

UNIVERZITET U BEOGRADU

MEDICINSKI FAKULTET

Dr Ljiljana Milić

Prognostički značaj proteina HMGB1 u
difuznom sekundarnom peritonitisu

Doktorska disertacija

Beograd, 2016.

UNIVERSITY OF BELGRADE

SCHOOL OF MEDICINE

Dr Ljiljana Milic

Prognostic value of protein HMGB1 in a
diffuse secondary peritonitis

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2016.

Mentor:

Prof. dr Predrag Peško

Redovni profesor Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu

Komentor:

Dr Ilijana Grigorov

Naučni savetnik, Institut za biološka istraživanja „Siniša Stanković“ Univerziteta u Beogradu

Komisija:

Prof. dr Aleksandar Karamarković

Vanredni profesor Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu

Prof. dr Ana Šijački

Redovni profesor Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu

Dr Desanka Bogojević

Naučni savetnik, Institut za biološka istraživanja „Siniša Stanković“ Univerziteta u Beogradu

Veliku zahvalnost dugujem svom mentoru, dr Predragu Pešku, redovnom profesoru hirurgije Medicinskog fakulteta, Univerziteta u Beogradu i dopisnom članu SANU, što me je usmerio da se bavim naučno istraživačkim radom, na nesebičnoj podršci i saradnji, savetima i sugestijama tokom dugogodišnje saradnje.

Veliko hvala komentoru, dr Ilijani Grigorov, naučnom savetniku Instituta za biološka istraživanja „Siniša Stanković“ Univerziteta u Beogradu, što mi je omogućila da deo istraživanja sprovedem u Institutu „Siniša Stanković“.

Zahvaljujem se prim. Sanji Stanković i svim mikrobiolozima sa kojima sam sarađivala tokom izrade doktorske teze, svim mojim kolegama, laborantima i medicinskim sestrama iz Urgentnog Centra-KCS.

Hvala svima koji su na bilo koji način pomogli da dođe do realizacije ove doktorske disertacije.

Tezu posvećujem mom ocu

SAŽETAK

Sekundarni peritonitis je hirurško stanje koje iziskuje neodložno operativno lečenje. Često je praćen sepsom sa relativno visokom incidencom i stopom smrtnosti. Intraabdominalna infekcija kao izvor sepse aktivira zapaljenje tokom kog brojni medijatori određuju patogenetski tok i ishod sekundarnog peritonitisa. U ovoj doktorskoj disertaciji smo istraživali povezanost nivoa HMGB1 (engl. *high mobility group box 1*) proteina preoperativno i postoperativno do otpusta iz bolnice, kao i akutne markere inflamacije: serum amiloid A (SAA) i češće ispitivane markere, kao što su C-reaktivni protein (CRP) i prokalcitonin (PCT), sa razvojem sindroma sistemskog inflamatornog odgovora (SIRS) i sepse kod pacijenata sa sekundarnim peritonitisom. Uticaj operativnog lečenja na kinetiku ovih markera je poređen sa nivoima kod pacijenata sa preponskim kilama bez znakova inflamacije. Nađene su značajno više preoperativne vrednosti svih ispitivanih markera u grupi sa peritonitisom u odnosu na pacijente sa kilama. U grupi sa peritonitisom, preoperativne vrednosti i vremenski obrazac promene HMGB1 su se značajno visoko razlikovale u grupi pacijenata koji su razvili sepsu, u odnosu na grupu kod koje SIRS nije bio praćen infekcijom. Kod septičnih pacijenata, vrednosti HMGB1 su blago opadale prvih dana posle operacije, dosežući najnižu tačku trećeg dana praćenja. Potom su rasle do sedmog postoperativnog dana, da bi nakon toga vrednosti opadale. Sa druge strane, u grupi SIRS, najniže vrednosti se registruju već prvog postoperativnog dana praćenja, da bi potom postepeno porasle, sa maksimumom u trećem postoperativnom danu i oscilirale između te dve vrednosti do kraja perioda praćenja. Preoperativne vrednosti SAA se nisu razlikovale kod septičnih pacijenata i pacijenata sa SIRS-om, ali se obrazac promene SAA postoperativno značajno razlikovao među ovim grupama. Kod septičnih pacijenata su vrednosti vrlo značajno porasle nakon prvog postoperativnog dana, a zatim kontinuirano opadale do kraja perioda hospitalizacije. Nasuprot tome, kod pacijenata sa SIRS-om, vrednosti su opadale u odnosu na preoperativnu vrednost, što je bilo visoko značajno različito, u odnosu na grupu septičnih pacijenata. Preoperativne vrednosti CRP-a i PCT-a su bile značajno više u grupi septičnih pacijenata u odnosu na grupu sa SIRS-om. Vrednosti CRP-a dostižu maksimalne vrednosti drugog postoperativnog dana, a PCT-a prvog postoperativnog dana. Oba markera su kontinuirano opadala do kraja hospitalizacije

