.00			

\* koncentracije izražene u [ng/ml]

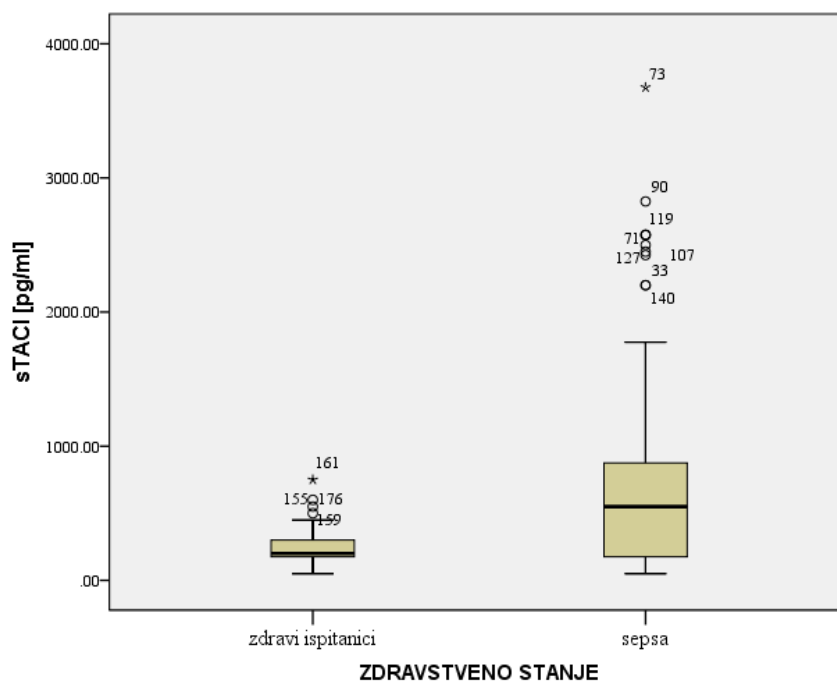
\*\*koncentracije izražene u [pg/ml]



Grafikon 3. Raspodele koncentracija APRIL-a kod zdravih ispitanika i kod obolelih od sepsa

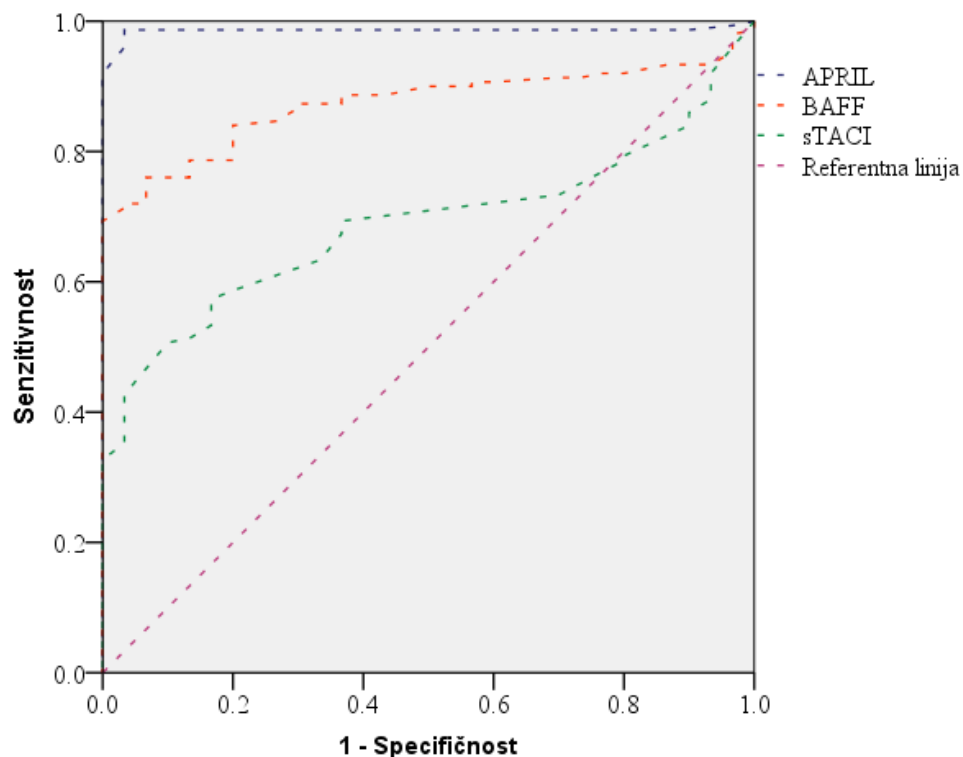


Grafikon 4. Raspodele koncentracija BAFF-a kod zdravih ispitanika i kod obolelih od sepse



Grafikon 5. Raspodele koncentracija sTACI-ja kod zdravih ispitanika i kod obolelih od sepse

U cilju određivanja senzitivnosti i specifičnosti članova superfamilije TNF-a u dijagnostici sepse, kao i određivanja graničnih (*cut-off*) vrednosti koje bi ukazivale na sepsu u odnosu na zdravu populaciju, konstruisane su ROC krive – Grafikon 6, i određene površine ispod ROC krive (*Area under the curve – AUC*) – Tabela 15. Najznačajnijim dijagnostičkim parametrom pokazao se **APRIL** ( $AUC=0.986$ ), za koga sa veoma visokom i senzitivnošću (99%) i specifičnošću (97%) koncentracija od **4ng/ml** može smatrati optimalnom graničnom vrednosti u distinkciji septičnih bolesnika od zdravih ispitanika. Senzitivnost i specifičnost BAFF-a i sTACI-ja su u ovom kontekstu nešto manje. Za optimalnu graničnu vrednost od **875pg/mL** BAFF-a senzitivnost testa je 84%, a specifičnost 80%, dok je za sTACI optimalna granična vrednost **200pg/mL** pri čemu je senzitivnost 70%, a specifičnost svega 63% (Tabela 15).



Grafikon 6. ROC kriva koncentracija članova superfamilije TNF-a u predikciji sepse u odnosu na zdravu populaciju

Tabela 15. Analiza optimalnih graničnih vrednosti, senzitivnosti i specifičnosti markera članova superfamilije TNF-a u dijagnostici sepse u odnosu na zdrave ispitanike

	AUC	optimalna granična vrednost ( <i>cut-off</i> )	senzitivnost	specifičnost	p
APRIL	0,986	4 ng/ml	99%	97%	<b><u>0,000</u></b>
BAFF	0,873	875 pg/ml	84%	80%	<b><u>0,000</u></b>
sTACI	0,678	200 pg/ml	70%	63%	<b><u>0,001</u></b>

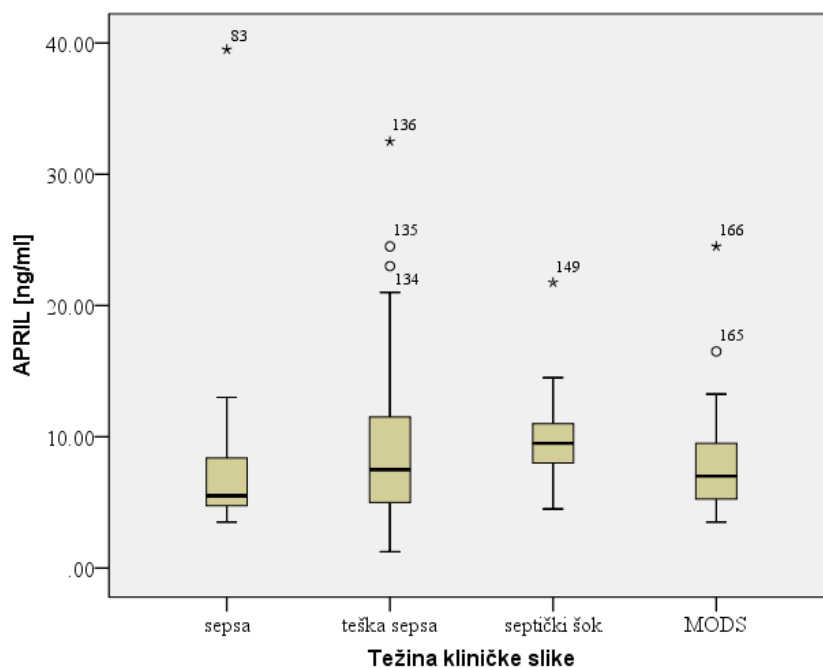
### 5.5.2 Prognošički značaj koncentracija citokina članova superfamilije TNF-a

Koncentracije APRIL-a, BAFF-a i sTACI-ja prema težini kliničke slike prikazane su u Tabeli 16.

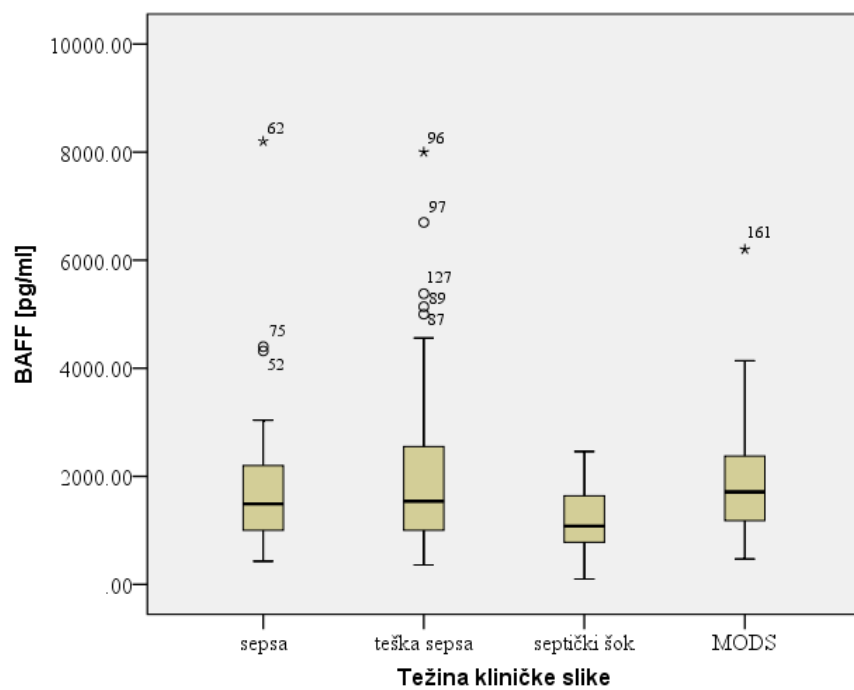
Rezultati pokazuju statistički značajnu razliku u koncentracijama APRIL-a i BAFF-a među posmatranim grupama, dok se koncentracije sTACI-ja ne razlikuju statistički značajno između posmatrane 4 grupe pacijenata, prvenstveno zato što su praktično jednake kod sepse i teške sepse. Naknadnim (*post hoc*) analizama zapažamo da vrednosti APRIL-a i sTACI-ja rastu linearno sa težinom kliničke slike od sepse ka septičkom šoku, a onda naglo padaju kod bolesnika koji klinički pokazuju znake multiorganske disfunkcije (grafikoni 7 i 9). Nasuprot tome, BAFF je statistički značajno snižen kod bolesnika sa septičkim šokom, dok između ostalih grupa ne postoji statistički značajna razlika u koncentraciji BAFF-a (Grafikon 8).

Tabela 16. Članovi superfamilije TNF-a kao prediktori težine kliničke slike sepse

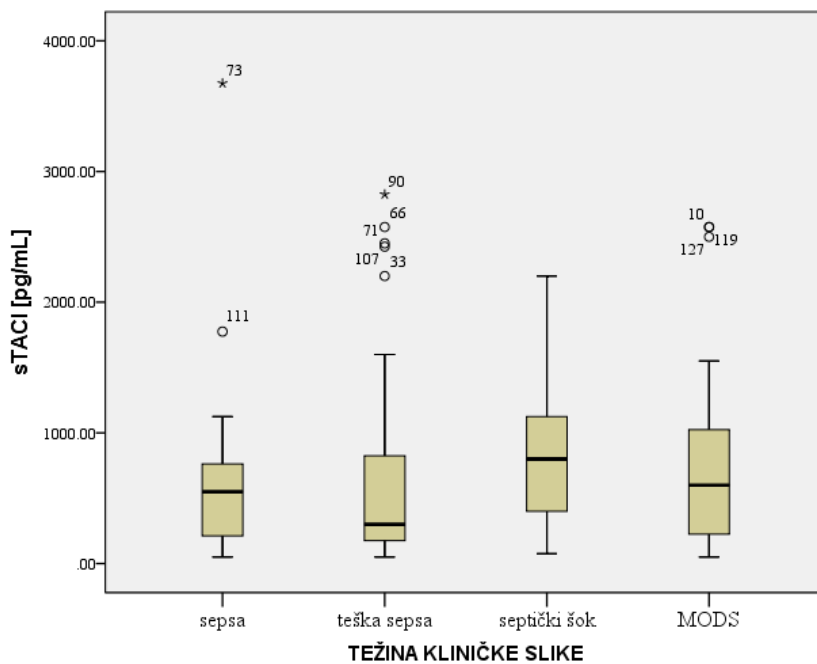
		$\bar{x}$	SD	Min	Max	Me	$\chi^2$	p
	sepsa	7.61	6.18	3.50	39.50	5.5		
APRIL	teška sepsa	8.90	5.67	1.25	32.50	7.5	9.924	<b>0.019</b>
[ng/ml]	septički šok	9.93	3.52	4.50	21.75	9.5		
	MODS	8.14	4.47	3.50	24.50	7.5		
	sepsa	1905.71	1465.06	430.00	8200.00	1490		
BAFF	teška sepsa	2028.18	1482.32	360.00	8000.00	1540	8.239	<b>0.041</b>
[pg/ml]	septički šok	1199.52	629.78	100.00	2460.00	1080		
	MODS	1975.00	1206.35	470.00	6200.00	1710		
	sepsa	594.29	654.43	50.00	3675.00	550		
sTACI	teška sepsa	614.77	624.01	50.00	2825.00	400	5.167	0.160
[pg/ml]	septički šok	833.33	561.21	75.00	2200.00	800		
	MODS	792.86	749.59	50.00	2575.00	600		



Grafikon 7. Raspodela vrednosti APRIL-a u odnosu na težinu kliničke slike



Grafikon 8. Raspodela vrednosti BAFF-a u odnosu na težinu kliničke slike



Grafikon 9. Raspodela vrednosti sTACI-ja u odnosu na težinu kliničke slike

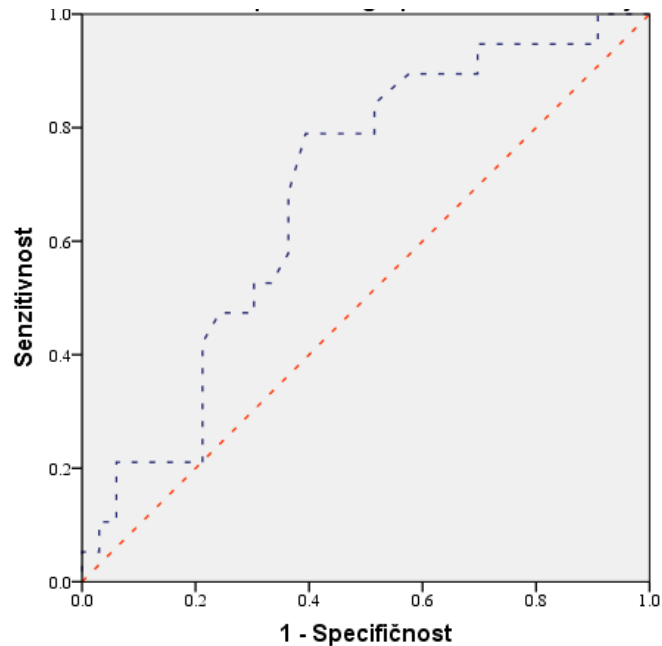
Prediktivni značaj markera članova superfamilije TNF-a u odnosu na grupu uzročnika infekcije prikazan je u Tabeli 17. Dobijeni rezultati pokazuju da se od svih posmatranih kako laboratorijskih tako i kliničkih parametara jedino BAFF pokazao kao statistički značajan parametar za distinkciju između Gram pozitivnih i Gram negativnih uzročnika sepse pri čemu više vrednosti ukazuju na veću verovatnoću da je uzročnik infekcije iz grupe Gram pozitivnih bakterija. Prema Koenovim kriterijumima taj uticaj je srednjeg intenziteta ( $r > 0.30$ ).

Tabela 17. Članovi superfamilije TNF-a kao prediktori grupe uzročnika infekcije

	Bojenje po Gramu	n	$\bar{x}$	SD	Min	Max	Me	Mann-Whitney U	r	p
APRIL*	G+	19	9.54	5.55	3.75	24.5	8.25	257.0	0.149	0.282
	G-	33	8.01	6.40	1.25	39.5	6.50			
BAFF**	G+	19	2290.5	1445.2	700.0	6200.0	1710.0	199.0	0.302	<b><u>0.030</u></b>
	G-	33	1652.1	1132.3	430.0	5140.0	1300.0			
sTACI**	G+	19	759.2	696.8	50.0	2575.0	700.0	277.0	0.096	0.487
	G-	33	654.5	833.7	50.0	3675.0	300.0			

\* koncentracije izražene u [ng/ml]

\*\*koncentracije izražene u [pg/ml]



Grafikon 10. ROC kriva koncentracije BAFF-a kao prediktora pripadnosti uzročnika infekcije grupi Gram pozitivnih ili Gram negativnih bakterija

Za utvrđivanje klasifikatornih mogućnosti BAFF-a u distinkciji grupe uzročnika konstruisana je ROC kriva. Površina ispod ROC krive (AUC) iznosi 0.683 što je statistički značajno na nivou  $p=0.030$ . Sa senzitivnošću od 68% i specifičnošću od 64% *cut-off* vrednost koncentracija BAFF-a bila bi 1450pg/mL. Koncentracije BAFF-a iznad navedene ukazivale bi na veću verovatnoću da je uzročnik iz grupe Gram pozitivnih bakterija.

Prediktivni značaj koncentracija APRIL-a BAFF-a i sTACI-ja za razvoj MODS-a unutar prvih 48h hospitalizacije prikazan je u Tabeli 18. Grafikoni 11, 12 i 13 prikazuju raspodele, medijane i interkvartilne vrednosti posmatranih parametara.

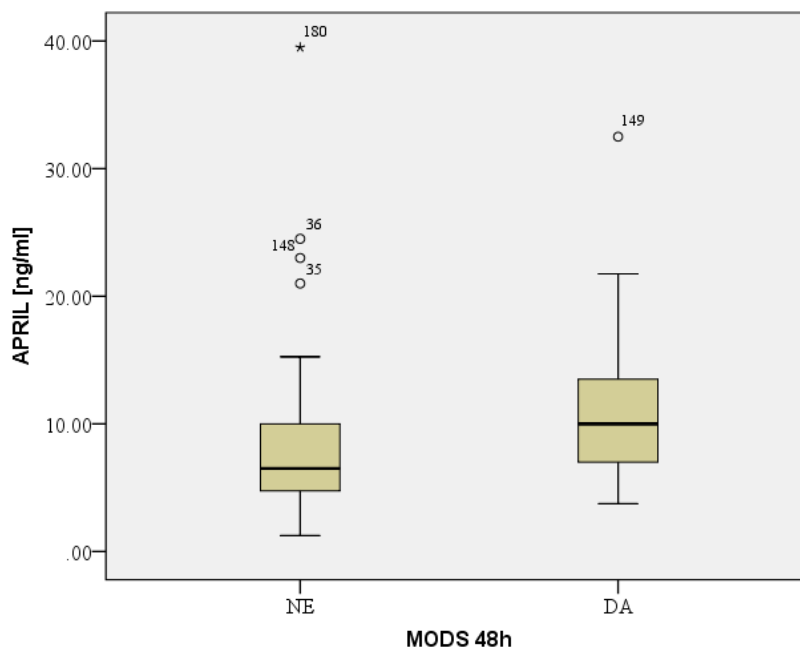


Tabela 18. Prediktivni značaj koncentracija članova superfamilije TNF-a za razvoj MODS-a unutar prvih 48h hospitalizacije

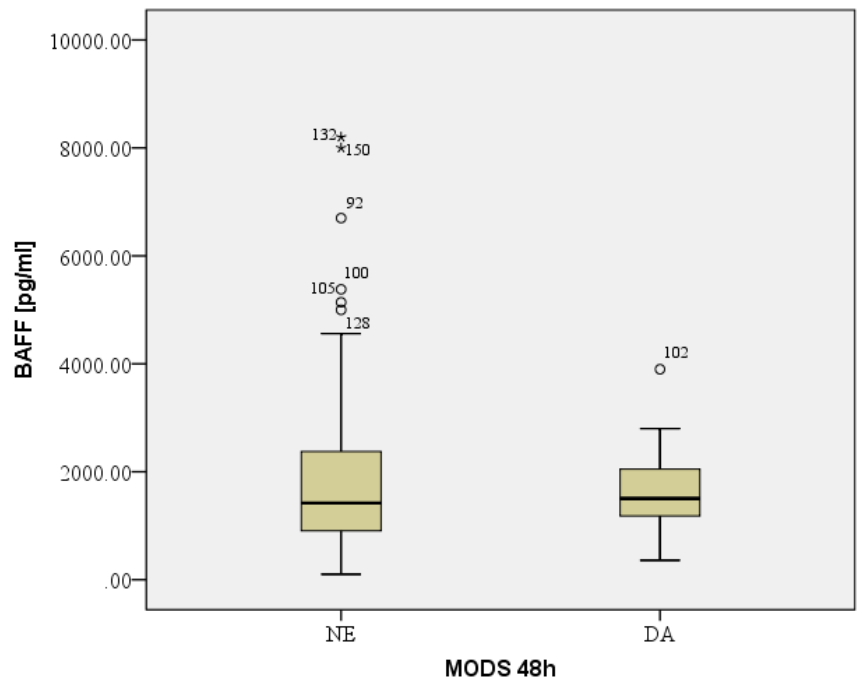
	MODS 48h	n	$\bar{x}$	SD	Min	Max	Me	Mann-Witney U	r	p
APRIL*	NE	92	8.02	5.28	1.25	39.5	6.5	879.0	0.270	<b>0.003</b>
	DA	30	10.81	5.88	3.75	32.5	10.0			
BAFF**	NE	92	1919.8	1542.4	100.0	8200.0	1420.0	1351.0	0.016	0.863
	DA	30	1637.7	755.3	360.0	3900.0	1505.0			
TACI**	NE	92	512.7	570.4	50.0	3675.0	300.0	659.0	0.388	<b>0.000</b>
	DA	30	1056.7	714.7	125.0	2575.0	887.5			

\* koncentracije izražene u [ng/ml]

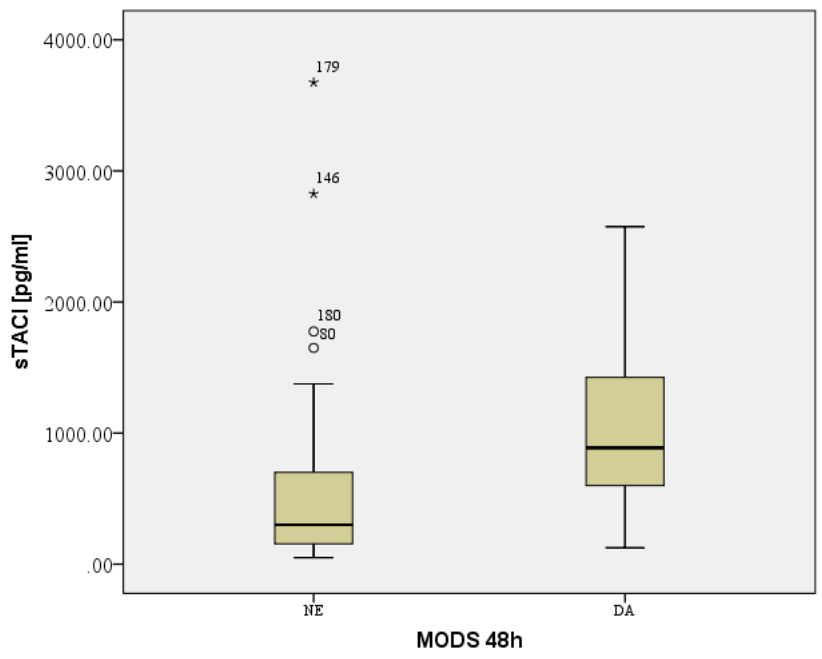
\*\*koncentracije izražene u [pg/ml]



Grafikon 11. Raspodele vrednosti APRIL-a u odnosu na razvoj MODS-a u prvih 48h hospitalizacije

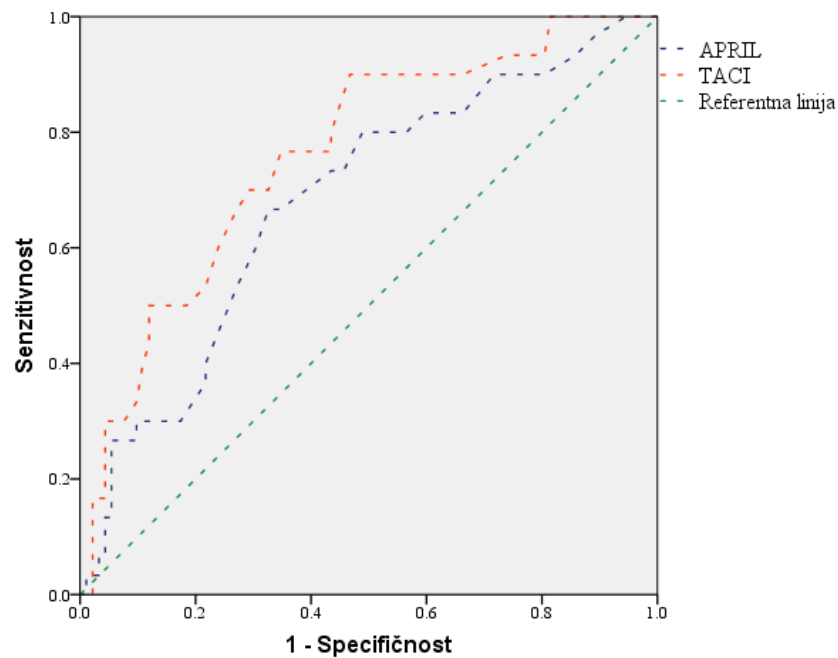


Grafikon 12. Raspodele vrednosti BAFF-a u odnosu na razvoj MODS-a u prvih 48h hospitalizacije



Grafikon 13. Raspodele vrednosti sTACI-ja u odnosu na razvoj MODS-a u prvih 48h hospitalizacije

S obzirom na to da su se APRIL i sTACI pokazali kao visoko statistički značajni prediktori razvoja MODS-a u prvih 48h hospitalizacije konstruisane su ROC krive (Grafikon 14) i određene optimalne granične vrednosti koncentracija koje bi eventualno mogle da posluže u kliničkoj praksi u slučaju da ovi biomarkeri u budućnosti nađu svoje mesto u rutinskom radu. Granične vrednosti i njihova senzitivnost i specifičnost prikazani su u Tabeli 19. Za razliku od dijagnostičkog, u prognostičkom smislu sTACI pokazuje daleko veći prediktivni značaj od APRIL-a.



Grafikon 14. ROC krive koncentracija APRIL-a i sTACI-ja u predikciji razvoja MODS-a u prvih 48h hospitalizacije

Tabela 19. Analiza optimalnih graničnih vrednosti, senzitivnosti i specifičnosti APRIL-a i sTACI-ja u predikciji razvoja MODS-a u prvih 48h hospitalizacije

	AUC	optimalna granična vrednost ( <i>cut-off</i> )	senzitivnost	specifičnost	p
APRIL	0,682	8,12 ng/ml	67%	65%	<b><u>0,003</u></b>
sTACI	0,761	575 pg/ml	77%	65%	<b><u>0,000</u></b>

U Tabeli 20 prikazan je prediktivni značaj koncentracija članova superfamilije TNF-a za ishod sepse.

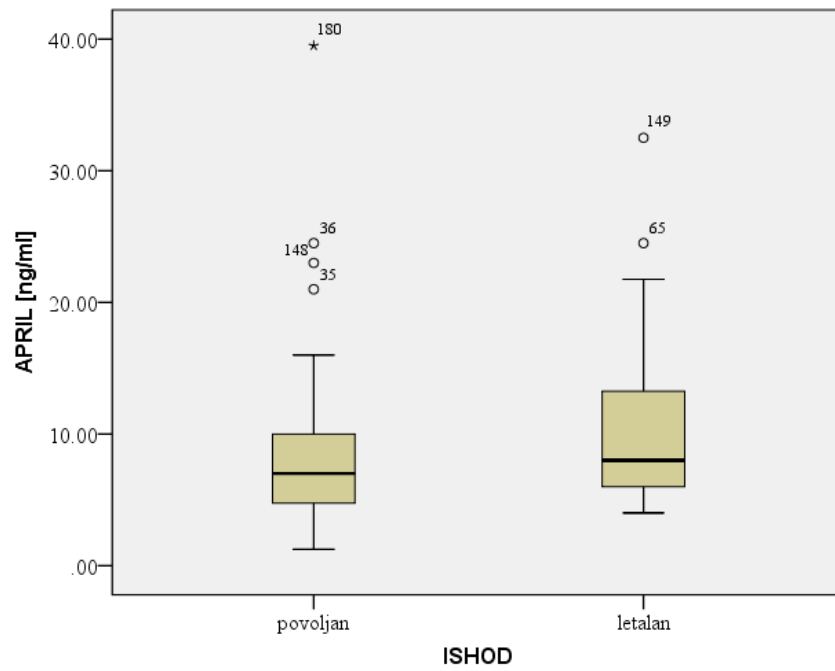
Tabela 20. Prediktivni značaj koncentracija članova superfamilije TNF-a za ishod sepse

	Ishod	n	$\bar{x}$	SD	Min	Max	Me	Mann-Whitney U	r	p
APRIL*	povoljan	104	7.98	5.05	1.25	39.50	7.00	1789.0	0.201	<b><u>0.014</u></b>
	letalni	46	10.00	5.77	4.00	32.50	8.00			
BAFF**	povoljan	104	1864.3	1244.5	100.0	8200.0	1505.0	2240.0	0.051	0.535
	letalni	46	1894.8	1597.9	360.0	8000.0	1525.0			
TACI**	povoljan	104	542.5	541.7	50.0	3675.0	400.0	1650.5	0.247	<b><u>0.002</u></b>
	letalni	46	970.7	826.0	50.0	2825.0	800.0			

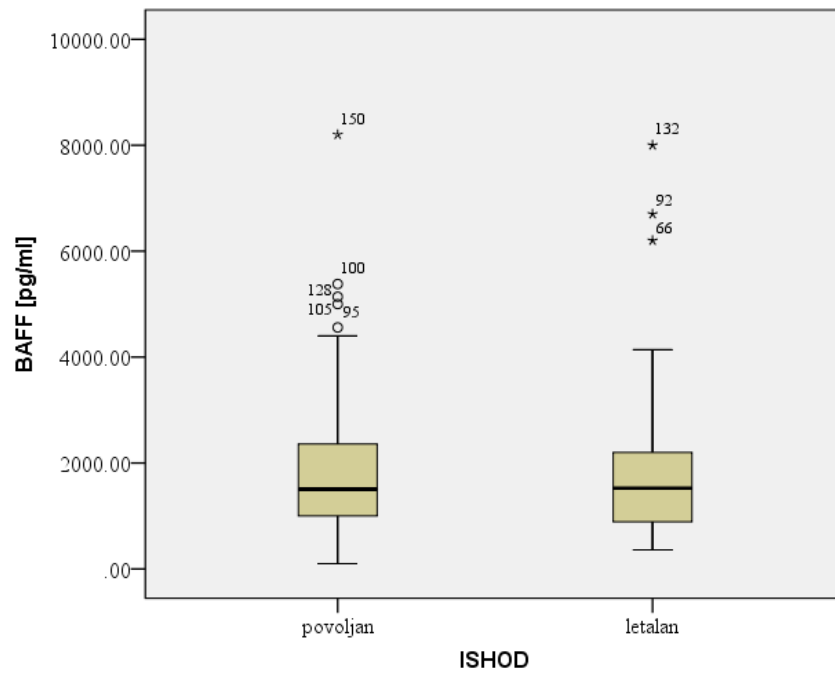
\* koncentracije izražene u [ng/ml]

\*\*koncentracije izražene u [pg/ml]

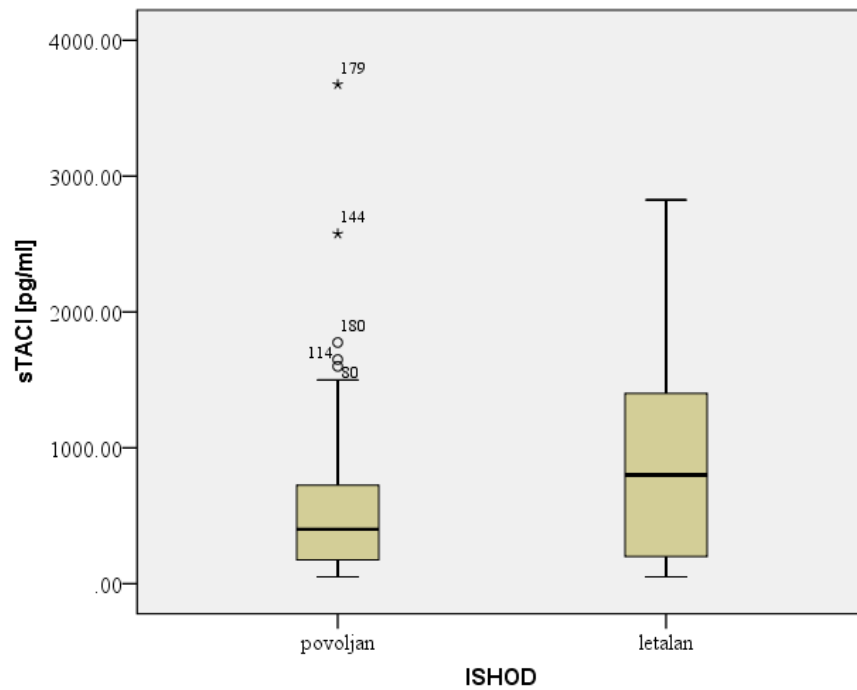
Mann Whitney U test pokazuje da su statistički značajni prediktori ishoda sepse APRIL i sTACI, dok BAFF ne pokazuje značajnost. Raspodele vrednosti, medijane i interkvartilni rasponi posmatranih parametara u grupama bolesnika sa povoljnim i letalnim ishodom prikazane su na Grafikonima 15, 16 i 17.



Grafikon 15. Raspodele vrednosti APRIL-a u odnosu na ishod sepse



Grafikon 16. Raspodele vrednosti BAFF-a u odnosu na ishod sepse



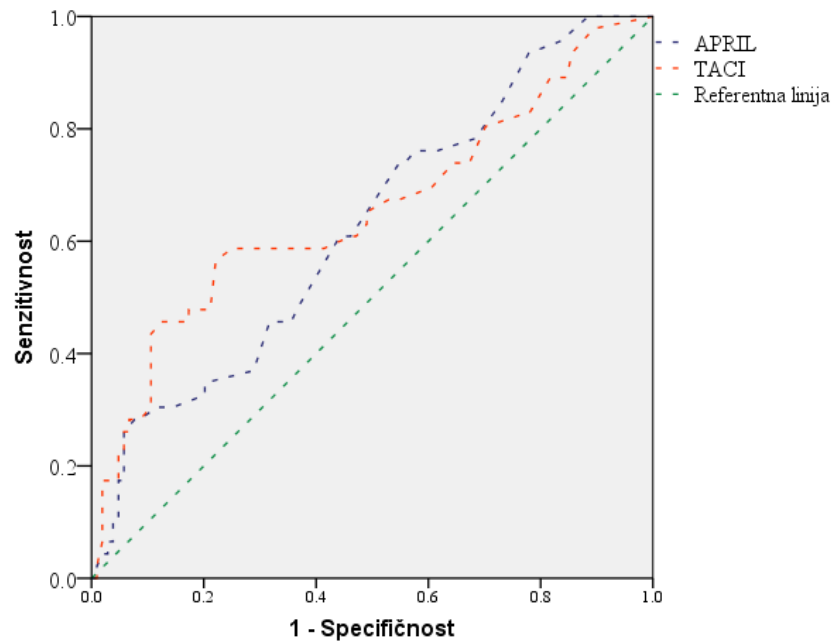
Grafikon 17. Raspodele vrednosti sTACI-ja u odnosu na ishod sepse

Konstrukcijom ROC krive (Grafikon 18) i analizom njenih parametara određena je senzitivnost i specifičnost APRIL-a i sTACI-ja u predikciji ishoda sepse sa odgovarajućim optimalnim graničnim koncentracijama (Tabela 21).

Tabela 21. Analiza optimalnih graničnih vrednosti, senzitivnosti i specifičnosti APRIL-a i sTACI-ja u predikciji letalnog ishoda sepse

	AUC	optimalna granična vrednost ( <i>cut-off</i> )	senzitivnost	specifičnost	p
APRIL	0,626	7,62 ng/ml	61%	56%	<b><u>0,014</u></b>
sTACI	0,655	525 pg/ml	61%	54%	<b><u>0,003</u></b>

Koncentracije više od navedenih označavaju veću verovatnoću letalnog ishoda, ali su senzitivnost i specifičnost testa niske da bi se na ove vrednosti moglo osloniti u rutinskoj upotrebi. Veću upotrebnu vrednost imale bi koncentracije ispod kojih bismo sa 90% sigurnosti mogli da isključimo letalan ishod (APRIL 4,62ng/ml, sTACI 100pg/ml), kao i koncentracije iznad kojih bi verovatnoća letalnog ishoda bila preko 90% (APRIL 12,00ng/ml, sTACI >1000pg/ml).



Grafikon 18. ROC krive koncentracija APRIL-a i sTACI-ja u predikciji letalnog ishoda seipse

## 5.6 Komponente komplementa

Imajući u vidu višestruku ulogu komplementa u koordinaciji reakcija urođenog i stečenog imuniteta, svakom ispitaniku određene su koncentracije onih komponenti komplementa čije je određivanje dostupno kliničarima u svakodnevnom radu u našim laboratorijama (C3 i C4).

Prediktivni značaj ovih parametara pokazan je u tabelama 22, 23, 24 i 25 i na grafikonima 19, 20, 21 i 22.

Tabela 22. Koncentracije komponenata komplementa u odnosu na težinu kliničke slike sepse.

Težina kliničke slike	$\bar{x}$	SD	Min	Max	Me	$\chi^2$	p	
C3*	sepsa	1.25	0.38	0.38	2.12	1.25	34.442	<b><u>0.000</u></b>
	teška sepsa	1.89	0.45	0.37	3.01	1.18		
	septički šok	<b>0.71</b>	0.29	0.43	1.46	0.60		
	MODS	0.89	0.42	0.33	1.80	0.78		
C4*	sepsa	0.44	0.16	0.17	0.86	0.40	25.528	<b><u>0.000</u></b>
	teška sepsa	0.44	0.19	0.06	1.28	0.46		
	septički šok	0.24	0.12	0.07	0.50	0.23		
	MODS	0.35	0.18	0.10	0.85	0.32		

\* koncentracije izražene u [g/l]



Tabela 23. Prediktivni značaj koncentracija komponenti komplementa u odnosu na grupu uzročnika

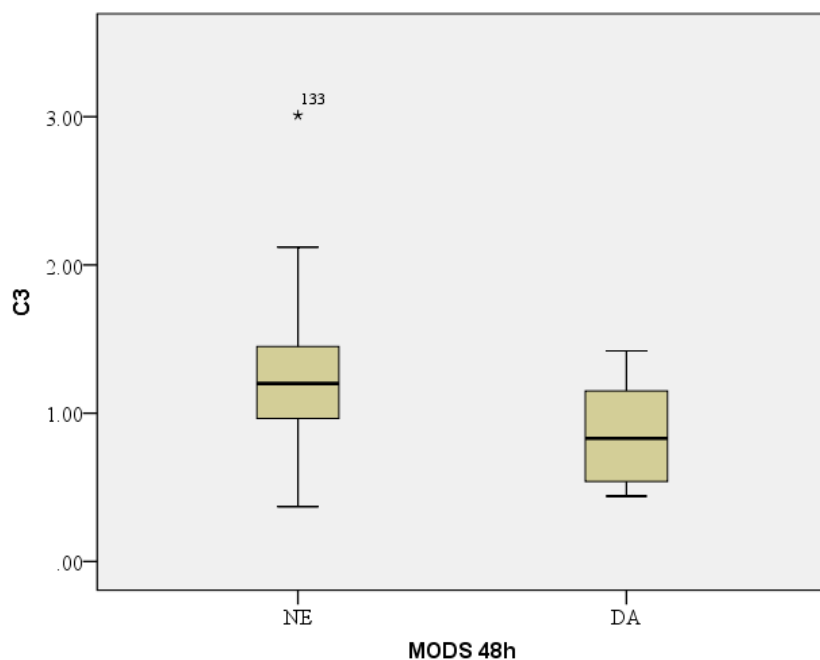
	Bojenje po Gramu	n	$\bar{x}$	SD	Min	Max	Me	Mann- Witney U	r	p
C3*	G+	19	1.02	0.38	0.44	1.76	0.98	270.5	0.113	0.414
	G-	33	1.11	0.35	0.50	2.12	1.13			
C4*	G+	19	0.41	0.18	0.08	0.85	0.43	298.5	0.039	0.775
	G-	33	0.40	0.14	0.12	0.70	0.39			

\* koncentracije izražene u [g/l]

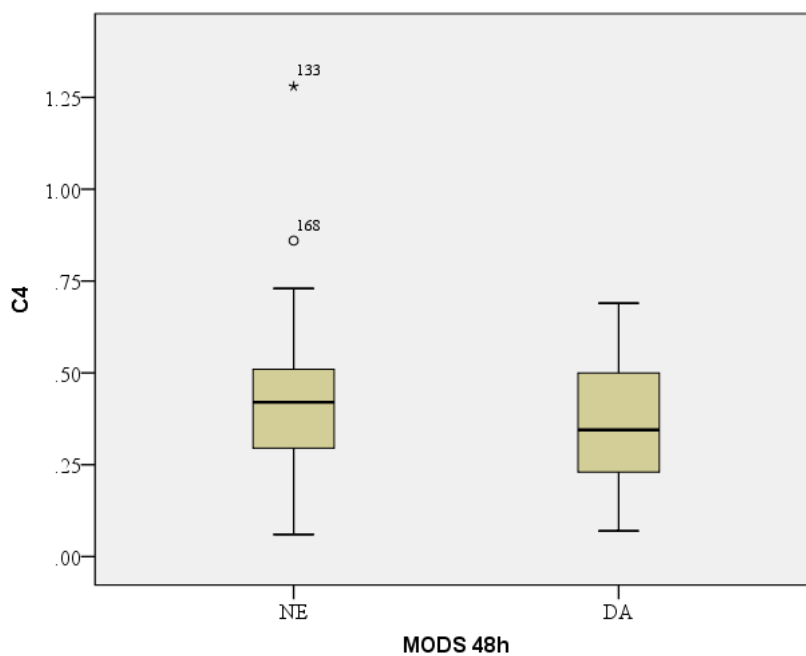
Tabela 24. Prediktivni značaj koncentracija komponenti komplementa za razvoj MODS-a

	MODS 48h	n	$\bar{x}$	SD	Min	Max	Me	Mann- Witney U	r	P
C3*	NE	92	1.29	0.45	0.37	3.01	1.20	738.0	0.346	<b><u>0.000</u></b>
	DA	30	<b>0.87</b>	0.33	0.44	1.42	0.83			
C4*	NE	92	0.42	0.18	0.06	1.28	0.42	1135.0	0.132	0.145
	DA	30	0.36	0.19	0.07	0.69	0.34			

\* koncentracije izražene u [g/l]



Grafikon 19. Raspodele vrednosti C3 komponente komplemента u odnosu na razvoj MODS-a u prvih 48h hospitalizacije