bez značajne razlike među grupama. HMGB1 protein kao kasni parametar inflamacije bi mogao da bude prognostički marker u sekundarnom peritonitisu.

Ključne reči: Sekundarni peritonitis, HMGB1, C-reaktivni protein, prokalcitonin, serum amiloid A, markeri inflamacije, sepsa, SIRS.

Prognostic significance of HMGB1 protein in diffuse secondary peritonitis

SUMMARY

Secondary peritonitis is a surgical condition requiring immediate surgical treatment. It is often accompanied by sepsis with a relatively high incidence and mortality. Intra-abdominal infection as a sepsis source triggers inflammation during which a number of pathogenic mediators determine the course and the outcome of the secondary peritonitis. In this doctoral thesis we investigated the correlation of the level of high mobility group box 1 protein (HMGB1), preoperatively and postoperatively until discharge from the hospital, as well as acute inflammatory markers: serum amyloid A (SAA), and more frequently assessed serological markers such as C-reactive protein (CRP) and procalcitonin (PCT), with the development of systemic inflammatory response syndrome (SIRS) and sepsis in patients with secondary peritonitis. The effect of operative treatment on the kinetics of these markers was compared with levels in patients with inguinal hernia without signs of inflammation. All investigated markers had significantly higher preoperative values in the group with peritonitis compared to patients with hernias. Within the peritonitis group, preoperative values and the pattern changes of HMGB1 were highly significantly different in the group of patients who developed sepsis compared to the group in which SIRS was not accompanied by infection. In septic patients HMGB1 levels slightly declined in the first days after surgery, reaching the lowest point on the third day of the follow-up. Then they rose to seventh postoperative day, and after that value declined. On the other hand, in the group of SIRS lowest values are recorded on the first postoperative day of follow-up, but then gradually increased to a peak in the third postoperative day, oscillating between these two values until the end of the observation period. Preoperative SAA did not differ in septic patients and patients with SIRS, but the pattern of changes of SAA postoperatively was significantly different among these groups. In septic patients, SAA values increased significantly after the first postoperative day, and then continuously declined until the end of the period of hospitalization. By contrast, in patients with SIRS, values declined compared to the baseline, which was highly significantly different compared to the group of septic patients. Preoperative CRP and PCT were significantly higher in the group of septic patients compared to the group with SIRS. CRP value reached the maximum value of the second postoperative day and PCT on the first postoperative day. Both markers

continuously decreased until the end of hospitalization without significant difference between groups. HMGB1 protein as a late parameter of inflammation could be a prognostic marker in the secondary peritonitis.

Key words: secondary peritonitis, HMGB1, C-reactive protein, procalcitonin, serum amyloid A, markers of inflammation, sepsis, SIRS

SADRŽAJ

1 UVOD	1
1.1 PERITONITIS.....	2
1.1.1 Dijagnoza intraabdominalne sepse.....	3
1.1.2 Terapijski koncept u lečenju intraabdominalne sepse.....	4
1.1.2.1 Hirurško lečenje.....	4
1.1.2.2 Antimikrobna terapija.....	8
1.1.2.3 Intezivna terapija.....	10
1.2 DEFINICIJA SEPSE.....	12
1.2.1 APACHE II skor.....	13
1.2.2 ASA skor.....	16
1.3 IMUNOPATOGENEZA SEPSE.....	17
1.3.1.1 Početak imunskog odgovora u sepsi.....	17
1.3.1.2 Reakcije endotela.....	20
1.3.1.3 Reakcija epitela.....	21
1.3.2 Proinflamatorni odgovor u sepsi.....	21
1.3.3 Antiinflamatorni odgovor.....	23
1.4 SISTEM KOAGULACIJE U SEPSI.....	24
1.5 MARKERI INFLAMACIJE U SEPSI.....	26
1.5.1 Proteini akutne faze.....	26
1.5.1.1 C-reaktivni protein.....	27
1.5.1.2 Serum amiloid A.....	28
1.5.2 Prokalcitonin.....	29
1.5.3 HMGB1- High mobility group box 1.....	30
1.5.3.2 HMGB1 kao proinflamatorni medijator.....	34
1.5.3.3 Regenerativni efekti HMGB1.....	36