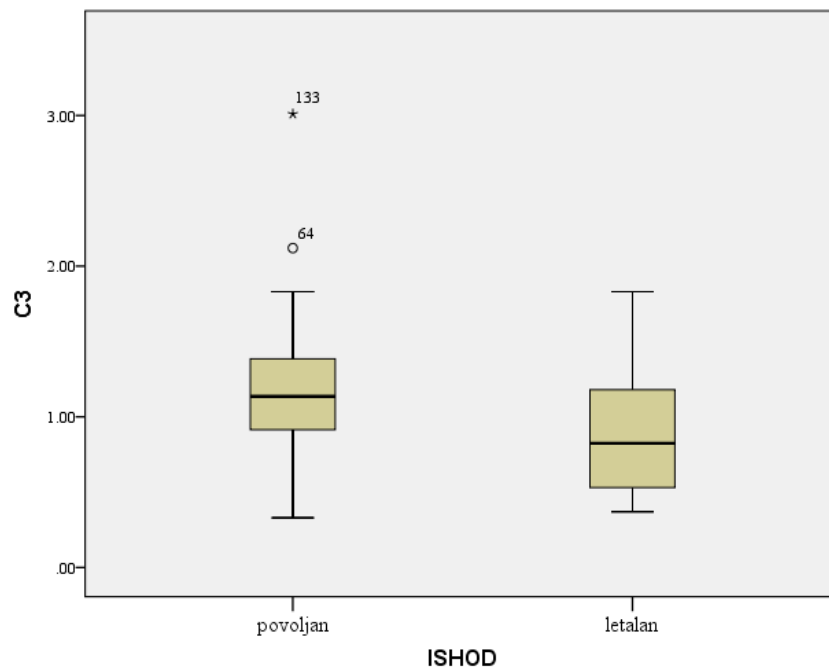


Grafikon 20. Raspodele vrednosti C4 komponente komplemента u odnosu na razvoj MODS-a u prvih 48h hospitalizacije

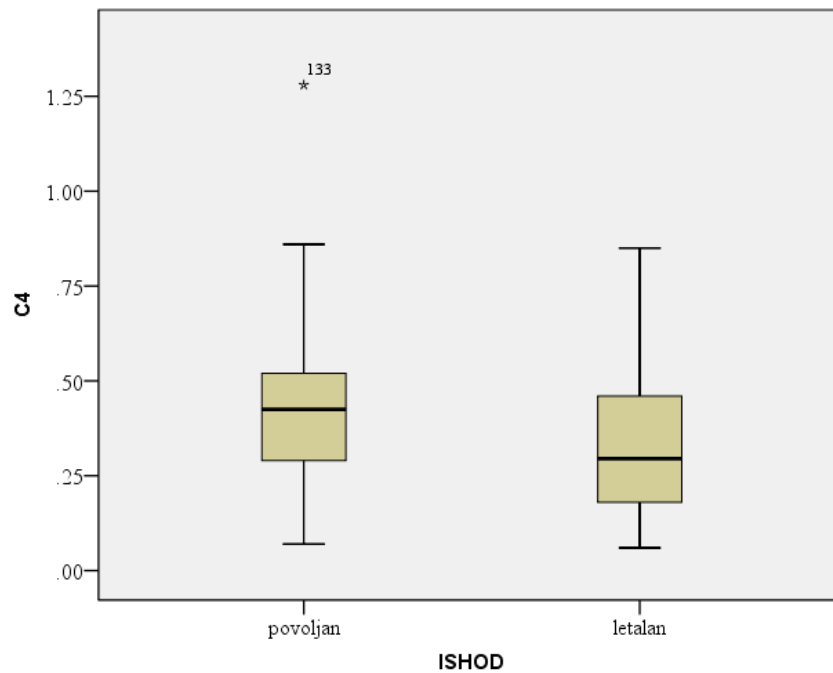
Tabela 25. Prediktivni značaj koncentracija komponenti komplemента za ishod sepse

	Ishod	n	$\bar{x}$	SD	Min	Max	Me	Mann-Whitney U	r	p
C3*	povoljan	104	1.16	0.44	0.33	3.01	1.13	1496.5	0.305	<b><u>0.000</u></b>
	letaln	46	0.90	0.42	0.37	1.83	0.82			
C4*	povoljan	104	0.43	0.18	0.07	1.28	0.42	1602.5	0.280	<b><u>0.001</u></b>
	letaln	46	0.33	0.18	0.06	0.85	0.29			

\* koncentracije izražene u [g/l]



Grafikon 21. Raspodele vrednosti C3 komponente komplemента u odnosu na ishod sepse



Grafikon 22. Raspodele vrednosti C4 komponente komplementa u odnosu na ishod sepse

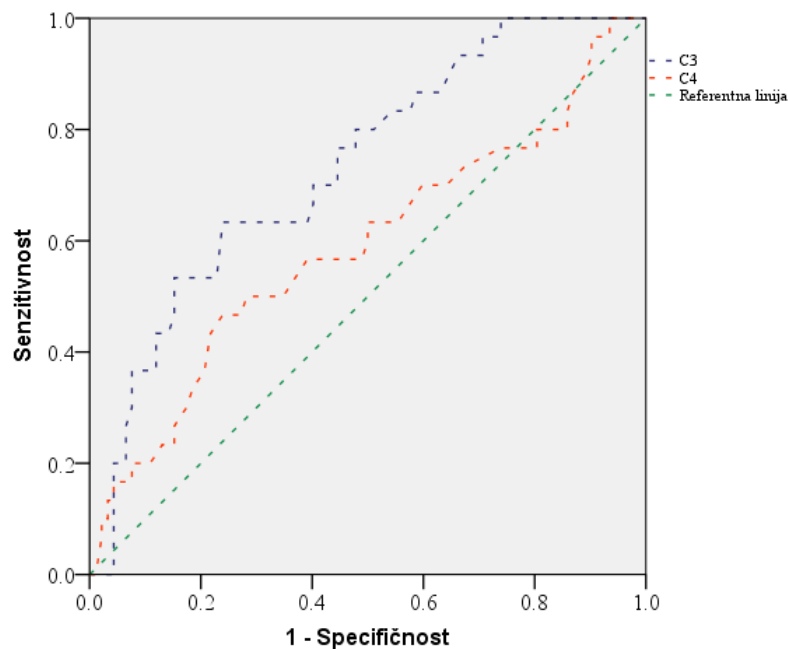
Koncentracije komponenti komplementa prvog dana hospitalizacije se uglavnom kreću u granicama referentnih vrednosti osim za bolesnike u septičkom šoku, kod kojih je registrovana srednja vrednost manja od referentne, dok je kod bolesnika sa MODS-om ta vrednost na donjoj granici referentnih vrednosti. Kod nekih bolesnika zabeležene su i koncentracije komponenti komplementa iznad gornje granice referentnih vrednosti.

Iako su koncentracije komplementa uglavnom u granicama referentnih, zapaža se visoko statistički značajna razlika u njihovim vrednostima kako u odnosu na težinu kliničke slike sepse gde su najniže koncentracije zabeležene u septičkom šoku, tako i u predikciji razvoja MODS-a i letalnog ishoda sepse, gde su takođe niže koncentracije prediktori lošijeg ishoda.

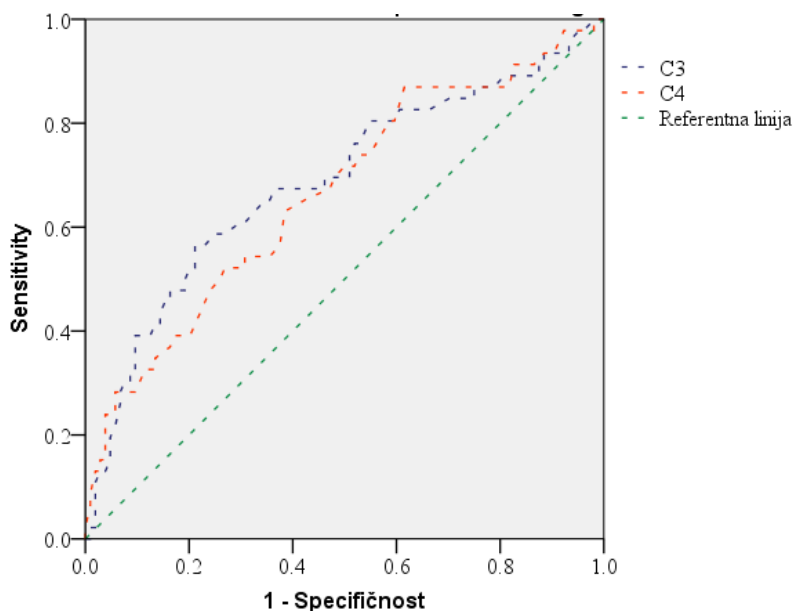
Koncentracije komponenti komplementa nisu se statistički značajno razlikovale kod sepsi uzrokovanih Gram pozitivnim i Gram negativnim bakterijama.

S obzirom na dostupnost ovih parametara u rutinskom radu, kao i na zapaženu visoko statistički značajnu razliku u koncentracijama posmatranih parametara u odnosu na prognozu toka bolesti, iako se one kreću u granicama referentnih vrednosti za zdravu populaciju, konstrukcijom ROC krive pokušali smo da odredimo *cut-off* vrednost koja bi bila granica predikcije razvoja MODS-a odnosno letalnog ishoda.

Na grafikonima 23 i 24 prikazane su ROC krive koje pokazuju prediktivni značaj C3 i C4 komponenti komplementa u predikciji razvoja MODS-a (Grafikon 23) i letalnog ishoda (Grafikon 24), dok su u Tabeli 26 prikazane vrednosti površina ispod krive (AUC), koje pokazuju da je C3 značajan prediktor MODS-a, dok su u predikciji ishoda značajni i C3 i C4. Najveću površinu ispod ROC krive pokazuje C3 u predikciji razvoja MODS-a u prvih 48h hospitalizacije.



Grafikon 23. ROC kriva koncentracija C3 i C4 kao prediktora razvoja MODS-a u prvih 48h hospitalizacije



Grafikon 24. ROC kriva koncentracija C3 i C4 kao prediktora letalnog ishoda sepsa.

Dobijeni rezultati ukazuju na to da sa senzitivnošću od 70% i specifičnošću od 60% možemo zaključiti da vrednosti C3 ispod 1,10 g/l (ref.opseg 0,9-2,1 g/l) predstavljaju loš prognostički znak kako za ishod tako i za razvoj MODS-a. Iako se sa navedenom senzitivnošću i specifičnošću testa ne mogu sa sigurnošću donositi klinički značajne odluke, ipak koncentracije C3 koje su bliske donjoj granici referentnih kod septičnih bolesnika mogu da posluže u rutinskom radu kao loš prognostički znak. Povećanje cut-off vrednosti na 1,2g/l povećalo bi senzitivnost testa na čak 80%, uz smanjenje specifičnosti na 50%.

Tabela 26. Vrednosti površine ispod ROC krive (AUC)

		AUC	p
C3	MODS 48h	<b>0.733</b>	<b><u>0.000</u></b>
	Ishod	<b>0.687</b>	<b><u>0.000</u></b>
C4	MODS 48h	0.589	0.145
	Ishod	<b>0.665</b>	<b><u>0.001</u></b>

## 5.7 Korelacije koncentracija komponenti komplementa i članova superfamilije TNF-a

S obzirom na poznatu ulogu komplementa u povezivanju urođenog i stečenog imuniteta, kao i dokazanu statističku značajnost posmatranih parametara imunog sistema u predikciji toka i ishoda sepse, i dobijene rezultate u kojima su članovi superfamilije TNF-a takođe pokazali visok prediktivni značaj, izračinali smo korelacije između posmatranih parametara imuniteta.

Pokazano je da solubilni TACI statistički značajno negativno korelira sa koncentracijama komponenti komplementa korelacijom slabog intenziteta (<0.3), dok koncentracije BAFF-a sa komponentama komplementa koreliraju pozitivno, takođe korelacijom slabog (<0.3) do umerenog intenziteta (0.3-0.5) – Tabela 27.

Tabela 27. Korelacije koncentracija komponenti komplementa i članova superfamilije TNF-a

		APRIL	BAFF	sTACI
C3	Spirmanov koeficijent $\rho$	-.100	<b>.238</b>	<b>-.232</b>
	p	.225	<b>.003</b>	<b>.004</b>
	n	150	150	150
C4	Spirmanov koeficijent $\rho$	<b>-.173</b>	<b>.372</b>	<b>-.190</b>
	p	<b>.034</b>	<b>.000</b>	<b>.020</b>
	n	150	150	150

## 5.8 Koncentracije imunoglobulina

S obzirom na osnovnu ulogu markera članova superfamilije TNF-a u stimulaciji proliferacije i aktivacije B limfocita i posledičnoj produkciji antitela analizirane su koncentracije imunoglobulina klase A, G i M u odnosu na težinu kliničke slike, uzročnika, razvoj MODS-a i ishod bolesti (Tabela 28), kao i njihove korelacije sa koncentracijama članova superfamilije TNF-a i komponenti komplementa (Tabela 29).

Tabela 28. Koncentracije cirkulišućih imunoglobulina u odnosu na težinu kliničke slike sepsa

Težina kliničke slike		$\bar{x}$	SD	Min	Max	Me	$\chi^2$	p
IgA	sepsa	1.93	1.02	0.58	4.89	1.69	17.809	<b><u>0.000</u></b>
	teška sepsa	2.22	1.81	0.60	9.66	1.76		
	septički šok	1.13	0.62	0.50	2.86	0.98		
	MODS	1.93	0.93	0.56	4.78	1.77		
IgG	sepsa	8.20	3.39	1.67	15.68	7.25	17.518	<b><u>0.001</u></b>
	teška sepsa	10.09	4.99	1.08	23.31	9.15		
	septički šok	<b>5.36</b>	3.32	1.22	11.71	3.94		
	MODS	8.53	3.76	1.52	20.08	8.60		
IgM	sepsa	0.87	0.39	0.25	1.18	0.83	18.658	<b><u>0.000</u></b>
	teška sepsa	1.16	0.83	0.08	4.87	0.99		
	septički šok	0.62	0.43	0.17	1.99	0.48		
	MODS	1.01	0.45	0.31	2.28	0.93		

Srednje vrednosti koncentracija IgA, IgG i IgM su uglavnom u granicama referentnih, osim u slučaju IgG klase gde se kod bolesnika sa septičkim šokom beleže koncentracije koje su



niže od referentnih. Iako u granicama referentnih, koncentracije sve tri klase imunoglobulina su statistički značajno niže kod obolelih od septičkog šoka u odnosu na ostale grupe bolesnika.

Koncentracije cirkulišućih imunoglobulina pri prijemu na našem uzorku se ne razlikuju statistički značajno u odnosu na razvoj MODS-a u prvih 48h hospitalizacije, grupu uzročnika kao ni ishod bolesti ( $p > 0.05$ ).

S obzirom da sekrecija imunoglobulina kao proteinskih struktura zahteva određeno vreme čak i za brzosekretujuće imunoglobuline niskog afiniteta, a posebno za sporsekretujuće imunoglobuline visokog afiniteta, ispitali smo korelaciju između koncentracija imunoglobulina i dužine trajanja bolesti pre hospitalizacije (Tabela 27). Dobijena je statistički značajna pozitivna korelacija između dužine trajanja bolesti pre hospitalizacije i koncentracija IgM i IgG antitela, dok koncentracija sekretornih IgA antitela ne korelira sa dužinom trajanja bolesti.

Tabela 29. Korelacija koncentracije imunoglobulina sa dužinom trajanja bolesti pre hospitalizacije

		IgA	IgG	IgM
Dužina trajanja bolesti pre hospitalizacije	Spirmanov koeficijent $\rho$	.133	<b>.222</b>	<b>.206</b>
	p	.106	<b>.006</b>	<b>.012</b>
	n	150	150	150

Zbog bliskih patofizioloških odnosa članova superfamilije TNF-a i komponenti komplementa sa cirkulišućim imunoglobulinima izračunate su korelacije navedenih parametara (Tabela 30).

Tabela 30. Korelacije koncentracija imunoglobulina sa članovima superfamilije TNF-a i komponentama komplementa.

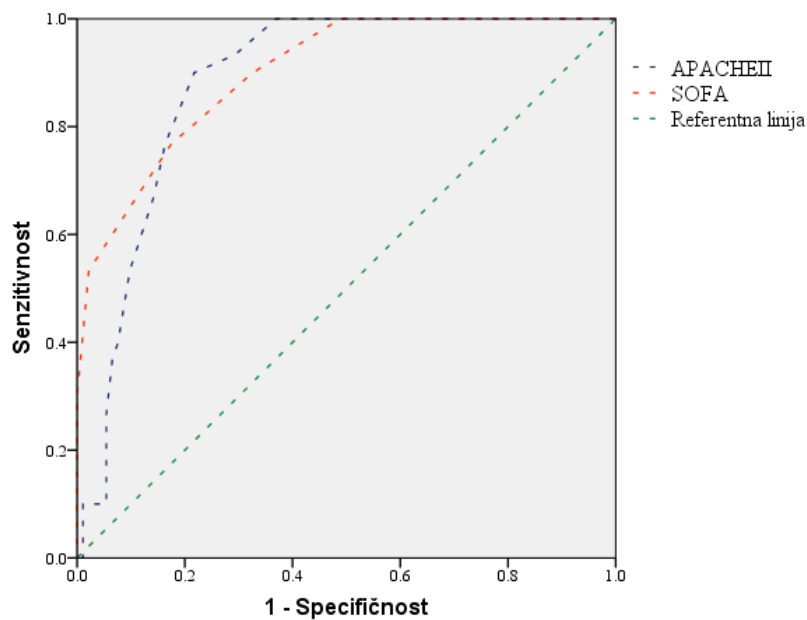
		APRIL	BAFF	TACI	C3	C4
IgA	Spirmanov koeficijent $\rho$	.042	-.028	-.021	<b>.316</b>	<b>.290</b>
	p	.607	.736	.798	<b>.000</b>	<b>.000</b>
	n	150	150	150	150	150
IgG	Spirmanov koeficijent $\rho$	.108	-.052	-.136	<b>.380</b>	<b>.308</b>
	p	.186	.525	.097	<b>.000</b>	<b>.000</b>
	n	150	150	150	150	150
IgM	Spirmanov koeficijent $\rho$	-.025	.129	-.152	<b>.376</b>	<b>.399</b>
	p	.757	.117	.063	<b>.000</b>	<b>.000</b>
	n	150	150	150	150	150

Koncentracije cirkulišućih imunoglobulina statistički značajno pozitivno koreliraju sa koncentracijama komponenti komplementa korelacijom srednjeg intenziteta, dok sa članovima superfamilije TNF-a ne koreliraju statistički značajno.

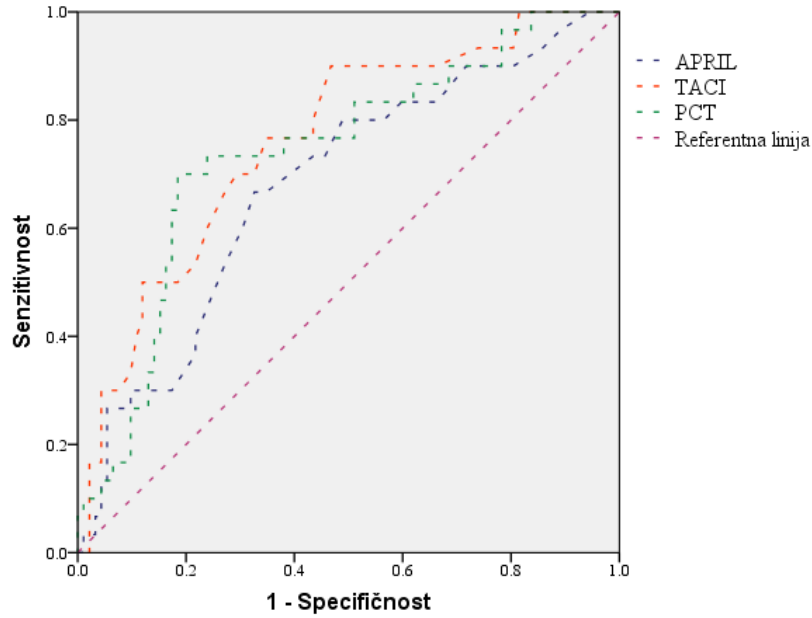
## 5.9 Prediktori razvoja MODS-a

Sa ciljem kvantifikovanja i poređenja diskriminativne sposobnosti pojedinačnih parametara da predvide razvoj MODS-a unutar 48h hospitalizacije kao i letalni ishod bolesti konstruisali smo ROC krive za one parametre koji su se prvobitnim poređenjem grupa pokazali značajnim prediktorima.

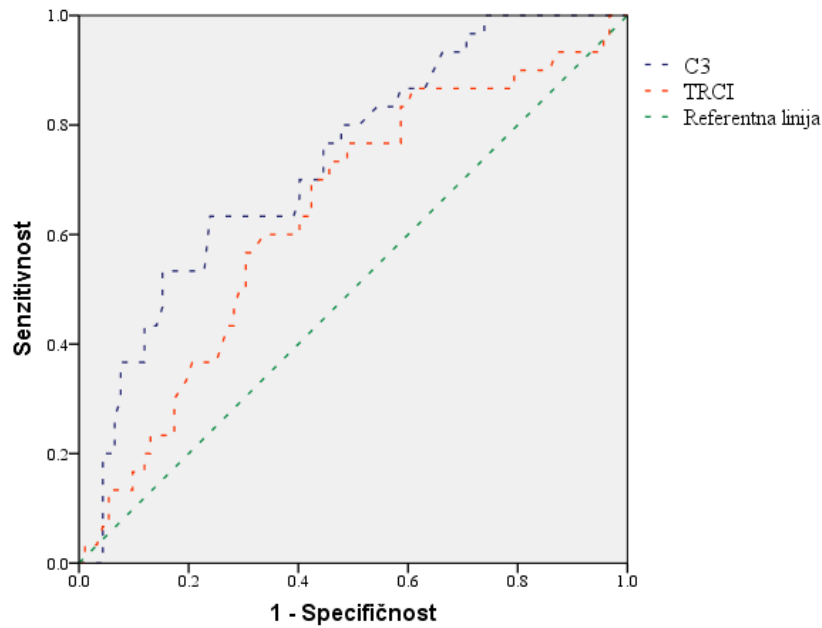
ROC krive za parametre značajne u predikciji MODS-a prikazane su na grafikonima 22, 23 i 24.



Grafikon 22. ROC kriva APACHE II i SOFA skora za predikciju razvoja MODS-a unutar 48h hospitalizacije



Grafikon 23. ROC kriva imunoloških markera (APRIL, sTACI, PCT) za predikciju razvoja MODS-a unutar 48h hospitalizacije



Grafikon 24. ROC kriva za C3 i trombocite kao prediktore razvoja MODS-a unutar 48h hospitalizacije

Površine ispod navedenih ROC krivih (*Area Under The Curve = AUC*) kao i nivoi statističke značajnosti prikazani su u Tabeli 27. Svi navedeni prediktori potvrđuju statističku značajnost dobijenu Mann-Whitney U testom.