1.5.3.4 HMGB1 kao terapijska meta tokom zapaljenja.....	37
2 CILJEVI.....	38
3 MATERIJAL I METODE.....	40
3.1 Pacijenti.....	41
3.2 Hirurške tehnike.....	42
3.3 Mikrobiološka analiza	42
3.4 Određivanje hematoloških, hemostatskih i biohemijskih parametara iz krvi	43
3.5 Western blot.....	43
3.6 Statistička analiza.....	44
4 REZULTATI.....	45
4.1 Opšti demografski podaci	46
4.2 Dijagnostičke procedure:.....	47
4.3 Etiologija sekundarnog peritonitisa	47
4.4 Laboratorijska merenja	48
4.4.1 Parametri krvne slike	48
4.4.2 Parametri plazmatskih sistema.....	51
4.4.3 Biohemijski parametri	53
4.4.4 Markeri inflamacije	60
4.5 Mikrobiološki nalazi.....	68
4.6 Antibiotička terapija.....	68
4.7 Rezultati hirurškog lečenja.....	69
5 DISKUSIJA.....	71
6 ZAKLJUČCI	84
7 LITERATURA	86

1 UVOD

1.1 PERITONITIS

Abdominalna sepsa predstavlja medicinski problem koji je povezan sa značajnim morbiditetom i mortalitetom, što pokazuju rezultati mnogih prospektivnih studija rađenih kod bolesnika sa teškim peritonitisom (1). Lečenje bolesnika sa komplikovanim intraabdominalnim infekcijama zahteva adekvatan menadžment koji je opisan i koji daje najbolje rezultate (smanjenje smrtnosti 2-3%) (2). Epidemiološke studije kod bolesnika sa intraabdominalnim infekcijama, koje uključuju i starije bolesnike sa komorbiditetima, pokazuju višu stopu smrtnosti (3). U studiji CIAO ukupna stopa smrtnosti iznosila je 10,5% (4).

Peritonitis je jedan od najvažnijih izvora abdominalne sepse, koja je i pored savremenih terapijskih pristupa praćena relativno visokom incidencijom i stopom smrtnosti kao što navode Rau i sar. (5). Ishod peritonitisa je rezultat povezanosti između dva faktora: sistemskog i peritonealnog odgovora sa jedne strane i količine prirode i dužine prisustva uzročnika peritonitisa sa druge strane (6). Najčešći uzročnici peritonitisa su gram-negativne, gram-pozitivne kao i anaerobne bakterije uključujući i crevnu floru-*Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Streptococcus spp.* i *Bacteroides fragilis*. U peritonitisu, septična reakcija biva pokrenuta zahvaljujući postojanju komponenti koje se nalaze na spoljašnjoj membrani gram-negativnih bakterija (lipopolisaharid (LPS), lipid A, endotoksin), ili gram-pozitivnih bakterija (npr. lipoteiholinska kiselina, peptidoglikan), kao i anaerobnih endotoksina (7). Sistemska/peritonealna reakcija na intraabdominalni septički fokus bazirana je na uvećanom prisustvu i aktivnostima proinflamatornih medijatora: faktor nekroze tumora, engl. *tumor necrosis factor* (TNF), interleukinima (IL-1), (IL-6) uz istovremenu aktivaciju regulatornih, antiinflamatornih medijatora (IL-10, IL-4) (8). TNF i interleukini dovode do proizvodnje toksičnih medijatora, uključujući prostaglandine, leukotriene, trombocit aktivirajući faktor i fosfolipazu A2 koji oštećuju endotelne ćelije krvnih sudova i povećavaju kapilarnu propustljivost (7). Smatra se da ravnoteža između pro- i anti-inflamatornih medijatora predstavlja ključni faktor koji definiše progresiju i intenzitet patoloških procesa (9). Na osnovu nalaza visokih koncentracija citokina u peritonealnoj duplji, neki su sugerisali da intraabdominalna sepsa može nastati posredstvom oslobađanja citokina (10). Naime, u ranijoj studiji je konstatovano da su IL-1, TNF, IL-6, IL-10 i interferon gama (IFN- γ)