Tabela 27. Prediktori MODS-a

	AUC	p
SOFA	<b>0.901</b>	<b><u>0.000</u></b>
APACHE II	<b>0.883</b>	<b><u>0.000</u></b>
PCT	0.739	<b><u>0.000</u></b>
APRIL	0.682	<b><u>0.003</u></b>
sTACI	<b>0.761</b>	<b><u>0.000</u></b>
C3	0.733	<b><u>0.000</u></b>
Trc	0.639	<b><u>0.022</u></b>

Na osnovu vrednosti AUC možemo zaključiti da je najznačajniji prediktor razvoja MODS-a SOFA skor. AUC vrednost od 0.901 govori u prilog tome da svaki pacijent kod kojeg je došlo do razvoja MODS-a ima vrednost SOFA skora veću od 90.1% bolesnika kod kojih nije došlo do razvoja MODS-a. Drugi najznačajniji prediktor je APACHE II skor (AUC=0.883).

Od pojedinačnih biomarkera najbolju prediktivnu moć pokazuje sTACI, čija AUC iznosi 0.761. Do sada rutinski korišćen inflamatorni biomarker PCT pokazuje slabiju prediktivnu moć od TACI-ja (AUC=0.739). Iako uglavnom u granicama referentnih vrednosti za zdravu populaciju, niže vrednosti C3 komponente komplementa pokazuju prediktivni značaj praktično

jednak prokalcitoninu (AUC=0.733). APRIL i broj trombocita su takođe statistički značajni prediktori ( $p_{\text{APRIL}}=0.003$ ,  $p_{\text{Trci}}=0.022$ ), ali sa vrednostima AUC koje se klasifikuju kao niske.

*Cut-off* vrednosti sTACI-ja, APRIL-a i C3 komponente komplementa u predikciji razvoja MODS-a date su u odeljku o prediktivnom značaju svakog od navedenih parametara. Imajući u vidu široku upotrebu prokalcitonina u rutinksoj praksi kao i veliki broj literaturnih podataka o graničnim vrednostima prokalcitonina i njegovoj praktičnoj primeni, odredili smo granične vrednosti ovog markera i na našem uzorku. Pokazano je da najbolje balansiran odnos senzitivnosti i specifičnosti za PCT iznosi svega 70%, što ipak nije dovoljno da bi se odredila jedna granična vrednost na koju bi se moglo osloniti u svakodnevnom radu. Stoga je određena vrednost na osnovu koje bi se sa 90% specifičnosti mogao predvideti nepovoljan ishod sepse i koja iznosi >140ng/ml, uz napomenu da je senzitivnost ove granične vrednosti izuzetno mala, tj. niže vrednosti od 140ng/ml ne isključuju nepovoljan tok bolesti. Sa 90% sigurnosti nepovoljan tok može da se isključi tek na vrednostima ispod 4,5ng/ml. Veliki opseg koncentracija PCT-a dobijen našim istraživanjem potvrđuje literaturne navode da inicijalne vrednosti ovog biomarkera ne mogu da posluže kao značajni prediktori toka sepse, te da bi praćenje kretanja njegovih koncentracija kroz vreme dalo mnogo relevantnije rezultate.

Radi procene prediktivnog značaja svih posmatranih parametara kao celine sprovedena je binarna logistička regresija. U model su uključeni parametri koji su prethodnim analizama pokazali najveći prediktivni značaj. S obzirom na visoki koeficijent korelacije između SOFA i APACHE II skora (Spirman  $\rho=0.882$ ) u regresioni model zbog kolinearnosti nisu mogla biti uvrštena oba skora, te je izabran skor sa većim prediktivnim značajem – SOFA. Pored SOFA

skora u model su kao nezavisne promenljive uvršteni PCT, sTACI, APRIL i C3. Trombociti nisu uvršteni u model jer su kao varijabla sadržani u SOFA skoru pa sa njim takođe visoko koreliraju.

Model je u celini bio statistički značajan  $\chi^2$  (5, N=122) = 69.794, p=0.000, što pokazuje da model uspešno razlikuje bolesnike kod kojih je došlo do razvoja MODS-a od onih kod kojih nije došlo do razvoja MODS-a. Model u celini objašnjava između 43.6 i 64.8% varijanse u smislu razvoja MODS-a i tačno klasifikuje 86.9% slučajeva. Uvođenjem u regresioni model od posmatranih prediktora samo su dve nezavisne promenljive (SOFA skor p=0.000 i sTACI p=0.004) dale jedinstven statistički značajan doprinos modelu kao celini. Najjači prediktor ostao je SOFA skor čiji je količnik verovatnoće 2.15, dok je količnik verovatnoće za sTACI 1.001 (Tabela 28).

Tabela 28. Regresioni model za predikciju razvoja MODS-a u prvih 48h

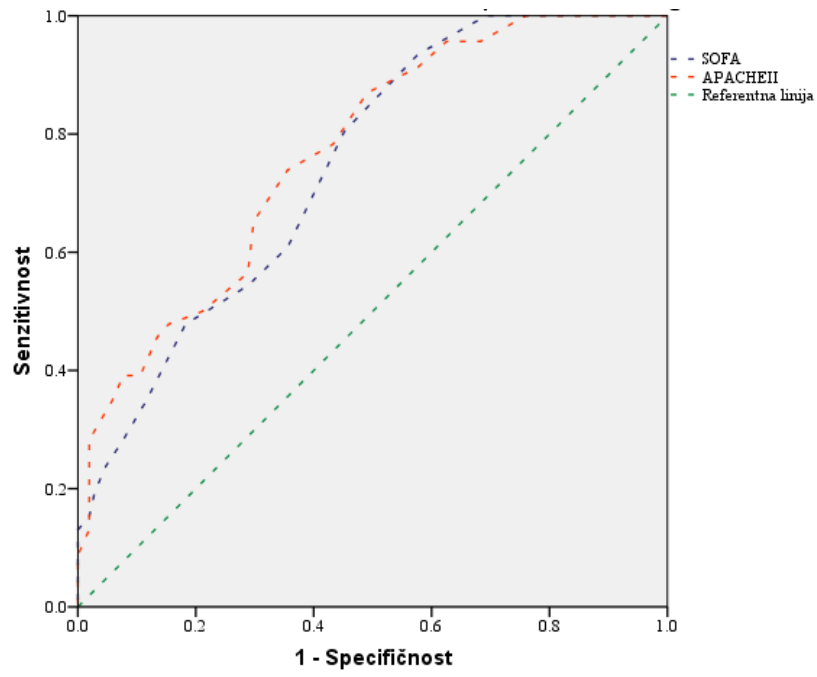
	B	S.E.	Wald	Df	Sig.	Exp(B)	95% C.I. for EXP(B)	
							Lower	Upper
SOFA	.764	.172	<b><u>19.707</u></b>	1	<b><u>.000</u></b>	2.148	1.532	3.010
sTACI	.001	.000	<b><u>7.334</u></b>	1	<b><u>.004</u></b>	1.001	1.000	1.002
PCT	.004	.003	1.333	1	.248	1.004	.997	1.010
APRIL	.034	.055	.386	1	.534	1.035	.929	1.152
C3	-1.304	1.013	1.656	1	.198	.271	.037	1.978
Constant	-5.583	1.725	10.473	1	.001	.004		

Pozitivna prediktivna moć modela iznosi 77% što znači da je od ukupnog broja bolesnika kod kojih je došlo do razvoja MODS-a model tačno klasifikovao njih 77%. Negativna prediktivna vrednost iznosi 90% i ukazuje na to da je od ukupnog broja bolesnika kod kojih nije došlo do razvoja MODS-a model tačno klasifikovao njih 90%. Dakle, model sa sigurnošću od 90% predviđa da do razvoja MODS-a neće doći, dok razvoj MODS-a predviđa sa sigurnošću od 77%.

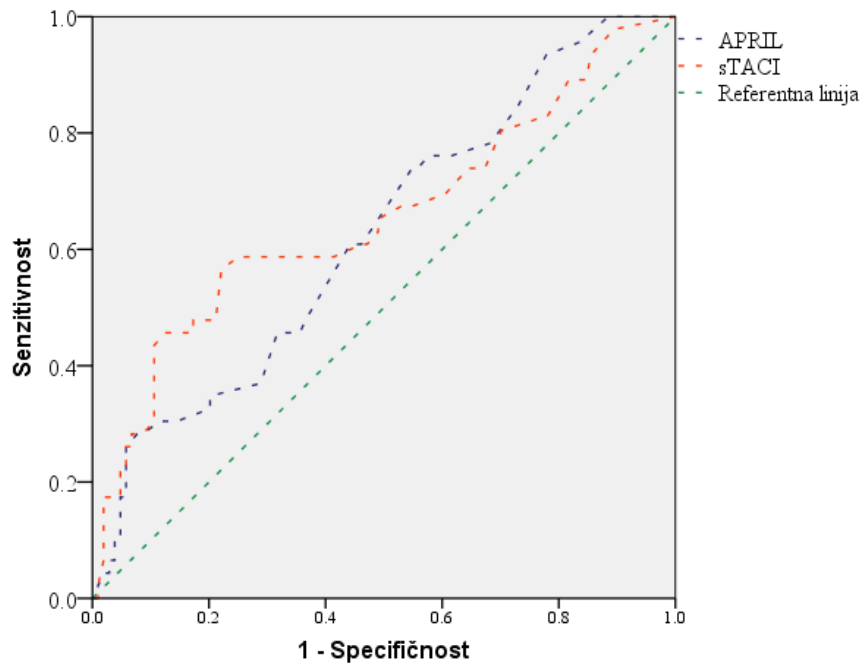
## **5.10 Prediktori letalnog ishoda**

ROC krive prediktora letalnog ishoda prikazane su na grafikonima 25, 26, 27 i 28. Svi posmatrani parametri pokazuju manju sposobnost predviđanja ishoda u odnosu na predviđanje MODS-a. U Tabeli 29 prikazane su vrednosti površina ispod ROC krive koje pokazuju da i u predikciji ishoda najveći značaj imaju scoring sistemi koji obuhvataju veći broj kliničkih parametara (APACHE II i SOFA skor), s tim što u predikciji ishoda veći prediktivni značaj pokazuje APACHE II skor u koji ulaze i godine života bolesnika, za razliku od predikcije MODS-a gde je najveći značaj imao SOFA skor koji uključuje isključivo trenutno funkcionalno stanje organskih sistema. Od pojedinačnih biomarkera u predikciji ishoda najveći značaj pokazuje protrombinsko vreme.

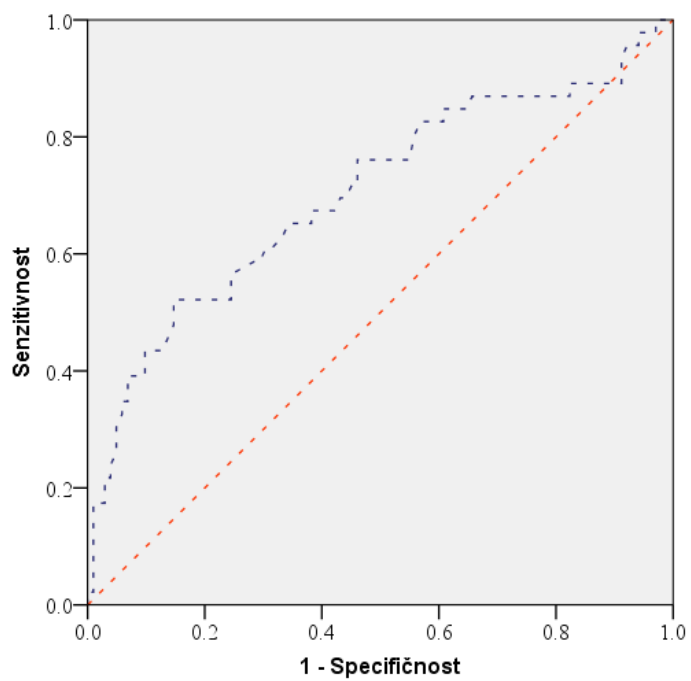




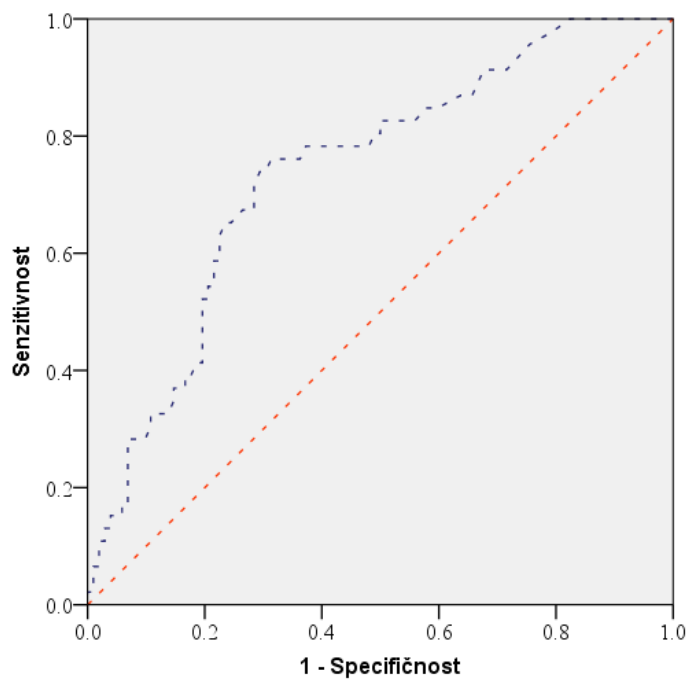
Grafikon 25. ROC kriva SOFA i APACHE II skora kao prediktora letalnog ishoda sepse



Grafikon 26. ROC kriva APRIL-a i sTACI-ja kao prediktora ishoda sepse



Grafikon 27. ROC kriva fibrinogena kao prediktora ishoda sepse



Grafikon 28. ROC kriva PT-a kao prediktora ishoda sepse

Tabela 29. Prediktori letalnog ishoda

	AUC	P
SOFA	<b>0.745</b>	<b><u>0.000</u></b>
sAPACHE II	<b>0.768</b>	<b><u>0.000</u></b>
Fibrinogen	0.704	<b><u>0.000</u></b>
APRIL	0.621	<b><u>0.019</u></b>
sTACI	0.656	<b><u>0.002</u></b>
PT	<b>0.739</b>	<b><u>0.000</u></b>

Binarna logistička regresija sprovedena je i za ishod bolesti. U model su ponovo uključeni parametri koji su prethodnim analizama pokazali najveći prediktivni značaj. Zbog visokog koeficijenta korelacije između APACHE II i SOFA skora (Spirman  $\rho=0.882$ ) u regresioni model zbog kolinearnosti nisu mogla biti uvrštena oba skora, te je izabran skor sa većim prediktivnim značajem – APACHE II. Kao nezavisne promenljive u model su uvršteni i fibrinogen, APRIL, sTACI i PT.

Model je u celini bio statistički značajan  $\chi^2$  (5, N=150) = 51.455, p=0.000, što pokazuje da model uspešno razlikuje bolesnike kod kojih je došlo do letalnog ishoda od onih koji su preživeli. Model u celini objašnjava između 29.4 i 41.3% varijanse u smislu letalnog ishoda i tačno klasifikuje 79.1% slučajeva. Uvođenjem u regresioni model od posmatranih prediktora tri nezavisne promenljive (APACHE II skor p=0.000, sTACI p=0.028 i fibrinogen p=0.031) dale su jedinstven statistički značajan doprinos modelu kao celini. Najjači prediktor ostao je APACHE II skor čiji je količnik verovatnoće 1.155, dok je količnik verovatnoće za TACI 1.001, a za fibrinogen 0.719 (Tabela 30).

Pozitivna prediktivna moć modela iznosi 72.7% što znači da je od ukupnog broja umrlih bolesnika model tačno klasifikovao njih 72.7%, dok negativna prediktivna moć iznosi 80.9% i ukazuje na to da je od ukupnog broja preživelih bolesnika model tačno klasifikovao njih 80.9%. Dakle, model sa sigurnošću od 80.9% predviđa da će pacijent preživeti, a sa sigurnošću od 72.7% predviđa smrtni ishod.

Tabela 30. Regresioni model za predikciju letalnog ishoda

	B	S.E.	Wald	Df	Sig.	Exp(B)	95% C.I. for EXP(B)	
							Lower	Upper
APACHE II	.141	.036	<b><u>15.723</u></b>	1	<b><u>.000</u></b>	1.151	1.074	1.234
APRIL	.034	.038	0.799	1	.371	1.034	.960	1.114
TACI	.001	.000	<b><u>4.821</u></b>	1	<b><u>.028</u></b>	1.001	1.000	1.001
Fibrinogen	-.330	.153	<b><u>4.668</u></b>	1	<b><u>.031</u></b>	.719	.532	.970
PT	.393	.311	1.579	1	.206	1.481	.805	2.724
Constant	-5.583	1.244	5.438	1	.020	.055		

## 6 DISKUSIJA

Prema podacima iz vodećih svetskih udžbenika iz infektologije i intenzivne terapije prosečna starost obolelih od sepse je 60 godina (11). Podaci iz novijih istraživanja ne donose nikakve promene u uzrasnoj strukturi pacijenata sa sepsom navodeći prosečnu starost između 60 i 65 godina. Kao jedan od najznačajnijih faktora rizika za nastanak infekcije i njenu progresiju do sepse navodi se starija životna dob (71,72), dok se podaci o uticaju uzrasta na razvoj težih oblika bolesti, težinu kliničke slike, tok i ishod sepse razlikuju od istraživanja do istraživanja, pre svega u zavisnosti od metodološke postavke studije (71). Većina literaturnih navoda ističe uzrast preko 65 godina kao nezavisni faktor rizika za letalni ishod sepse (72–74), dok pojedini autori ne nalaze statistički značajan uticaj godina života na ishod sepse (75). Na našem uzorku prosečna starost bolesnika iznosila je 60 godina što je u skladu sa svetskim prosekom. Iako su bolesnici kod kojih se bolest završila letalnim ishodom stariji od preživelih u proseku za oko 4 godine, ta razlika nije statistički značajna, što je najverovatnije posledica velike standardne devijacije. Pored toga, verovatni uzrok nepostojanja statistički značajne razlike u uzrastu bolesnika u odnosu na težinu kliničke slike, tok i ishod bolesti predstavlja i činjenica da na našem uzorku ni u jednoj grupi bolesnika srednja vrednost uzrasta ne prelazi 65 godina.

Muškarci su skloniji oboljevanju od sepse nego žene (7,71), što je potvrđeno i na našem uzorku (58% bolesnika muškog i 42% ženskog pola). Potencijalno objašnjenje za ovaj fenomen daju studije koje ističu uticaj polnih hormona na pre svega humoralni imunitet (76), koje navode da androgeni imaju imunodepresivno a estrogeni imunostimulativno dejstvo. Tvrdnje o dominantno proinflamatornom dejstvu estrogena potkrepljene su i nespornom činjenicom da su

žene generativne dobi sklonije oboljevanju od autoimunih bolesti u odnosu na muškarce iste starosne grupe. Dokazana manja incidenca, kao i povoljniji ishod sepse kod žena mlađih od 50 godina u odnosu na muškarce iste starosne dobi (77), može se tumačiti i u svjetlu novijih teorija o patogenezi sepse koje ističu da je dominacija antiinflamatornog odgovora i posledična nereaktivnost imunog sistema jedan od najvažnijih razloga za nepovoljan ishod sepse, pri čemu estrogeni koji imaju stimulatívno dejstvo na humoralni imunitet mogu biti odgovorni za ovu razliku u mortalitetu, tim pre što ta polna razlika u mortalitetu nije zabeležena kod starijih od 50 godina (77). Dodatno objašnjenje za povoljniji ishod sepse kod žena generativne dobi u odnosu na muškarce iste uzrasne kategorije može se naći i u dokazanom protektivnom uticaju estrogena na kardiovaskularni sistem, koji igra značajnu ulogu u razvoju septičkog šoka (78). S obzirom na činjenicu da je na našem uzorku prosečna starost bolesnika bila oko 60 godina, ne iznenađuje podatak da ne postoji statistički značajna razlika između polova kako u težini kliničke slike, tako ni u razvoju MODS-a, niti u ishodu bolesti. Imajući u vidu sve ove činjenice započeta su ispitivanja eventualne primene antagonista androgena ili agonista estrogena kao terapijske opcije u cilju pojačavanja imunog odgovora i posledičnog smanjenja komplikacija, te poboljšanja ishoda sepse (78).

Naši rezultati pokazuju da se oboleli od sepse u bolnicu javljaju prosečno trećeg dana od početka bolesti. Nagliji tok bolesti i ranije javljanje u bolnicu zabeleženo je kod bolesnika sa septičkim šokom, verovatno kao posledica dramatičnije kliničke slike i izraženijih simptoma šoka u odnosu na ostale oblike bolesti. Literaturni podaci o prosečnoj dužini hospitalizacije obolelih od sepse značajno variraju, pre svega u zavisnosti od organizacije zdravstvenog sistema zemlje u kojoj je istraživanje sprovedeno. Američki Centar za kontrolu i prevenciju bolesti

(CDC) navodi da je prosečna dužina hospitalizacije obolelih od sepse 9 dana, s tim što je kod svega 30% bolesnika zabeležen otpust na dalje kućno lečenje, dok je čak kod 39% slučajeva lečenje nastavljeno u drugoj ustanovi (79). Na našem uzorku pacijenti značajno duže ostaju na bolničkom lečenju (16 dana), pre svega zbog činjenice da organizacija našeg zdravstvenog sistema podrazumeva ostanak u bolnici dok se bolesnik ne osposobi za samostalan nastavak lečenja u kućnim uslovima. Slične podatke iznose i istraživanja sprovedena u Kanadi gde je prosečna dužina hospitalizacije septičnih bolesnika 26 dana (80), dok španski autori navode prosečan ostanak u bolnici od čak 36 dana (81) što je i očekivano imajući u vidu da su studijom obuhvaćeni samo oboleli od septičkog šoka, koji svakako zahtevaju duži ostanak u bolnici od lakših oblika bolesti.

Poznata je činjenica da prisustvo komorbiditeta i opšte stanje pacijenta značajno utiču na sklonost ka infekcijama. Kao najznačajniji faktori rizika prepoznata su stanja imunodeficijencije, maligne bolesti, dijabetes melitus, zloupotreba alkohola, dekompenzovana ciroza jetre i hronična opstruktivna bolest pluća (82). Podaci o uticaju ovih parametara na težinu kliničke slike i ishod bolesti značajno su oskudniji. Na našem uzorku ne postoji statistički značajna razlika u broju i vrsti komorbiditeta u odnosu na težinu kliničke slike, tok i ishod sepse. Ovi rezultati mogu se objasniti činjenicom da su prema kriterijumima za isključivanje iz studije isključeni svi bolesnici za koje se pretpostavilo da bi mogli imati povišene koncentracije citokina članova superfamilije TNF-a zbog komorbidnog stanja (pre svega oboleli od autoimunih i malignih bolesti).

Literaturni podaci ističu respiratorni trakt kao najčešće ishodište sepse, navodeći da je čak oko 50% sepsi porekla respiratornih puteva (7). Mayr i saradnici iznose podatke o učešću sepsi porekla respiratornog trakta od 41,8% kod muškaraca i 35,8% kod žena (71), dok Quenot i

saradnici prijavljuju procenat od čak 53,6%, obuhvatajući samo pacijente sa septičkim šokom (83). U našoj studiji taj procenat je značajno manji, sa 12,7% slučajeva, sepse porekla respiratornog trakta na našem uzorku zauzimaju treće mesto po učestalosti. Ovakav rezultat ne iznenađuje s obzirom na činjenicu da u Vojvodini postoji specijalizovana ustanova za lečenje infekcija respiratornog trakta, te se takvi pacijenti u znatno manjem procentu hospitalizuju u Kliničkom centru Vojvodine na Klinici za infektivne bolesti (uglavnom bivaju inicijalno primljeni pod dijagnozom nejasnog febrilnog stanja), dok pacijenti sa težim infekcijama donjih respiratornih puteva bivaju upućeni na Institut za plućne bolesti u Sremskoj Kamenici. Manja zastupljenost infekcija respiratornih puteva za sobom povlači relativno (procentualno) povećanje učestalosti ostalih ishodišta sepse. Upravo to je razlog zbog kojeg infekcije urinarnog trakta i intraabdominalne infekcije, koje u svetu zauzimaju drugo i treće mesto prema učestalosti (7,71,83), na našem uzorku postaju najzastupljenije sa 28,7% i 26,0% bolesnika. S obzirom na činjenicu da je naše istraživanje sprovedeno na Klinici za infektivne bolesti i JIL UC KCV ne iznenađuje procentualno veća zastupljenost infekcija CNS-a (71). Procenat sepsi sa neidentifikovanim ishodištem na našem uzorku sličan je podacima objavljenim širom sveta i iznosi 9,3% (6), dok se svetski prosek kreće između 6 i 21% (71).

Uprkos razvoju mikrobioloških tehnika izolacije uzročnika, podaci iz najrazvijenijih zemalja o procentu mikrobiološki identifikovanih uzročnika sepse još uvek se kreću oko 50-70% (7,10,11). Rezultati SOAP studije pokazuju nešto niži procenat pozitivnih izolata (38,6%), što je u korelaciji sa rezultatima EPISEPSIS studije koja prijavljuje smanjenje broja mikrobiološki potvrđenih uzročnika sepse za čak 10% (84,85). Na našem uzorku procenat pozitivnih izolata je u skladu sa podacima SOAP studije i iznosi 34%. Uzrok relativno niskog procenta dobijenih



pozitivnih kultura može biti i protokol o ranom uvođenju empirijske antibiotske terapije, koja se u interesu bolesnika nekada ordinira i pre uzimanja uzoraka telesnih tečnosti za mikrobiološku analizu.

U proteklih 20-ak godina zabeležen je porast učestalosti sepsi uzrokovanih Gram pozitivnim uzročnicima (7,71). Razlog tome leži pre svega u sve većoj upotrebi invazivnih procedura čija posledica uprkos primeni principa asepsa i antisepsa ipak može da bude jatrogena infekcija uzročnicima normalne komensalne flore kože (71). Drugi razlog je i činjenica da se ranijih godina o sepsi razmišljalo uglavnom u kontekstu reakcije na lipopolisaharid Gram negativnih bakterija, te su i epidemiološki podaci o naglom porastu zastupljenosti Gram pozitivnih sepsi nepouzdati. Sepse uzrokovane Gram pozitivnim bakterijama danas brojčano sustižu broj septičnih bolesnika kod kojih je bolest uzrokovana Gram negativnim uzročnicima (7). Iako je zapažena sve veća učestalost sepsi uzrokovanih Gram pozitivnim bakterijama, multicentrična studija koja je obuhvatila 7087 bolesnika lečenih u 1265 JIL iz 75 različitih zemalja sveta a čiji su rezultati objavljeni krajem 2009. godine, navodi podatke da su infekcije uzrokovane Gram negativnim bakterijama još uvek učestalije od onih uzrokovanim Gram pozitivnim uzročnicima (62.2% vs. 46.8%) (86). Druga multicentrična studija koja je obuhvatila pacijente sa dijagnozom septičkog šoka lečene u 14 JIL u Francuskoj (2013. godine) takođe prijavljuje veću učestalost sepsi uzrokovanih Gram negativnim bakterijama (63.9% naspram 35.9% Gram pozitivnih izolata) (83). Naši podaci su veoma slični navedenom svetskom proseku: od ukupno 52 pozitivna izolata 63.4% sepse bio je uzrokovanom Gram negativnim, a 36.6% Gram pozitivnim bakterijama.

U istoj studiji najzastupljeniji uzročnici bili su *Staphylococcus aureus* (20.5%), *Pseudomonas species* (19.9%), *Enterobacteriaceae* (uglavnom *E.coli*, 16.0%) i gljivice (19%). *Acinetobacter* bio je uzročnik infekcije kod 9% bolesnika, sa značajnim varijacijama u zavisnosti od regiona (3.7% u Severnoj Americi i čak 19.2% u Aziji) (86). Na našem uzorku podaci se razlikuju pre svega zbog prirode ustanova u kojima je vršeno istraživanje. S obzirom na činjenicu da se u KCV u veoma malom procentu leče pacijenti oboleli od infekcija respiratornih puteva i endokarditisa, na našem uzorku zabeležena je manja zastupljenost pozitivnih izolata *S.aureusom* (9.6%) u odnosu na prosek prijavljen na uzorku od 715 JIL različite prirode. Iz istog razloga zastupljenost sepsi uzrokovanih *S.pneumoniae* (15.4%) i *N.meningitidis* (7.7%) je na našem uzorku veća od prosečne, jer su naš uzorak velikim delom činili pacijenti lečeni na Klinici za infektivne bolesti koja je jedina ustanova za zbrinjavanje purulentnih meningoencefalitisa. Učestalost sepsi uzrokovanih *E.coli* slična je svetskom proseku (15,4%), dok je učestalost infekcije *Acinetobakterom* (17,3%) bliža podacima koji dolaze iz Azije u odnosu na američke studije.

Prema kriterijumima korišćenim u našem istraživanju procenat bolesnika klasifikovanih kao sepsa u svetskim studijama kreće se oko 10%, teška sepsa 20-50% a septički šok 40-80% (7). Velike varijacije u procentima posledica su različitih kriterijuma za uključivanje pacijenata u studiju. Studije koje u istraživanje uključuju isključivo pacijente iz jedinica intenzivnog lečenja prijavljuju značajno viši procenat pacijenata sa septičkim šokom, dok studije koje uključuju sve bolnički lečene pacijente prijavljuju veći procenat lakših oblika bolesti. Podatak da svega oko 50% bolnički lečenih septičkih pacijenata biva smešteno u jedinice intenzivne nege (71) potkrepljuje ovo objašnjenje razlike u podacima. Naši podaci su saglasni sa podacima studija

koje se bave ispitivanjem svih hospitalizovanih pacijenata. Procenat bolesnika klasifikovanih kao sepsa u našoj studiji iznosi 23.3%, teška sepsa 44.0%, dok su teži oblici bolesti (septički šok i MODS) bili zastupljeni u 32.7% slučajeva.

Smrtnost od sepse u svetu kreće se oko 25%, sa najvećom smrtnošću od septičkog šoka koja iznosi 50% (71). Nakon implementacije preporuka definisanih u okviru *Surviving Sepsis Campaign* zabeležen je značajan pad mortaliteta (71). Studija iz 2010. godine prijavljuje pad mortaliteta obolelih od septičkog šoka sa 57% na 37% nakon implementacije navedenih protokola (81), a veoma slični podaci objavljeni su i ove godine: u periodu od 2003. do 2008. godine mortalitet od sepse u JIL iznosio je 52%, a nakon toga je zabeležen pad na 41% (9). Multicentrična studija sprovedena u Fancuskoj prijavljuje smrtnost od 42% (83). Na našem uzorku podaci o mortalitetu su veoma slični literaturnim. Smrtnost na celokupnom uzorku iznosi 30.7%, dok je smrtnost od septičkog šoka 42.9%.

Skoring sistemi korišćeni u rutinskom radu u JIL predstavljaju osnov za klasifikaciju bolesnika u kategoriju teške sepse u odnosu na sepsu bez oštećenja organskih sistema (1,4), stoga ne iznenađuje činjenica da su se u našem kao i u drugim istraživanjima (87), pokazali kao najbolji prediktori težine kliničke slike bolesti. Ispitivanjem značaja skoring sistema u predikciji razvoja težih oblika bolesti Chan i sar. navode APACHE II kao nezavisni prediktor razvoja septičkog šoka (88). Na našem uzorku na osnovu površine ispod ROC krive SOFA skor je pokazao veći prediktivni značaj u odnosu na razvoj MODS-a u odnosu na APACHE II.

Kumulativno oštećenje organa je najbolji prediktor smrtnog ishoda, uključujući kako broj disfunkcionalnih organskih sistema tako i stepen disfunkcije (71). I u našem istraživanju kao najbolji prediktor smrtnog ishoda pokazali su se SOFA i APACHE II skor, sa vrednostima

površine ispod ROC krive koje ne odstupaju značajno od rezultata ostalih istraživača (75,88–90). Za razliku od predikcije razvoja težih oblika bolesti u kojoj je SOFA skor superiorniji od APACHE II skora, u slučaju predikcije mortaliteta boljim se pokazao APACHE II, verovatno zbog činjenice da uključuje i uzrast bolesnika.

Iako su povišene vrednosti leukocita jedan od četiri SIRS kriterijuma koji su polazna osnova svih definicija sepse, značaj leukocitoze u sepsi je isključivo dijagnostički. Povišene vrednosti broja leukocita ukazuju na inflamaciju, ali broj leukocita ne korelira sa težinom kliničke slike, nije prediktor razvoja komplikacija niti letalnog ishoda (65,90–92), što je pokazano i na našem uzorku. U sve četiri grupe bolesnika vrednosti leukocita su bile povišene, ali se broj leukocita nije pokazao kao značajan prediktor kako težine kliničke slike bolesti, tako ni razvoja MODS-a, niti smrtnog ishoda.

Kao protein akutne faze zapaljenja čije koncentracije naglo rastu u svim stanjima inflamacije, CRP je značajan dijagnostički marker svih inflamatornih stanja, uključujući i infekcije. Međutim, brojnim ispitivanjima nije se pokazao značajnim u predikciji razvoja komplikacija niti ishoda sepse (65,66,90,91,93), što je potvrđeno i našim istraživanjem u kojem se vrednosti CRP-a ne razlikuju statistički značajno u odnosu na težinu kliničke slike, razvoj MODS-a u prvih 48h hospitalizacije, niti u odnosu na ishod bolesti.

Prokalcitonin se smatra najznačajnijim rutinski korišćenim biomarkerom sepse. Ipak, rezultati istraživanja koja se bave njegovim dijagnostičkim i prognostičkim značajem još uvek su kontradiktorni (94). Istraživanja su uglavnom saglasna sa činjenicom da nivo PCT-a korelira sa težinom kliničke slike bolesti (61,64,87,93,95,96), što pokazuju i naši rezultati. Značaj PCT-a u

predikciji razvoja septičkog šoka i MODS-a kod pacijenata inicijalno prezentovanih lakšim oblicima bolesti pokazan je u nekoliko istraživanja. Chan i sar. prijavljuju PCT kao nezavisni prediktor razvoja septičkog šoka, uz APACHE II skor (88), dok je prognostički značaj PCT-a u razvoju MODS-a evaluiran od strane nekoliko autora (93,97,98). Naši rezultati saglasni su sa literaturnim navodima u kojima PCT pokazuje dobru prediktivnu vrednost u razvoju MODS-a, koja je nešto niža od prediktivnog značaja SOFA i APACHE II skora.

Prognostički značaj PCT-a u predikciji letalnog ishoda uprkos brojnim istraživanjima ostao je nejasan. Pojedini autori navode da vrednosti PCT-a na dan prijema u bolnicu jesu značajan prediktor ishoda (90), dok rezultati drugih istraživanja ne pokazuju takav značaj (65,67,87,91,92,99–101). Tschaikowski i saradnici na uzorku pacijenata koji su nakon elektivnih hirurških intervencija razvili tešku sepsu, prijavljuju da ne postoji statistički značajna razlika u inicijalno izmerenim nivoima PCT-a prvog dana bolesti među bolesnicima koji su umrli i preživeli. Čak su aritmetička sredina i medijana bile nešto niže kod bolesnika sa letalnim ishodom u odnosu na preživeli (66). Multicentrična studija sprovedena u 100 hirurških i nehirurških JIL u Italiji pokazuje da se nivo PCT-a izmeren na dan prijema ne razlikuje statistički značajno u odnosu na ishod sepse (75). Naši rezultati saglasni su sa rezultatima istraživanja u kojima nije pokazana statistički značajna razlika u nivoima PCT-a u pojedinačnom merenju prvog dana bolesti, uz nešto nižu srednju vrednost među bolesnicima sa letalnim ishodom. Prognostički značaj PCT-a ogleda se u praćenju njegovih nivoa tokom vremena, gde pad vrednosti u odnosu na inicijalno izmerene predstavlja dobar prognostički znak (65,66,91,93–95).

Pretpostavka da plazmatske koncentracije fibrinogena mogu da budu dobar prediktor toka i ishoda sepse leži u dvostrukoj patogenetskoj povezanosti fibrinogena i sepse. Kao protein akutne faze zapaljenja njegove koncentracije rastu u infekciji, ali je fibrinogen i značajan činilac hemostaznog mehanizma, te se kod težih oblika bolesti beleže njegove niže koncentracije. S obzirom da u sepsi rastu koncentracije svih proteina akutne faze zapaljenja pa i fibrinogena, značajan pad njegovih vrednosti biće zabeležen tek kada potrošnja u koagulopatiji preraste sposobnost jetre da ga sintetiše (102). Naši rezultati potvrđuju ove navode.

Rezultati našeg istraživanja pokazuju statistički značajnu tendenciju pada broja trombocita od lakših ka težim oblicima sepse (od 238 kod sepse do 146 kod teške sepse). Takođe, broj trombocita je statistički značajno manji kod bolesnika kod kojih je došlo do razvoja MODS-a u prvih 48h hospitalizacije u odnosu na one kod kojih se MODS nije razvio, međutim, srednje vrednosti trombocita u navedenim grupama bolesnika su u granicama referentnih vrednosti. Nije pokazana statistički značajna razlika u broju trombocita kod preživelih u odnosu na bolesnike sa letalnim ishodom. Ovo bi moglo da znači da snižene vrednosti trombocita u odnosu na referentne svakako ukazuju na teže oblike sepse, ali ih normalne vrednosti ne isključuju. Dobijeni rezultati u skladu su sa literaturnim navodima koji ističu da svega 25-33% bolesnika pri prijemu ima trombocitopeniju, dok je srednja vrednost broja trombocita kod septičnih bolesnika u granicama referentnog opsega. Takođe, ni u ostalim istraživanjima trombocitopenija se nije pokazala kao statistički značajan prediktor ishoda sepse (103–105).

Produženo protrombinsko vreme značajan je rutinski parametar sepse, što je potvrđeno i našim ispitivanjem. Vrednosti INR-a značajno su povišene u svim grupama bolesnika u odnosu na referentne vrednosti u zdravoj populaciji, i statistički značajno rastu sa težinom kliničke slike

bolesti. Dobijeni podaci u skladu su sa literaturnim, gde se navodi da preko 90% bolesnika sa sepsom ima produženom protrombinsko vreme u trenutku prijema u bolnicu (104,105). U predikciji razvoja MODS-a na našem uzorku PT se nije pokazao kao značajan marker, dok su kod bolesnika sa letalnim ishodom zabeležene značajno više vrednosti INR-a u odnosu na bolesnike sa povoljnim ishodom bolesti, što je takođe u skladu sa literaturnim podacima (56,104,106).

*A proliferation inducing ligand (APRIL), B cell activating factor (BAFF) i Transmembrane activator and calcium modulator cyclophilin ligand interactor (TACI)* su pokazatelji funkcije imunog sistema koji su do sada ispitivani u kontekstu imunoloških bolesti i B ćelijskih maligniteta. U nama dostupnoj literaturi postoji samo jedan rad koji se bavi dijagnostičkim i prognostičkim značajem APRIL-a kod obolelih od sepse (37), dok ostali članovi ove superfamilije TNF-a kod septičnih bolesnika nisu ispitivani.

Za određivanje koncentracija ovih biomarkera u telesnim tečnostima postoji nekoliko različitih ELISA testova sa različitim opsegom detektabilnosti, koji se za sada koriste samo u istraživačke svrhe. Literaturni podaci o koncentracijama APRIL-a, BAFF-a i TACI-ja u populaciji zdravih ispitanika su nehomogeni (37,48–52,107–112). Preporučeni referentni opseg u populaciji zdravih ljudi ne postoji ni u uputstvu proizvođača testa korišćenog u našem ispitivanju (R&D Systems), te smo ispitali koncentracije ovih parametara u serumima 30 zdravih ispitanika.

Srednja vrednost APRIL-a u zdravoj populaciji na našem uzorku iznosi 2,17mg/ml a opseg koncentracija u zdravoj populaciji kretao se od 1,25ng/ml do 3,75ng/ml. Slične rezultate dobili su i ostali istraživači koji su koristili test proizvođača *R&D Systems* (107,108), kao i istraživači koji su upotrebljavali test proizvođača *Platinum ELISA eBioscience, Austria* i *Bender*

*Med Syst Viena* (50,52,112), dok su u ostalim literaturnim navodima korišćenjem „*in house*“ testova i testova proizvođača *USCN Life Science Wutan, China* i *Bender Med Syst, Vienna*, srednje vrednosti koncentracija u zdravoj populaciji nešto više (37,48,49).

Srednje vrednosti BAFF-a kod zdravih ispitanika dobijene u našem istraživanju u skladu su sa preporučenim srednjim vrednostima proizvođača testa, kao i sa ostalim literaturnim navodima istraživača koji su koristili ovaj test (49,51,52,108,109,112). Kao i u slučaju APRIL-a, postoje razlike u prijavljenim srednjim vrednostima koncentracija kod zdravih ispitanika, koje verovatno potiču od relativno malog broja ispitanika uključenih u ona istraživanja koja prijavljuju nešto niže odnosno više vrednosti od ostalih, s obzirom da kod malog broja ispitanika ekstremne vrednosti veoma utiču na veličinu aritmetičke sredine.

Koncentracije solubilnog TACI receptora u zdravoj populaciji na našem uzorku kretale su se od 50 do 750 pg/ml, dok je aritmetička sredina bila 260 pg/ml. Naši podaci nalaze se između literaturno navedenih srednjih vrednosti za zdravu populaciju. Knight i sar. navode srednje vrednosti od 100pg/ml (112), dok su Kyrtsolis i sar. dobili da je srednja vrednost solubilnog TACI receptora čak 860pg/ml (110). U oba rada broj uključenih zdravih ispitanika je manji nego u našem istraživanju.

Koncentracije ispitivanih markera bile su statistički značajno povišene kod pacijenata obolelih od sepse u odnosu na zdrave ispitanike, što je za APRIL zabeleženo i u istraživanju Roderburga i saradnika (37). Povišene vrednosti ovih biomarkera kod obolelih od sepse u odnosu na zdravu populaciju su očekivane, imajući u vidu njihovu ulogu u patofiziologiji B limfocita, kao i ulogu B limfocita u patofiziologiji sepse.



Na našem uzorku APRIL se pokazao kao statistički značajan prediktor težine kliničke slike sepse. Slično kao i kod PCT-a, srednje vrednosti APRIL-a linearno rastu od sepse preko teške sepse do septičkog šoka, dok su kod bolesnika sa multiorganskom disfunkcijom zabeležene niže srednje vrednosti nego kod onih sa septičkim šokom. Potencijalno objašnjenje ovakih rezultata leži u intenzivnijem imunološkom odgovoru kod bolesnika sa septičkim šokom u odnosu na blaže oblike bolesti, dok se pad vrednosti proinflammatoryh markera kod bolesnika inicijalno prezentovanih kliničkom slikom multiorganske disfunkcije može tumačiti iscrpljenjem homeostaznih rezervi kod najteže obolelih pacijenata. Sličnu korelaciju koncentracija APRIL-a sa težinom kliničke slike bolesti pokazuju i rezultati istraživanja Roderburga i saradnika, jedinog do sada objavljenog istraživanja na sličnoj problematici (37).

Interesantno je da su krive srednjih vrednosti APRIL-a i PCT-a u odnosu na težinu bolesti veoma sličnog oblika (linearni rast od sepse do septičkog šoka, a zatim smanjenje vrednosti kod MODS-a), a da pri tom izmerene koncentracije ova dva biomarkera kod pojedinačnih bolesnika ne koreliraju statistički značajno ( $p=0,600$ ). Iako naizgled kontradiktoran, s obzirom na to da su i APRIL i PCT proinflammatoryh markeri pa bi se mogla očekivati značajna pozitivna korelacija njihovih koncentracija, podatak o odsustvu korelacije ipak ne iznenađuje stoga što PCT i APRIL deluju na potpuno različite delove imunog sistema. Velike individualne varijacije u reagovanju organizma na infektivne uzročnike koje su posledica najvećim delom genetskih faktora određuju način reagovanja svakog pojedinca na prisustvo mikroorganizama pri čemu se kod jednih aktiviraju dominantno jedni, a kod drugih drugi delovi imunog sistema. Uporedno određivanje oba biomarkera doprinelo bi boljoj proceni težine kliničke slike.

Pored predikcije težine kliničke slike APRIL predstavlja i statistički značajan prediktor razvoja MODS-a u prvih 48h hospitalizacije, za čega literaturni podaci u nama dostupnoj literaturi ne postoje. Takođe, statistički značajno više koncentracije APRIL-a zabeležene su kod bolesnika sa letalnim ishodom u odnosu na preživjele. Prema našim rezultatima u predikciji smrtnog ishoda bolesti APRIL pokazuje superiornost u odnosu na sve rutinski korišćene inflamatorne pokazatelje (broj leukocita, CRP i PCT). Sličan prediktivni značaj APRIL-a pokazan je i u pomenutom istraživanju Roderburga i saradnika (37).

Koncentracije BAFF-a takođe se statistički značajno razlikuju u odnosu na težinu kliničke slike sepse, u smislu da su koncentracije kod bolesnika sa septičkim šokom statistički značajno niže u odnosu na sve ostale grupe bolesnika kod kojih su koncentracije praktično jednake. Kako u literaturi ne postoje gotovo nikakvi podaci o ulozi BAFF-a kao dijagnostičkog i prognostičkog markera sepse, naši rezultati mogu se objasniti na tri načina. Prvo, moguće je da u septičkom šoku ne postoji nedovoljno enzima koji razgrađuje BAFF do solubilne forme, što je i najverovatniji uzrok dobijenih rezultata. Drugo potencijalno objašnjenje bila bi eventualna „blokada“ u aktivaciji BAFF-a odnosno proliferacija B limfocita nije narušena, ali ona nije praćena adekvatnom aktivacijom odnosno maturacijom i preživljavanjem, dok bi treće objašnjenje predstavljale individualne razlike u afinitetu vezivanja za različite receptore koji je de facto genetski određen. U predikciji MODS-a i letalnog ishoda BAFF ne pokazuje prediktivni značaj, za čega u literaturi takođe ne postoje podaci.

Od svih ispitivanih parametara jedino je BAFF pokazao statistički značajno više koncentracije kod sepsi uzrokovanih Gram negativnim u odnosu na Gram pozitivne uzročnike. Literaturni podaci o razlici u odgovoru imunog sistema na Gram pozitivne i Gram negativne

uzročnike generalno su veoma oskudni, pre svega zato što se dugo smatralo da je model istraživanja imunog odgovora na infekciju u vidu stimulacije organizma injekcijom lipopolisaharida ćelijskog zida Gram negativnih bakterija odgovarajući i dovoljan da objasni sve reakcije organizma u okviru sindroma sepse. Ovo je delimično razumljivo imajući u vidu epidemiološke podatke u kojima je ranijih godina Gram negativna sepsa bila procentualno značajno učestalija od sepsi uzrokovanih Gram pozitivnim bakterijama. Kao što je već razmotreno u uvodu, epidemiološka situacija se poslednjih godina menja sa starenjem populacije i sve većim brojem imunokompromitovanih bolesnika koji su podložniji infekciji oportunističkim bakterijama, tako da se sada učestalost Gram pozitivnih i Gram negativnih uzročnika praktično izjednačava. Stoga raste i potreba za detaljnijim istraživanjem patogenetskog odgovora na infekciju Gram pozitivnim bakterijama. U nama dostupnoj literaturi postoji svega nekoliko radova koji su između ostalog za cilj postavili i ispitivanje koncentracija različitih citokina u odnosu na grupu uzročnika, dok se članovi superfamilije TNF-a kao ni bilo koji drugi biomarkeri funkcije B limfocita u ovom kontekstu ne pominju. Iako imuni odgovor domaćina na sepsu uzrokovanu Gram pozitivnim i Gram negativnim uzročnicima de facto ima mnogo sličnosti, pomenuti radovi ukazuju na to da ipak postoje i značajne razlike u citokinskom profilu u odnosu na uzročnika. Ispitujući koncentracije palete od 11 različitih citokina, proinflamatornih markera i proteina C u odnosu na grupu uzročnika Feezor i saradnici pokazali su da su koncentracije 3 od ispitivanih 11 parametara statistički značajno povišene kod sepsi uzrokovanih Gram pozitivnim u odnosu na Gram negativne bakterije (113). Povišene koncentracije zabeležene su za IL-6, IL-18 i IL-1 $\beta$  (113). Iako na značajno manjem uzorku rezultati Oberholzera i saradnika potvrđuju povišene koncentracije IL-18 kod Gram pozitivnih sepsi, i kao potencijalno objašnjenje dobijenih rezultata ističu način stimulacije sekrecije ovog

citokina, koji je verovatno intenzivnije stimulisan od strane lipoteihoične kiseline u odnosu na lipopolisaharid (114). Gram pozitivni uzročnici prvenstveno aktiviraju TLR2, dok Gram negativni uzročnici reaguju preko TLR4. Precizni podaci o tome preko kojih TLR BAFF vrši svoju funkciju ne postoje. Kao ni na našem uzorku, ni u pomenutim istraživanjima nije zabeležena značajna razlika u kliničkim manifestacijama i demografskim podacima obolelih u odnosu na vrstu uzročnika (113,114). Kao potencijalni biomarkeri koji mogu da posluže u distinkciji Gram pozitivnih i Gram negativnih uzročnika navode se još i fibrin degradacioni produkti (115) i lipopolisaharid vezujući protein (LPS-BP) čije su koncentracije očekivano više kod sepsi uzrokovanih Gram negativnim bakterijama (116). Pojedini autori navode i značajan porast broja trombocita u odnosu na bazalne vrednosti kod bolesnika sa Gram negativnom sepsom (117). Klinički značaj mogućnosti rane distinkcije između Gram pozitivnih i Gram negativnih uzročnika na osnovu citokinskog profila izuzetno je velik, imajući u vidu činjenice o neophodnosti ranog započinjanja adekvatne antibiotske terapije koja je u praksi isključivo empirijska, jer je za nalaz koji identifikuje uzročnika, u nedostatku PCR tehnika, potrebno nekoliko dana, dok je rutinska upotreba PCR dijagnostike u cilju brze detekcije uzročnika (*SeptiFast*, *SepsiTest*, *Magicplex* i sl) dostupna ali za sada farmakoekonomski neopravdana čak i u razvijenim zemljama (118).

Kruskal-Wallisov test nije pokazao statistički značajnu razliku u koncentraciji solubilnog TACI receptora u odnosu na težinu kliničke slike bolesti, pre svega zbog toga što njegove koncentracije naglo rastu tek u grupi bolesnika sa septičkim šokom u odnosu na lakše oblike bolesti, između kojih se koncentracije ne razlikuju statistički značajno. U sklopu iscrpljivanja homeostaznih rezervi i koncentracije sTACI-ja su kod bolesnika sa MODS-om nešto niže u

odnosu na septički šok. Ovakva distribucija vrednosti solubilnog TACI receptora u odnosu na težinu kliničke slike bolesti naglašava njegov značaj u predikciji razvoja septičkog šoka i MODS-a, s obzirom na nagli porast koncentracija kod težih u odnosu na lakše oblike bolesti. U skladu sa ovim rezultatima je i rezultat koji pokazuje da su koncentracije sTACI-ja statistički značajno povišene kod bolesnika kod kojih u prvih 48h hospitalizacije dolazi do razvoja MODS-a, kao i kod bolesnika sa letalnim ishodom.

U predikciji razvoja MODS-a u prvih 48h hospitalizacije sTACI pokazao se kao najbolji pojedinačni prediktor od svih ispitivanih biomarkera ( $AUC=0,761$ ). Površine ispod ROC krive za APRIL ( $AUC_{APRIL}=0,682$ ) i PCT ( $AUC_{PCT}=0,739$ ) bile su značajno manje. Superiorniji prediktori od sTACI-ja bili su samo SOFA i APACHE II skor. Multivarijantnom regresionom analizom sTACI se pokazao kao jedini biomarker koji je nezavisni prediktor razvoja MODS-a u prvih 48h hospitalizacije, uz SOFA skor.

Patofiziološka osnova dobijenih rezultata leži u ulozi ovih biomarkera u regulaciji funkcije B limfocita, kao i u ulozi humoralnog imuniteta u sepsi. Do pre svega nekoliko godina B limfociti su smatrani samo efektornim ćelijama koje u odgovoru na infekciju učestvuju sekrecijom imunoglobulina. Novija istraživanja ističu ulogu subpopulacija B regulatornih ćelija, B limfocita marginalne zone i B1 limfocita u odgovoru organizma na bakterijske infekcije (27–30). Kod pacijenata preminulih od sepse pokazana je značajna apoptoza B limfocita (22,25,119). Kao glavni induktor proliferacije B limfocita i glavni faktor u preživljavanju ovih ćelija, APRIL se pokazao kao značajan prediktor težine kliničke slike, razvoja komplikacija i letalnog ishoda sepse. Ipak, solubilni TACI receptor pokazao je daleko veći prediktivni značaj u odnosu na APRIL. Ovaj rezultat može se objasniti činjenicom da je sTACI antiinflamatorni marker koji u

cirkulaciji vezuje APRIL sprečavajući njegovo vezivanje za transmembransku formu TACI-ja eksprimiranog na površini B limfocita. Ovim je sprečena funkcija APRIL-a u blokadi apoptoze B limfocita. Više koncentracije sTACI-ja dovode do veće blokade funkcije APRIL-a čime broj apoptotičnih B limfocita raste, a time raste i verovatnoća ulaska organizma u stanje „imunološke paralize“ i letalan ishod bolesti (24,35,42,45,54,55,119,120). Literaturni podaci navode da je glavni negativni regulator broja B limfocita upravo sTACI (42). Pokazano je da terapijski modaliteti usmereni ka sprečavanju apoptoze svih ćelija leukocitne loze uključujući i B limfocite povećavaju preživljavanje obolelih od sepse (25,28,119). Naši rezultati u kojima je koncentracija antiinflamatornog sTACI-ja najznačajniji pojedinačni prediktor lošeg toka i ishoda sepse potvrđuju literaturne pretpostvake o potrebi za razvojem terapijskih modaliteta koji bi omogućili blokadu apoptoze B limfocita, povratak njihove funkcije ili stimulaciju produkcije novih aktivnih limfocita koji bi doprineli poboljšanju ishoda sepse (28). Potrebu za razvojem terapijskih opcija usmerenih na sprečavanje apoptoze limfocita naglašavaju i literaturni navodi koji ističu da u razvoju imune paralize daleko veći značaj ima apoptoza limfocita i dendritičnih ćelija u odnosu na apoptozu drugih ćelija imunog sistema, pre svega neutrofila (121). Pretpostavlja se da bi praćenje dinamike ovih markera pokazalo još veći značaj, jer bi doprinelo individualizaciji pristupa obolelima od sepse, u smislu adekvatne procene da li se konkretan pacijent nalazi u fazi dominacije proinflamatornih ili antiinflamatornih markera.

Sistem komplementa predstavlja efektivni deo humoralnog imuniteta koji igra značajnu ulogu u odbrani organizma od invazije bakterija. Aktivacija komplementa ima zaštitnu ulogu u odbrani od infekcije, međutim kod teških infekcija koje vode u dugotrajno stanje aktivacije komplementa dolazi do povećanja njegove potrošnje i smanjenja koncentracije u cirkulišućoj

krvi. Ova takozvana „potrošna opsonopatija“ javlja se kod teških bakterijskih infekcija i doprinosi stanju paralize imunog sistema (102,122). Na modelu peritonitisa kao ishodišta sepse Gupta i saradnici pokazuju značajno snižene koncentracije C3 kod pacijenata sa letalnim ishodom (122). Younger i saradnici navode takođe niže vrednosti C3 kod septičnih bolesnika u odnosu na zdrave ispitanike (123), dok Andaluz-Ojeda i saradnici prijavljuju statistički značajno snižene vrednosti C4 komponente komplementa kod bolesnika koji su preminuli od septičkog šoka, u odnosu na preživjele (124). S druge strane istraživanje Ruiz-Alvaresove i sar. pokazuju da koncentracije komplementa nemaju značaja za predikciju ishoda (87). Naši rezultati u saglasnosti su sa većinom drugih istraživanja i pokazuju statistički značajno niže koncentracije komponenti komplementa kod bolesnika sa nepovoljnim tokom i ishodom sepse.

Važno je naglasiti da iako je pokazano da su niže koncentracije C3 i C4 komponenti komplementa visoko statistički značajni prediktori razvoja MODS-a i letalnog ishoda, njihove koncentracije se kod većine bolesnika kreću u granicama referentnih vrednosti. Ovo se objašnjava činjenicom da C3 i C4 predstavljaju i reaktante akutne faze zapaljenja, te njihove plazmatske koncentracije padaju ispod nivoa referentnih vrednosti tek kada potrošnja prevaziđe sposobnost jetre da ih sintetiše (102). Stoga brojni literaturni podaci ističu značaj merenja koncentracije aktivirane C5a komponente, koja se pokazala kao koristan biomarker sepse (56,122,123,125–127). Ipak, s obzirom da je u rutinskom radu većini laboratorija u svetu dostupno samo određivanje C3 i C4 komponente (102), konstrukcijom ROC krive odredili smo *cut-off* vrednost ovih markera koja bi sa relativno visokom senzitivnošću i specifičnošću u ranim fazama bolesti mogla da ukaže na nepovoljan ishod sepse. Uključivanje određivanja koncentracija C3 i C4 komponente komplementa u rutinsku paletu laboratorijskih nalaza kod

obolelih od sepse doprinelo bi adekvatnijoj proceni težine oboljenja, kao i predviđanju njegovog toka i ishoda.

Sa ciljem boljeg razumevanja imunopatogeneze sepse i međusobnih interakcija delova imunog sistema, imajući pri tom u vidu ulogu komplementa u povezivanju urođenog i stečenog imuniteta, ispitane su međusobne korelacije komponenti komplementa i članova superfamilije TNF-a. Pokazana je statistički značajna pozitivna korelacija BAFF-a sa C3 i C4, dok sTACI sa komponentama komplementa statistički značajno negativno korelira. APRIL pokazuje značajnu korelaciju samo sa C4 komponentom, koja je izuzetno slabog intetnziteta. Slični rezultati dobijeni su i na uzorku pacijenata obolelih od lupus nefritisa u fazi egzacerbacije bolesti (128). Dobijeni rezultati mogli bi se tumačiti u kontekstu iscrpljivanja imunog sistema i ulasku u stanje imunoparalize. Naime, niže koncentracije komponenti komplementa impliciraju smanjenu sposobnost opsonizacije i smanjenu sposobnost organizma za odbranu od infekcije i dokazani su prediktor letalnog ishoda (122,124). Isti efekat na imuni sistem pokazuju i povišene koncentracije solubilnog TACI receptora koje se povezuju sa povećanom apoptozom B limfocita (42), i prema našim rezultatima takođe predstavljaju prediktor razvoja MODS-a i letalnog ishoda. Zapažena negativna korelacija između koncentracija C3 i C4 i sTACI receptora ukazuje na to da kod pojedinačnih bolesnika istovremeno postoji povećana potrošnja komplementa i povećana apoptoza B limfocita, tj. smanjenje funkcije kako urođenog tako i humoralnog imuniteta koje vodi letalnom ishodu. Postojanje korelacije između komponenti komplementa i članova superfamilije TNF-a ukazuje na blisku patofiziološku povezanost ovih elemenata imunog sistema. Dokazano je da produkti aktivacije komplementa (C3a, C4a i C5a dobijeni razgradnjom komponenti C3, C4 i C5) stimulišu sekreciju citokina posredovanu aktivacijom



TLR4 (121), a aktivacija TLR4 istovremeno predstavlja i najjači stimulator ekspresije TACI receptora na površini B limfocita (38) čije koncentracije snažno koreliraju sa količinom solubilne forme receptora (54). Ovim se može objasniti povezanost između nižih koncentracija C3 i C4 i povišenih vrednosti sTACI-ja.

Koncentracije cirkulišućih imunoglobulina, iako većinom u granicama referentnih vrednosti, statistički su značajno niže kod bolesnika sa septičkim šokom u odnosu na ostale grupe bolesnika, što se može objasniti intenzivnim imunološkim odgovorom i intenzivnom aktivacijom sistema komplementa koji vrši opsonizaciju mikroorganizama i omogućuje dejstvo imunoglobulina. Bliska patofiziološka povezanost komplementa i imunoglobulina pokazana je i na našem uzorku pozitivnom korelacijom između njihovih koncentracija. Snižene vrednosti cirkulišućih imunoglobulina kod obolelih od septičkog šoka zabeležene su i kod drugih istraživača (129).

Imajući u vidu patofiziološku ulogu članova superfamilije TNF-a u aktivaciji B limfocita, stimulaciji njihove proliferacije i posledičnoj povećanoj produkciji antitela, očekivana je pozitivna korelacija između koncentracija APRIL-a i BAFF-a sa koncentracijama cirkulišućih imunoglobulina, dok bi po istom principu sTACI sa koncentracijama cirkulišućih imunoglobulina korelirao negativno. Izostanak očekivanih korelacija na našem uzorku posledica je metodološke postavke istraživanja u kojem su zbog izuzetnog praktičnog značaja inicijalne procene težine kliničke slike i potencijalnog toka i ishoda bolesti uzorci krvi bolesnika uzimani unutar prvih 12h od prijema u bolnicu. Naime, bolesnici su u proseku hospitalizovani drugog do trećeg dana od početka bolesti, što je i pored povišenih vrednosti sva tri parametra aktivacije B limfocita u odnosu na zdravu populaciju, ipak nedovoljan vremenski interval za sekreciju kako

brzosekretujućih antitela niskog afiniteta tako i kasnosekretujućih antitela visokog afiniteta. Ovo objašnjenje potkrepljeno je i zabeleženom pozitivnom korelacijom koncentracija imunoglobulina i dana prijema u bolnicu. Duže vreme proteklo od pojave prvih simptoma bolesti do momenta javljanja u bolnicu kada je uzorkovana krv, povezano je sa većom koncentracijom antitela klase IgM i IgG, dok koncentracije sekretornih antitela klase IgA ne koreliraju sa dužinom trajanja bolesti pre hospitalizacije. Ranije pomenute snižene koncentracije IgM i IgG antitela kod obolelih od septičkog šoka posledica su intenzivnije potrošnje već prisutnih antitela sekretovanih pre početka bolesti, koja je kod ovih bolesnika najizraženija i značajno korelira sa istovremeno najizraženijom potrošnjom komponenti komplementa i aktivacijom celokupnog imunog odgovora koje su zabeležene u grupi bolesnika sa septičkim šokom. Povišene koncentracije imunoglobulina kao odgovor na povišene vrednosti APRIL-a očekuju se u daljem toku bolesti. Rutinsko praćenje njihovih koncentracija u daljem toku bolesti i poređenje sa bazalnim vrednostima izmerenim pri prijemu moglo bi da posluži kao indirektan pokazatelj funkcije B limfocita, stepena njihove aktivacije, dominacije koncentracije APRIL-a ili s-TACI-ja i posledične povišene ili snižene produkcije imunoglobulina. Povećanje koncentracija imunoglobulina u odnosu na bazalno izmerene vrednosti ukazivalo bi na niže koncentracije sTACI-ja i povoljan tok i ishod bolesti, dok bi pad koncentracija u odnosu na bazalane mogao da bude pokazatelj kako nastavka potrošnje tako i nedovoljne stimulacije sinteze novih imunoglobulina što bi vodilo u stanje imune paralize i nepovoljan ishod.

Koncentracija cirkulišućih imunoglobulina u sepsi je dosta ispitivana, ali su podaci iz različitih istraživanja kontradiktorni. Pojedini istraživači navode inicijalno izmerene koncentracije IgM-a i IgG-a kao dobre prediktore ishoda sepse (130), dok drugi ne nalaze

povezanost između bazalnih vrednosti imunoglobulina i ishoda (129). Meta-analizom svih sprovedenih studija ipak se smatra da početne koncentracije imunoglobulina nisu dobar prediktor ishoda sepse, što se pokazalo i na našem uzorku (131). Praćenje koncentracija imunoglobulina u toku sepse možda bi odgovorilo na pitanja eventualne suplementacije nespecifičnim rekombinantnim imunoglobulinima, koji se za sada takođe empirijski primenjuju.

S obzirom na specifičnost populacije septičnih bolesnika kako u jedinicama intenzivnog lečenja tako i u trijažnim ambulancama, kao i na kompleksnost patofizioloških mehanizama sepse, postojeći opšti scoring sistemi ne pokazuju zadovoljavajući prediktivni značaj kod sepse. U zaključku sistematičnog pregleda literature na temu primene različitih scoring sistema za predikciju ishoda sepse navodi se da je za adekvatnu procenu rizika neophodno uvođenje novih varijabli, karakterističnih za populaciju septičnih bolesnika (132). Upotrebom binarne logističke regresije pokušali smo da odredimo koji bi od parametara obuhvaćenih našim istraživanjem dao jedinstven nezavistan doprinos predikciji razvoja MODS-a i letalnog ishoda sepse, kada se u regresioni model uključe sve varijable koje su se univarijantnom analizom pokazale statistički značajnim, kao i da kvantifikujemo sposobnost modela kao celine da svrsta bolesnike u kategoriju dobre odnosno loše prognoze.

Konstruisani model za predikciju razvoja MODS-a uključivao je SOFA skor, PCT, sTACI, APRIL i C3 komponentu komplementa. Model u celini bio je visoko statistički značajan i tačno klasifikovao 86.9% slučajeva. Kao nezavisni prediktori razvoja MODS-a koji daju doprinos povećanju prediktivnog značaja modela kao celine izdvojili su se jedino SOFA skor i sTACI. Ostali parametri, iako pojedinačnim analizama pokazuju statistički značajno različite

vrednosti u odnosu na razvoj MODS-a u prvih 48h hospitalizacije, uvođenjem u regresioni model nisu pokazali značajan nezavisni doprinos predikciji MODS-a.

Sličan regresioni model konstruisan je i za predikciju ishoda sepse, obuhvatajući APACHE II skor, APRIL, sTACI, fibrinogen i PT. U slučaju predikcije ishoda odlučili smo se da u model uvrstimo APACHE II skor jer je pojedinačnim analizama pokazao veći prediktivni značaj u odnosu na SOFA skor. Procenat slučajeva koje model tačno klasifikuje nešto je manji u predikciji ishoda (79,1%) u odnosu na predikciju razvoja MODS-a (86,9%), ali je i dalje model u celini visoko statistički značajan. Od parametara uvrštenih u model pojedinačni nezavisni doprinos predikciji ishoda dali su APACHE II skor, sTACI i fibrinogen.

Ovi rezultati ukazuju na potencijalni benefit od uvođenja antiinflamatornog markera sTACI-ja kao nove varijable u SOFA tj. APACHE II skor, što bi verovatno doprinelo povećanju senzitivnosti i specifičnosti predikcije razvoja MODS-a i letalnog ishoda bolesti kod septičnih bolesnika. Za konstrukciju i validaciju novog scoring sistema koji bi bio specifičniji za obolele od sepse potrebna su dalja istraživanja. U svetlu novih teorija o patogenezi sepse u kojoj se akcenat stavlja na dominaciju antiinflamatornog odgovora kod septičnih bolesnika sa lošijom prognozom, uvođenje koncentracija citokina koji predstavlja antiinflamatorni marker u već postojeće scoring sisteme bazirane na kvantifikaciji stepena organske disfunkcije i premorbidne faktore rizika, moglo bi da doprinese boljoj kliničkoj proceni toka i ishoda sepse.

## 7 ZAKLJUČCI

- Utvrđeno je da muškarci češće oboljevaju od sepse, ali pol ne utiče na težinu kliničke slike, razvoj MODS-a u prvih 48h hospitalizacije, kao ni na ishod bolesti.
- U našem istraživanju nije utvrđeno da uzrast bolesnika utiče na oboljevanje od sepse, kao ni na težinu kliničke slike, tok i ishod bolesti.
- Trajanje bolesti pre hospitalizacije statistički je značajno kraće kod septičkog šoka.
- Vrednosti SOFA i APACHE II skora pokazali su se kao dobri prediktori razvoja MODS-a i letalnog ishoda, dok između sepsi uzrokovanih Gram pozitivnim i Gram negativnim uzročnicima nema statistički značajne razlike.
- Od rutinskih laboratorijskih parametara kao značajni prediktori težine kliničke slike pokazali su se fibrinogen, PCT, trombociti i PT, dok su se kao značajni prediktori MODS-a u prvih 48h hospitalizacije istakli PCT i trombociti, a za ishod bolesti statistički su značajni jedino fibrinogen i PT.
- Sva tri citokina markera superfamilije TNF-a pokazali su se izuzetno statistički značajnim u dijagnostici sepse, a najveću dijagnostičku vrednost u smislu senzitivnosti i specifičnosti pokazao je *A proliferation inducing ligand* (APRIL).
- U razlikovanju sepsi izazvanih Gram pozitivnim i Gram negativnim uzročnicima kao statistički značajan marker pokazao se *B cell activating factor* (BAFF), pri čemu više vrednosti ukazuju na Gram pozitivnog uzročnika.

- U prognostičkom smislu za razvoj MODS-a u prvih 48h hospitalizacije, kao i za ishod bolesti statističku značajnost pokazali su APRIL i sTACI, s tim što se uzimajući u obzir senzitivnost i specifičnost sTACI pokazao kao superiorniji.
- Iako su koncentracije C3 i C4 komponente komplementa kod većine bolesnika bile u granicama referentnih vrednosti, zapažena je visoko statistički značajna razlika u njihovim vrednostima u odnosu na težinu kliničke slike sepse (septički šok), razvoj MODS-a i letalnog ishoda.
- Koncentracije IgM i IgG statistički značajno pozitivno koreliraju sa dužinom trajanja bolesti pre hospitalizacije, dok su sve klase imunoglobulina značajno niže kod obolelih od septičkog šoka, ali njihove koncentracije ne utiču na razvoj MODS-a niti na ishod bolesti.
- Imajući u vidu sve kliničke, rutinske laboratorijske i specifične imunološke markere u predikciji razvoja MODS-a u prvih 48h hospitalizacije ubedljivo najveću prognostičku vrednost ima klinička procena pacijenata (SOFA i APACHE II skor), a odmah zatim sTACI koji se multivarijantnom regresionom analizom pokazao kao jedini potpuno nezavisni prediktor razvoja MODS-a, sa senzitivnošću i specifičnošću većom čak i od prokalcitonina.
- U predikciji ishoda sepse najveću prognostičku vrednost imaju takođe klinički skorovi (APACHE II i SOFA) dok se regresionom analizom kao nezavisni prediktori letalnog ishoda ističu samo još sTACI i fibrinogen.

## 8 PRILOZI

Prilog 1. SOFA skor

Organski sistem	0	1	2	3	4
REPIRATORNI PaO <sub>2</sub> /Fi O <sub>2</sub>	>300	226-300	151-225	76-150	≤75
BUBREZI Kreatinin	≤100	101-200	201-350	351-500	>500
JETRA Bilirubin	≤20	21-60	61-120	121-240	>240
KVS PAR1	≤10	10.1-15	15.1-20	20.1-30	>30
HEMATOLOŠKI Trci	≥120	81-120	51-80	21-50	≤20
NEUROLOŠKI GCS	15	13-14	10-12	7-9	≤6

Prilog 2. APACHE II skor

<b>Fiziološki parametri</b>	+4	+3	+2	+1	0	+1	+2	+3	+4
Temperatura (°C)	≥41	39-40,9		38,5-38,9	36-38,4	34-35,9	32-33,9	30-31,9	≤29,9
Srednji arterijski pritisak (mm Hg)	≥160	130-159	110-129		70-109		50-69		≤49
Puls (n/min)	≥180	140-179	110-139		70-109		55-69	40-54	≤39,9
Frekvencija disanja (n/min)	≥50	35-49		25-34	12-24	10-11	6-9		≤5
Oksigenacija (mmHg)	a.FiO <sub>2</sub> >0,5 A-a DO <sub>2</sub>	≥500	350-499	200-349		<200			
	b.FiO <sub>2</sub> <0,5 PCO <sub>2</sub>				>70	61-70		55-60	<55
pH arterijske krvi	≥7,7	7,6-7,69		7,5-7,59	7,33-7,49		7,25-7,32	7,15-7,24	<7,15
Natrijum (mmol/l)	≥180	160-179	155-159	150-154	130-149		120-129	111-119	≤110
Kalijum (mmol/l)	≥7	6-6,9		5,5-5,9	3,5-5,4	3-3,4	2,5-2,9		<2,5
Kreatinin (mg/dl, dvostruke vrednosti za akutno bubrežno oštećenje )	≥3,5	2-3,4	1,5-1,9		0,6-1,4		<0,6		
Hematokrit (%)	≥60		50-59,9	46-49,9	30-45,9		20-29,9		<20
Leukociti	≥40		20-39,9	15-19,9	3-14,9		1-2,9		<1
Glasgow-Coma-Scala (GCS)	Skor = 15 minus aktuelni GCS								
Bikarbonati (HCO <sub>3</sub> mmol/l)	≥52	41-51,9		32-40,9	22-31,9		18-21,9	15-17,9	<15
<b>A = Ukupni akutni fiziološki rezultat</b>	<b>Zbir 12 pojedinačnih parametara</b>								
<b>B – Uzrast</b>	<b>C – Hronično zdravstveno stanje:</b>								
≤44 0 bodova	Ukoliko postoji podatak o teškoj organskoj insuficijenciji ili imunodeficijenciji, dodaju se: a. po 5 bodova za svaki sistem organa kod pacijenata koji se ne operišu kao i kod pacijenata podvrgnutih hitnoj hirurškoj intervenciji b. po 2 boda za svaki sistem organa kod pacijenata podvrgnutim elektivnim hirurškim zahvatima								
45-54 2 boda									
55-64 3 boda									
65-74 5 bodova									
≥75 6 bodova									
<b>APACHE II skor = A (akutni fiziološki rezultat) + B (uzrast) + C (hronično zdravstveno stanje)</b>									



# LITERATURA

1. Bone R, Balk R, Cerra F, Dellinger R, Fein A, Knaus W, et al. ACCP/SCCM consensus conference for Sepsis and Organ Failure and. *Chest*. 1992;101:1644–55.
2. Weiss M, Huber-Lang M, Taenzer M, Traeger K, Altherr J, Kron M, et al. Different patient case mix by applying the 2003 SCCM/ESICM/ACCP/ATS/SIS sepsis definitions instead of the 1992 ACCP/SCCM sepsis definitions in surgical patients: a retrospective observational study. *BMC Med Inform Decis Mak* [Internet]. 2009 Jan [cited 2013 Apr 16];9:25. Available from: <http://www.biomedcentral.com/1472-6947/9/25>
3. Vincent JL, Opal SM, Marshall JC, Tracey KJ. Sepsis definitions: Time for change. *Lancet*. 2013;381:774–5.
4. Levy MM, Fink MP, Marshall JC, Abraham E, Angus D, Cook D, et al. 2001 SCCM/ESICM/ACCP/ATS/SIS International Sepsis Definitions Conference. *Intensive Care Med* [Internet]. 2003 Apr [cited 2013 Feb 2];29(4):530–8. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12664219>
5. Dellinger RP, Levy MM, Rhodes A, Annane D, Gerlach H, Opal SM, et al. Surviving Sepsis Campaign: International Guidelines for Management of Severe Sepsis and Septic Shock: 2012. *Crit Care Med* [Internet]. 2013 Feb [cited 2013 Feb 10];41(2):580–637. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23361625>
6. Vincent JL, De Mendonca A, Moreno R, et al. Use of the SOFA score to assess the incidence of organ dysfunction/failure in intensive care units: Results of a multicenter, prospective study. *Crit Care Med* 1998;26(11):1793-800.
7. Martin GS. Sepsis, severe sepsis and septic shock: changes in incidence, pathogens and outcomes. *Expert Rev Anti Infect Ther* [Internet]. 2012 Jun [cited 2013 Feb 26];10(6):701–6. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3488423/pdf/nihms-413357.pdf>
8. Levy MM, Dellinger RP, Townsend SR, Linde-Zwirble WT, Marshall JC, Bion J, et al. The surviving sepsis campaign: Results of an international guideline-based performance improvement program targeting severe sepsis. *Intensive Care Med*. 2010;36:222–31.

9. Fleischmann C, Scherag A, Adhikari NK, Hartog CS, Tsaganos T, Schlattman P, et al. Global burden of sepsis: a systematic review. In: 33rd International Symposium on Intensive Care and Emergency Medicine. 2015 Mar 17-20; Bussels, Belgium. Crit Care [Internet]. 2015 Mar [cited 2015 Apr 22];17:P21. Available from: <http://ccforum.com/content/17/S2/P1>
10. Brkić S. Sepsa. U: Turkulov V, Brkić S, urednice. Infektivne bolesti. Novi Sad: Medicinski fakultet Novi Sad; 2013. str.168-80.
11. Munford RS, Suffredini AF. Sepsis, Severe Sepsis and Septic Shock. In: Mandell GL, Bennett JE, Dolin R, editors. Mandell, Douglas, and Bennett's principles and practice of infectious diseases. 7th ed. Philadelphia: Elsevier Churchill Livingstone; c2010.
12. Djordjevic D, Surbatovic M, Ugrinovic D, Radakovic S, Jevdjic J, Filipovic N, et al. New aspects of sepsis pathophysiology in critically ill. Vojnosanit Pregl [Internet]. 2012 [cited 2013 Jun 14];69(1):58–68. Available from: <http://www.doiserbia.nb.rs/Article.aspx?ID=0042-84501201058D>
13. Cho S, Choi J. Biomarkers of Sepsis. Infect Chemother. 2014;46(1):1–12.
14. Deutschman CS, Tracey KJ. Sepsis: Current dogma and new perspectives. Immunity [Internet]. 2014 Apr [cited 2015 Mar 15];40(4):463–75. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.immuni.2014.04.001>
15. Tsalik EL, Jagers LB, Glickman SW, Langley RJ, van Velkinburgh JC, Park LP, et al. Discriminative value of inflammatory biomarkers for suspected sepsis. J Emerg Med [Internet]. Elsevier Ltd; 2012 Jul [cited 2013 Feb 17];43(1):97–106. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22056545>
16. Wiersinga WJ, Leopold SJ, Cranendonk DR, van der Poll T. Host innate immune responses to sepsis. Virulence [Internet]. 2014 Jan [cited 2015 Mar 25];5(1):36–44. Available from: <http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.4161/viru.25436>
17. Sørensen TI, Nielsen GG, Andersen PK, Teasdale TW. Genetic and environmental influences on premature death in adult adoptees. N Engl J Med 1988;318:727-32.
18. Skirecki T, Borkowska-Zielińska U, Złotorowicz M, Hoser G. Sepsis immunopathology: Perspectives of monitoring and modulation of the immune disturbances. Arch Immunol Ther Exp. 2012;60:123–35.

19. Aziz M, Jacob A, Yang W-L, Matsuda A, Wang P. Current trends in inflammatory and immunomodulatory mediators in sepsis. *J Leukoc Biol* [Internet]. 2013 Mar [cited 2015 Mar 27]; 93(March):329–42. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3579020/>
20. Midwood KS, Piccinini AM. DAMPening inflammation by modulating TLR signalling. *Mediators Inflamm* [Internet]. 2010 Apr [cited 2015 Apr 02]; 2010:672395[21 pages]. Available from: <http://www.hindawi.com/journals/mi/2010/672395/>
21. Seeley EJ, Matthay MA, Wolters PJ. Inflection points in sepsis biology: from local defense to systemic organ injury. *AJP Lung Cell Mol Physiol*. 2012;303:L355–63.
22. Hotchkiss RS, Monneret G, Payen D. Immunosuppression in sepsis: a novel understanding of the disorder and a new therapeutic approach. *Lancet Infect Dis* [Internet]. Elsevier Ltd; 2013 Mar [cited 2013 May 21];13(3):260–8. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23427891>
23. Torgersen C, Moser P, Luckner G, Mayr V, Jochberger S, Hasibeder WR, et al. Macroscopic postmortem findings in 235 surgical intensive care patients with sepsis. *Anesth Analg*. 2009;108(6):1841–7.
24. Huttunen R, Aittoniemi J. New concepts in the pathogenesis, diagnosis and treatment of bacteremia and sepsis. *J Infect* [Internet]. Elsevier Ltd; 2011 Dec [cited 2015 Apr 02];63(6):407–19. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jinf.2011.08.004>
25. Hotchkiss RS, Monneret G, Payen D. Sepsis-induced immunosuppression: from cellular dysfunctions to immunotherapy. *Nat Rev Immunol* [Internet]. 2013 Dec [cited 2015 Apr 02];13:862–74. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24232462>
26. Stearns-Kurosawa DJ, Osuchowski MF, Valentine C, Kurosawa S, Remic D. The pathogenesis of sepsis. *Annu Rev Pathol Mech Dis*. 2011;6:19–48.
27. Vaughan AT, Roghanian A, Cragg MS. B cells-masters of the immunoverse. *Int J Biochem Cell Biol*. 2011;43:280–5.
28. Pablo R De, Monserrat J, Prieto A, Alvarez-Mon M. Role of Circulating Lymphocytes in Patients with Sepsis. *BioMed Research International* [Internet]. 2014 [cited 2015 Apr 03];2014:671087[11pages]. Available from: <http://www.hindawi.com/journals/bmri/2014/671087/>

29. Anolik JH, Looney RJ, Lund FE, Randall TD, Sanz I. Insights into the heterogeneity of human B cells: Diverse functions, roles in autoimmunity, and use as therapeutic targets. *Immunol Res.* 2009;45:144–58.
30. Kelly-Scumpia KM, Scumpia PO, Weinstein JS, Delano MJ, Cuenca AG, Nacionales DC, et al. B cells enhance early innate immune responses during bacterial sepsis. *J Exp Med.* 2011;208(8):1673–82.
31. BD Biosciences. B-Cell Research Flow cytometry tools for the study of B-cell biology. Becton, Dickinson and Company; 2014.
32. Rawlings DJ, Schwartz M a., Jackson SW, Meyer-Bahlburg A. Integration of B cell responses through Toll-like receptors and antigen receptors. *Nat Rev Immunol.* 2012;12:282–94.
33. Mauri C, Bosma A. Immune regulatory function of B cells. *Annu Rev Immunol.* 2012;30:221-41.
34. Rauch PJ, Chudnovskiy A, Robbins CS, Weber GF, Etzrodt M, Hilgendorf I, et al. Innate Response Activator B Cells Protect Against Microbial Sepsis. *Science.* 2012;335:597–601.
35. Hehlhans T, Pfeffer K. The intriguing biology of the tumour necrosis factor/tumour necrosis factor receptor superfamily: players, rules and the games. *Immunology* [Internet]. 2005 May [cited 2013 May 26];115(1):1–20. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1782125/>
36. Aggarwal BB, Gupta SC, Kim JH. Historical perspectives on tumor necrosis factor and its superfamily: 25 years later, a golden journey. *Hematology.* 2012;119(3):651–65.
37. Roderburg C, Koch A, Tacke F, Nieuwenhuijsen L, Bruensing J, Vargas Cardenas D, et al. Serum concentrations of A Proliferation-Inducing Ligand (APRIL) are elevated in sepsis and predict mortality in critically ill patients. *J Crit Care* [Internet]. Elsevier Inc.; 2013 Jan 19 [cited 2013 Feb 18]; Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23337484>
38. Rickert RC, Jellusova J, Miletic A V. Signaling by the tumor necrosis factor receptor superfamily in B-cell biology and disease. *Immunol Rev* [Internet]. 2011 Nov [cited 2013 Feb 25];244(1):115–33. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3202302/>

39. Mackay F, Schneider P. Cracking the BAFF code. *Nat Rev Immunol* [Internet]. 2009 Jul [cited 2013 Feb 28];9(7):491–502. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19521398>
40. Schneider P, MacKay F, Steiner V, Hofmann K, Bodmer JL, Holler N, et al. BAFF, a novel ligand of the tumor necrosis factor family, stimulates B cell growth. *J Exp Med*. 1999;189(11):1747–56.
41. Goenka R, Scholz JL, Sindhava VJ, Cancro MP. New roles for the BLyS/BAFF family in antigen-experienced B cell niches. *Cytokine Growth Factor Rev* [Internet]. Elsevier Ltd; 2014 Apr [cited 2015 Apr 20];25(2):107–13. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cytogfr.2014.01.001>
42. Vincent FB, Saulep-Easton D, Figgitt WA, Fairfax KA, Mackay F. The BAFF/APRIL system: Emerging functions beyond B cell biology and autoimmunity. *Cytokine Growth Factor Rev* [Internet]. Elsevier Ltd; 2013 Jun [cited 2015 Apr 20];24(3):203–15. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cytogfr.2013.04.003>
43. Warnatz K, Salzer U, Rizzi M, Fischer B, Gutenberger S, Böhm J, et al. B-cell activating factor receptor deficiency is associated with an adult-onset antibody deficiency syndrome in humans. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2009;106(33):13945–50.
44. Dalakas MC. Inhibition of B cell functions: Implications for neurology [invited article]. *Neurology*. 2008;70(23):2252–60.
45. Haiat S, Billard C, Quiney C, Ajchenbaum-Cymbalista F, Kolb J-P. Role of BAFF and APRIL in human B-cell chronic lymphocytic leukaemia. *Immunology* [Internet]. 2006 Jul [cited 2013 Jun 9];118(3):281–92. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1782305/>
46. Matthes T, Dunand-Sauthier I, Santiago-Raber ML, Krause KH, Donze O, Passeweg J, et al. Production of the plasma-cell survival factor a proliferation-inducing ligand (APRIL) peaks in myeloid precursor cells from human bone marrow. *Blood*. 2011;118(7):1838–45.
47. Vincent FB, Northcott M, Hoi A, Mackay F, Morand EF. Association of serum B cell activating factor from the tumour necrosis factor family (BAFF) and a proliferation-inducing ligand (APRIL) with central nervous system and renal disease in systemic lupus erythematosus. *Lupus* [Internet]. 2013 Aug [cited 2015 Apr 05]; 22(9):873–84. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23846230>

48. Koyama T, Tsukamoto H, Miyagi Y, Himeji D, Otsuka J, Miyagawa H, et al. Raised serum APRIL levels in patients with systemic lupus erythematosus. *Ann Rheum Dis*. 2005;64:1065–7.
49. Vallerskog T, Heimbürger M, Gunnarsson I, Zhou W, Wahren-Herlenius M, Trollmo C, et al. Differential effects on BAFF and APRIL levels in rituximab-treated patients with systemic lupus erythematosus and rheumatoid arthritis. *Arthritis Res Ther*. 2006;8(6):R167.
50. Lemancewicz D, Bolkun L, Jablonska E, Kulczynska A, Bolkun-Skornicka U, Kloczko J, et al. Evaluation of TNF superfamily molecules in multiple myeloma patients: Correlation with biological and clinical features. *Leuk Res* [Internet]. Elsevier Ltd; 2013 Sept [cited 2015 Apr 05]; 37(9):1089–93. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.leukres.2013.05.014>
51. Neri P, Kumar S, Fulciniti MT, Vallet S, Chhetri S, Mukherjee S, et al. Neutralizing B-cell-activating factor antibody improves survival and inhibits osteoclastogenesis in a severe combined immunodeficient human multiple myeloma model. *Clin Cancer Res*. 2007;13(20):5903–9.
52. Bolkun L, Lemancewicz D, Jablonska E, Kulczynska a., Bolkun-Skornicka U, Kloczko J, et al. BAFF and APRIL as TNF superfamily molecules and angiogenesis parallel progression of human multiple myeloma. *Ann Hematol*. 2014;93(4):635–44.
53. Salzer U, Chapel HM, Webster AD, Pan-Hammarström Q, Schmitt-Graeff A, Schlesier M, et al. Mutations in TNFRSF13B encoding TACI are associated with common variable immunodeficiency in humans. *Nat Genet* 2005;37:820–8.
54. Hoffmann FS, Kuhn PH, Laurent SA, Hauck SM, Berer K, Wendlinger SA, et al. The Immunoregulator Soluble TACI Is Released by ADAM10 and Reflects B Cell Activation in Autoimmunity. *J Immunol* [Internet]. 2015 Jan [cited 2015 Apr 20];194(2):542–52. Available from: <http://www.jimmunol.org/cgi/doi/10.4049/jimmunol.1402070>
55. Yu G, Boone T, Delaney J, Hawkins N, Kelley M, Ramakrishnan M, et al. APRIL and TALL-I and receptors BCMA and TACI: system for regulating humoral immunity. *Nat Immunol*. 2000;1(3):252–6.
56. Pierrakos C, Vincent JL. Sepsis biomarkers: a review. *Crit Care* [Internet]. 2010 Jan [cited 2013 Feb 2];14(1):R15. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2875530/>

57. 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* [Internet]. 2011 Dec [cited 2013 Apr 16];180(4):793–8. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21805087>
58. Bouch DC, Thompson JP. Severity scoring systems in the critically ill. *Continuing Education in Anaesthesia, Critical Care & Pain J*. 2008;8(5):181-5.
59. Breslow MJ, Badawi O. Severity scoring in the critically ill: Part 1 - Interpretation and accuracy of outcome prediction scoring systems. *Chest*. 2012;141(1):245–52.
60. Moreno R, Vincent JL, Matos R, et al. The use of maximum SOFA score to quantify organ dysfunction/failure in intensive care. Results of a prospective, multicentre study. *Intensive Care Med*. 1999;25(7):686-96.
61. Soreng K, Levy HR. Procalcitonin: an Emerging Biomarker of Bacterial Sepsis. *Clin Microbiol Newsl* [Internet]. Elsevier Inc.; 2011 Nov [cited 2013 Feb 17];33(22):171–8. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0196439911000493>
62. Gaieski DF, Mikkelsen ME, Band RA, et al. Impact of time to antibiotics on survival in patients with severe sepsis or septic shock in whom early goal-directed therapy was initiated in the emergency department. *Crit Care Med* 2010;38:1045-53.
63. Henriquez-Camacho C, Losa J. Biomarkers for sepsis. *BioMed Res Int* [Internet]. 2014 Mar [cited 2015 Apr 08]; 2014:547818 [6 pages]. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3985161/>
64. Becker KL, Snider R, Nysten ES. Procalcitonin in sepsis and systemic inflammation: a harmful biomarker and a therapeutic target. *Br J Pharmacol* [Internet]. 2010 Jan 1 [cited 2013 Oct 30];159(2):253–64. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2825349/>
65. Suberviola B, Castellanos-Ortega A, González-Castro A, García-Astudillo LA, Fernández-Miret B. Prognostic value of procalcitonin, C-reactive protein and leukocytes in septic shock. *Med Intensiva (English Ed)* [Internet]. SEGO; 2012 Apr [cited 2013 Feb 17];36(3):177–84. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S2173572712000525>
66. Tschakowsky K, Hedwig-Geissing M, Braun GG, Radespiel-Troeger M. Predictive value of procalcitonin, interleukin-6, and C-reactive protein for survival in postoperative

- patients with severe sepsis. *J Crit Care* [Internet]. Elsevier Inc.; 2011 Feb [cited 2013 Feb 17];26(1):54–64. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20646905>
67. Charles P-E, Gibot S. Predicting outcome in patients with sepsis: new biomarkers for old expectations. *Crit Care* [Internet]. 2014 Feb [cited 2015 Apr 10];18(1):108. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24517597>
  68. Esper AM, Martin GS. Extending international sepsis epidemiology: the impact of organ dysfunction. *Crit Care* [Internet]. 2009 Feb [cited 2015 Mar 28]; 13(1):120. Available from: <http://www.ccforum.com/content/13/1/120>
  69. Hamzaoui O, Carlet J. Organ Dysfunctions during Severe Sepsis and Septic-like Syndromes: Epidemiology, Classification, and Mechanisms. In: Cavaillon JM, Adire C, editors. *Sepsis and non- infectious systemic inflammation from biology to critical care*. Weinheim: Wiley- VCH Verlag GmbH & Co.KgaA, 2009;57- 76.
  70. Rivers EP, McIntyre L, Morro D, Rivers KK. Early and innovative interventions for severe sepsis and septic shock: taking advantage of a window of opportunity. *Can Med Assoc J*. 2005;173(9):1054-65.
  71. Mayr FB, Yende S, Angus DC. Epidemiology of severe sepsis. *Virulence*. 2014;5(1):4-11.
  72. Martin GS, Mannino DM, Moss M. The effect of age on the development and outcome of adult sepsis. *Crit Care Med*. 2006;34(1):15–21.
  73. Adrie C, Alberti C, Chaix-Couturier C, Azoulay É, De Lassence A, Cohen Y, et al. Epidemiology and economic evaluation of severe sepsis in France: Age, severity, infection site, and place of acquisition (community, hospital, or intensive care unit) as determinants of workload and cost. *J Crit Care*. 2005;20(1):46–58.
  74. Nasa P, Juneja D, Singh O, Dang R, Arora V. Severe Sepsis and its Impact on Outcome in Elderly and Very Elderly Patients Admitted in Intensive Care Unit. *J Intensive Care Med*. 2012;27(3):179–83.
  75. Masson S, Caironi P, Spanuth E, Thomae R, Panigada M, Sangiorgi G, et al. Presepsin (soluble CD14 subtype, sCD14-ST) and procalcitonin for early mortality prediction in severe sepsis and septic shock. A retrospective case–control study from the Albumin Italian Outcome Sepsis (ALBIOS) trial. *Crit Care* [Internet]. 2014 Jan [cited 2015 Apr 24]; 18(1):R6. Available from: <http://www.ccforum.com/content/18/1/R6>



76. Sakiani S, Olsen NJ, Kovacs WJ. Gonadal steroids and humoral immunity. *Nat Rev Endocrinol* 2013;9:56-62.
77. Mahmood K, Eldeirawi K, Wahidi MM. Association of gender with outcomes in critically ill patients. *Crit Care* [Internet]. BioMed Central Ltd; 2012 May [cited 2015 Apr 23]; 16(3):R92. Available from: <http://ccforum.com/content/16/3/R92>
78. Angele MK, Pratschke S, Hubbard WJ, Chaudry IH. Cardiovascular and immunological aspects. *Virulence*. 2014;5(1):12–9.
79. Hall MJ, Williams SN, DeFrances CJ, Golosinskiy A. Inpatient care for septicemia or sepsis: a challenge for patients and hospitals. *NCHS Data Brief* [Internet]. 2011 Jun [cited 2015 Mar 18]; 62:1–8. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22142805>
80. Husak L, Marcuzzi A, Herring J, Wen E, Yin L, Capan DD, et al. National analysis of sepsis hospitalizations and factors contributing to sepsis in-hospital mortality in Canada. *Healthc Q*. 2010;13(Sp):35–41.
81. Castellanos-Ortega A, Suberviola B, García-Astudillo LA, Holanda MS, Ortiz F, Llorca J, et al. Impact of the Surviving Sepsis Campaign protocols on hospital length of stay and mortality in septic shock patients: results of a three-year follow-up quasi-experimental study. *Crit Care Med*. 2010;38(4):1036-43.
82. Reade MC, Angus DC. Epidemiology of Sepsis and Non-infectious SIRS. In: Cavaillon JM, Adire C. *Sepsis and non-infectious systemic inflammation from biology to critical care*. Weinheim: WILEY-VCH Verlag GmbH & Co.KgaA, 2009;13-40.
83. Quenot J-P, Binquet C, Kara F, Martinet O, Ganster F, Navellou J-C, et al. The epidemiology of septic shock in French intensive care units: the prospective multicenter cohort EPISS study. *Crit Care* [Internet]. BioMed Central Ltd; 2013 Apr [cited 2015 Apr 14];17(2):R65. Available from: <http://www.ccforum.com/content/17/2/R65>
84. Brun-Buisson C, Meshaka P, Pinton P, Vallet B. EPISEPSIS: a reappraisal of the epidemiology and outcome of severe sepsis in French intensive care units. *Intensive Care Med* 2004;30(4):580-8.
85. Vincent JL, Sakr Y, Sprung CL, et al. Sepsis Occurrence in Acutely Ill Patients Investigators. Sepsis in European intensive care units: Results of the SOAP study. *Crit Care Med* 2006; 34(2):344-53.

86. Vincent JL, Rello J, Marshall J, Silva E, Anzueto A, Martin CD, et al. International study of the prevalence and outcomes of infection in intensive care units. *JAMA*. 2009;302(1):2323-9.
87. Ruiz-Alvarez MJ, García-Valdecasas S, De Pablo R, Sanchez García M, Coca C, Groeneveld TW, et al. Diagnostic efficacy and prognostic value of serum procalcitonin concentration in patients with suspected sepsis. *J Intensive Care Med*. 2009;24(1):63–71.
88. Chan YL, Tseng CP, Tsay PK, Chang SS, Chui TF, Chen JC. Procalcitonin as a marker of bacterial infection in the emergency department: an observational study. *Crit Care* [Internet]. 2004 [cited 2015 Mar 15];8:R12-R20. Available from: <http://www.ccforum.com/content/8/1/R12>
89. Jones AE, Trzeciak S, Kline J a. The Sequential Organ Failure Assessment score for predicting outcome in patients with severe sepsis and evidence of hypoperfusion at the time of emergency department presentation. *Crit Care Med*. 2009;37(5):1649–54.
90. Pettila V, Hynninen M, Takkunen O et al. Predictive value of procalcitonin and interleukin-6 in critically ill patients with suspected sepsis. *Intensive Care Med* 2002;28:1220–5.
91. Jensen JU, Heslet L, Jensen TH et al. Procalcitonin increase in early identification of critically ill patients at high risk of mortality. *Crit Care Med* 2006;34:2596–602.
92. Claeys R, Vinken S, Spapen H, et al. Plasma procalcitonin and C-reactive protein in acute septic shock: clinical and biological correlates. *Crit Care Med*. 2002;30:757-62.
93. Kibe S, Adams K, Barlow G. Diagnostic and prognostic biomarkers of sepsis in critical care. *J Antimicrob Chemother*. 2011;66(Suppl.2):33–40.
94. Becker KL, Snider RH, Nylén ES. Procalcitonin assay in systemic inflammation infection, and sepsis: clinical utility and limitations. *Crit Care Med*. 2007;36:941 – 52.
95. 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* [Internet]. 2004 [cited 2015 Mar 15];8(4):R234–42. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC522844/>
96. Ugarte H, Silva E, Mercan D, DeMendonca A, Vincent JL. Procalcitonin used as a marker of infection in the intensive care unit. *Crit Care Med*. 1999;27:498-504.

97. Jiri Z, Vavrina M. Procalcitonin Biomarker Kinetics to Predict Multiorgan Dysfunction Syndrome in Children with Sepsis and Systemic Inflammatory Response Syndrome. *Iran J Pediatr* [Internet]. 2015 [cited 2015 Apr 28];25(1):1–6. Available from: <http://ijp.tums.pub/en/articles/324.html>
98. Meisner M, Tschaikowsky K, Palmaers T, Schmidt J. Comparison of procalcitonin (PCT) and C-reactive protein (CRP) plasma concentrations at different SOFA scores during the course of sepsis and MODS. *Crit Care* [Internet]. 1999 Mar [cited 2014 Sep 25];3(1):45-50. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC29013/>
99. Kutz A, Briel M, Christ-Crain M, Stolz D, Bouadma L, Wolff M, et al. Prognostic value of procalcitonin in respiratory tract infections across clinical settings. *Crit Care* [Internet]. 2015 Mar [cited 2015 Apr 28];19(1):74. Available from: <http://ccforum.com/content/19/1/74>
100. Charles PE, Tinel C, Barbar S, Aho S, Prin S, Doise JM, et al. Procalcitonin kinetics within the first days of sepsis: relationship with the appropriateness of antibiotic therapy and the outcome. *Crit Care* [Internet]. 2009 Mar [cited 2014 Sept 25];13:R38. Available from: <http://www.ccforum.com/content/13/2/R38>
101. Dahaba AA, Hagara B, Fall A, Rehak PH, List WF, Metzler H. Procalcitonin for early prediction of survival outcome in postoperative critically ill patients with severe sepsis. *Br J Anaesth*. 2006;97(4):503–8.
102. Faix JD. Biomarkers of sepsis\*. *Crit Rev Clin Lab Sci*. 2013;50(1):23–36.
103. Venkata C, Kashyap R, Farmer JC, Afessa B. Thrombocytopenia in adult patients with sepsis: incidence, risk factors, and its association with clinical outcome. *J Intensive Care* [Internet]. 2013 [cited 2015 Apr 28];1(1):9. Available from: <http://www.jintensivecare.com/content/1/1/9>
104. Kinasewitz GT, Yan SB, Basson B, Comp P, Russell JA, Cariou A, et al. Universal changes in biomarkers of coagulation and inflammation occur in patients with severe sepsis, regardless of causative micro-organism [ISRCTN74215569]. *Crit Care* [Internet]. 2004 Apr [cited 2015 Feb 20];8(2):R82–90. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC420030/>
105. Collins PW, Macchiavello LI, Lewis SJ, Macartney NJ, Saayman AG, Luddington R, et al. Global tests of haemostasis in critically ill patients with severe sepsis syndrome compared to controls. *Br J Haematol*. 2006;135(2):220–7.

106. Ishizuka M, Tago K, MD, Kubota K. Impact of prothrombin time – International Normalized Ratio on outcome of patients with septic shock receiving polymyxin B cartridge hemoperfusion. *Surgery*. 2014;156(1):168-75.
107. Nile CJ, Sherrabeh S, Ramage G, Lappin DF. Comparison of circulating tumour necrosis factor superfamily cytokines in periodontitis patients undergoing supportive therapy: A case-controlled cross-sectional study comparing smokers and non-smokers in health and disease. *J Clin Periodontol*. 2013;40(9):875–82.
108. Vosters JL, Roescher N, Polling EJ, Illei GG, Tak PP. The expression of APRIL in Sjogren’s syndrome: aberrant expression of APRIL in the salivary gland. *Rheumatology (Oxford)* [Internet]. 2012 [cited 2015 Mar 15];51:1557–62. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22562936>
109. Castigli E, Wilson SA, Garibyan L, Rachid R, Bonilla F, Schneider L, et al. TACI is mutant in common variable immunodeficiency and IgA deficiency. *Nat Genet*. 2005;37(8):829–34.
110. Kyrtsolis MC, Sarris K, Koulieris E, Maltezas D, Nikolaou E, Angelopoulou MK, et al. Serum Soluble TACI, a BLYS Receptor, Is a Powerful Prognostic Marker of Outcome in Chronic Lymphocytic Leukemia. *BioMed Research International* [Internet]. 2014 Aug [cited 2015 Apr 10];2014:159632[5 pages]. Available from: <http://www.hindawi.com/journals/bmri/2014/159632/>
111. Kreuzaler M, Rauch M, Salzer U, Birmelin J, Rizzi M, Grimbacher B, et al. Soluble BAFF Levels Inversely Correlate with Peripheral B Cell Numbers and the Expression of BAFF Receptors. *J Immunol* [Internet]. 2012 [cited 2015 Feb 24];188:497-503. Available from: <http://discovery.ucl.ac.uk/1333180/>
112. Knight AK, Radigan L, Marron T, Langs A, Zhang L, Cunningham-Rundles C. High serum levels of BAFF, APRIL, and TACI in common variable immunodeficiency. *Clin Immunol* [Internet]. 2007 Aug [cited 2013 Jun 9];124(2):182–9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2491330/>
113. Feezor RJ, Oberholzer C, Baker HV, Novick D, Rubinstein M, Moldawer LL, et al. Molecular Characterization of the Acute Inflammatory Response to Infections with Gram-Negative versus Gram-Positive Bacteria. *Infect Immun*. 2003;71(10):5803–13.

114. Oberholzer A, Steckholzer U, Kurimoto M, Trentz O, Ertel W. Interleukin-18 plasma levels are increased in patients with sepsis compared to severely injured patients. *Shock*. 2001;16(6):411-4.
115. Deitcher SR, Eisenberg PR. Elevated concentrations of cross-linked fibrin degradation products in plasma; An early marker of Gram-negative bacteremia. *Chest*. 1993;103(4):1107-12.
116. Oude Nijhuis CS, Vellenga E, Daenen SM, Graaf van der WT, Gietema JA, Groen HJ, Kamps WA, De Bont ES: Lipopolysaccharide-binding protein: a possible diagnostic marker for Gram-negative bacteremia in neutropenic cancer patients. *Intensive Care Med*. 2003;29(12):2157-61.
117. Hommel D, Bakey S, Karamanos E, Kolbe N, Louwers L, Watras J, et al. Transient Increase in the Platelet Count: An Early Sign of Gram Negative Sepsis?. *Crit Care Med* [Internet]. 2013 Dec [cited 2015 Apr 14];41(Suppl 12):1048. Available from: <http://journals.lww.com/ccmjournal/toc/2013/12001>
118. Liesenfeld O, Lehman L, Hunfeld K-P, Kost G. Molecular diagnosis of sepsis: New aspects and recent developments. *Eur J Microbiol Immunol (Bp)* [Internet]. 2014 Mar [cited 2015 Mar 03];4(1):1-25. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3955828/>
119. Wesche DE, Lomas-Neira JL, Perl M, Chung C-S, Ayala A. Leukocyte apoptosis and its significance in sepsis and shock. *J Leukoc Biol*. 2005;78(2):325-37.
120. Jacobi J. Pathophysiology of sepsis. *Am J Heal Pharm* [Internet]. American Society for Investigative Pathology; 2002 [cited 2014 Dec 05];59(5):1435-44. Available from: <http://dx.doi.org/10.2353/ajpath.2007.060872>
121. Ren H. Sepsis and immune response. *World J Emerg Med*. 2011;2(2):88-92.
122. Gupta A, Sarda AK, Bhalla SA, Nayyar R, Goyal A. Serum Complement Activation and Serum C3 Levels in Generalised Peritonitis Correlated with Sepsis Severity Index. *J IACM* 2004;5(3):229-34.
123. Younger JG, Bracho DO, Chung-Esaki HM, Lee M, Rana GK, Sen A, et al. Complement activation in emergency department patients with severe sepsis. *Acad Emerg Med*. 2010;17(4):353-9.

124. Andaluz-Ojeda D, Iglesias V, Bobillo F, Almansa R, Rico L, Gandía F, et al. Early natural killer cell counts in blood predict mortality in severe sepsis. *Crit Care* [Internet]. BioMed Central Ltd; 2011 Jan [cited 2013 Jun 14];15(5):R243. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3334794/>
125. Gressner OA, Koch A, Sanson E, Trautwein C, Tacke F. High C5a levels are associated with increased mortality in sepsis patients – no enhancing effect by actin-free Gc-globulin. *Clin Biochem*. 2008;41:974-80.
126. Ren J, Zhao Y, Yuan Y, Han G, Li W, Huang Q, et al. Complement Depletion Deteriorates Clinical Outcomes of Severe Abdominal Sepsis: A Conspirator of Infection and Coagulopathy in Crime? *PLoS One*. 2012;7(10):1–9.
127. Charchafliéh J, Wei J, Labaze G, Hou YJ, Babarsh B, Stutz H, et al. The role of complement system in septic shock. *Clin Dev Immunol* [Internet]. 2012 [cited 2015 Apr 10];2012:407324[8 pages]. Available from: <http://www.hindawi.com/journals/jir/2012/407324/>
128. Treamtrakanpon W, Tantivitayakul P, Benjachat T, Somparn P, Kittikowit W, Eiam-Ong S, et al. APRIL, a proliferation-inducing ligand, as a potential marker of lupus nephritis. *Arthritis Res Ther* [Internet]. BioMed Central Ltd; 2012 [cited 2014 Oct 2];14(6):R252. Available from: <http://arthritis-research.com/content/14/6/R252>
129. Venet F, Gebeile R, Bancel J, Guignant C, Poitevin-Later F, Malcus C, et al. Assessment of plasmatic immunoglobulin G, A and M levels in septic shock patients. *Int Immunopharmacol*. 2011;11(12):2086–90.
130. Bermejo-Martín JF<sup>1</sup>, Rodríguez-Fernández A, Herrán-Monge R, Andaluz-Ojeda D, Muriel-Bombín A, Merino P, et al. Immunoglobulins IgG1, IgM and IgA: a synergistic team influencing survival in sepsis. *J Intern Med*. 2014;276(4):404-12.
131. Shankar-Hari M, Culshaw N, Post B, Tamayo E, Andaluz-Ojeda D, Bermejo-Martín JF, et al. Endogenous IgG hypogammaglobulinaemia in critically ill adults with sepsis: systematic review and meta-analysis. *Intensive Care Med* [Internet]. 2015 May [cited 2015 May 18];41(8):1393-401.
132. Calle P, Cerro L, Valencia J, Jaimes F. Usefulness of severity scores in patients with suspected infection in the emergency department: A systematic review. *J Emerg Med* [Internet]. Elsevier Inc; 2012 [cited 2014 Oct 05];42(4):379–91. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jemermed.2011.03.033>

## LISTA SKRAĆENICA

ACCP – *American College of Chest Physicians*

SCCM – *Society of Critical Care Medicine*

SIRS – *Systemic inflammatory response syndrome*

ESICM – *European Society of Intensive Care Medicine*

ATS – *American Thoracic Society*

SIS – *Surgical Infection Society*

CRP – C-reaktivni protein

SD – standardna devijacija

PCT – prokalcitonin

SvO<sub>2</sub> – saturacija kiseonikom mešane venske krvi

INR – *international normalized ratio*

PT – *prothrombin time*

SOFA – *Seqential Organ Failure Assessment*

TNF – tumor nekrozis faktor

IL – interleukin

APĆ – antigen prezentujuća ćelija

PRR – *pattern-recognition receptors*

LPS – lipopolisaharid

PAMPs – *pathogen-associated molecular patterns*

TLR – *toll-like receptor*

NF-κB – nuklearni faktor-κB

DAMPs – *damage-associated molecular patterns*

TNF- $\alpha$  – tumor nekrozis faktor alfa

IFN- $\gamma$  – interferon gama

MCP-1 – *monocyte chemoattractant protein-1*

HLA-DR – *human leukocyte antigen-DR*

MZ – marginalna zona

BCR – *B cell receptor*

GC – germinativni centar

Bregs – B regulatorni limfociti

TGF- $\beta$ -1 – *transforming growth factor beta 1*

GM-CSF – *granulocyte-macrophage colony-stimulating factor*

SLE – sistemski lupus eritematodes

MS – multipla skleroza

IRA-B lym – *innate response activator B lymphocyte*

TNFR – tumor nekrozis faktor receptor

APRIL – *A proliferation inducing ligand*

BAFF – *B cell activating factor*

TACI – *Transmembrane activator and calcium modulator cyclophilin ligand interactor*

sTACI – *solubilni transmembrane activator and calcium modulator cyclophilin ligand interactor*

BCMA – *B cell maturation antigen*

BAFF-R – *B cell activating factor receptor*

MODS – *Multiorgan dysfunction syndrome*

sTREM – *Soluble triggering receptor expressed on myeloid cells-1*



suPAR – *Soluble urokinase-type plasminogen activator receptor*

pro-ADM – *Proadrenomedulin*

HMGB1 – *High-mobility group box 1*

MIF – *Macrophage migration inhibitory factor*

KCV – Klinički centar Vojvodine

JIL – Jedinica intenzivnog lečenja

ALT – alanin aminotransferaza

AST – aspartat aminotransferaza

GGT – gama-glutamil-peptidtransferaze

aPTT – *activated partial thromboplastin time*

TT – *thrombin time*

ELISA – *enzyme-linked immunosorbent assay*

PCR – *poliymerase chain reaction*

ALI – *acute lung injury*

ROC – *receiver operating curve*

AUC – *area under the curve*

CVK – centralni venski kateter

ITU – *infectio tractus urinarii*

CNS – centralni nervni sistem

CONS – koagulaza negativni S.aureus

KVS – kardiovaskularni sistem

GCS – *Glasgow coma scale*

CDC – *Centers for Disease Control and Prevention*