prisutni u visokoj koncentraciji u peritonealnoj tečnosti kod bolesnika sa peritonitisom. Rezultati ove studije pokazuju veliki gradijent između koncentracije interleukina u plazmi i peritonealnoj tečnosti, što sugerira da će nivo citokina u plazmi biti povećan tek nakon zasićenja tkiva unutar peritonealne duplje (11). U slučaju intenzivne bakterijske infekcije sistemski odgovor rezultuje prekomernim stvaranjem medijatora inflamacije i razvojem sindroma sistemskog inflamatornog odgovora (SIRS), oštećenjem tkivne perfuzije i multiorganskom disfunkcijom (MODS) (9). Inflamatorni odgovor bolesnika sa sepsom, zavisi će od patogena domaćina (genetskih osobina i komorbiditeta) i biće različit: lokalni, regionalni i sistemski (12). Kod nekih pacijenata, peritonitis može dovesti do prekomernog inflamatornog odgovora, tako da rana i agresivna mehanička peritonealna kontrola predstavlja odrednicu za zaustavljanje septičkog procesa. Kod bolesnika kod kojih to nije moguće, ili nije moguća kontrola i prekid lokalnog inflamatornog odgovora, rezultati u lečenju su lošiji (4).

1.1.1 Dijagnoza intraabdominalne sepse

Skraćivanje vremena u postavljanju dijagnoze teške sepse smatra se ključnom komponentom u smanjivanju smrtnosti od sepse zavisne multiorganske disfunkcije (13). Dijagnozu intraabdominalne sepse postavljamo uzimanjem anamneze i kliničkim pregledom. Nakon toga pristupamo nama dostupnim rendgenskim snimanjima trbuha (kada konstatujemo, najčešće, prisustvo gasa ispod dijafragme). Potom pristupamo ultrazvučnom pregledu trbuha a nekada kompjuterizovanoj tomografiji (engl. *computerized tomography*, CT) trbuha, koji predstavljaju esencijalne dijagnostičke procedure u abdominalnoj sepsi. Dijagnostički pristup u mnogome zavisi od hemodinamske stabilnosti bolesnika (14). Kod stabilnih pacijenata CT je modalitet izbora, posebno ako je dijagnoza neizvesna. Naravno da će kod pacijenta sa teškom sepsom, ako je postavljena dijagnoza peritonitisa, kliničkim pregledom, rendgenskim snimanjem trbuha i ultrazvukom, dodatna CT dijagnostika biti nepotrebna i samo odlagati toliko potrebnu hiruršku intervenciju (15). I na kraju, laparoskopija predstavlja minimalno invazivnu dijagnostičku proceduru kod pacijenata sa intraabdominalnom sepsom. Ovim putem dobijamo potrebne informacije neophodne u donošenju odluka o daljem lečenju. To je bezbedna procedura sa velikom dijagnostičkom tačnošću, veoma značajna kod hemodinamski nestabilnih bolesnika, sa ciljem sprečavanja "negativne" laparotomije. Nedostatak ove

procedure, za sada je to što se ne primenjuje rutinski, pogotovo u noćnim uslovima. Međutim, ukupni mortalitet bolesnika kod kojih se primenjuje dijagnostička laparoskopija u intenzivnoj nezi je visok, nezavisno od dijagnostičkog nalaza tokom tog postupka, tako da izbor bolesnika mora da bude vrlo selektivan (16).

1.1.2 Terapijski koncept u lečenju intraabdominalne sepe

Savremeni terapijski koncept lečenja intraabdominalne sepe podrazumeva:

1. Hirurško lečenje,
2. Antimikrobnu terapiju,
3. Intezivnu terapiju.

1.1.2.1 Hirurško lečenje

Operativo lečenje ostaje najodrživija terapeutska strategija kod lečenja intraabdominalne sepe. Generalno gledano, hiruška kontrola izvora infekcije i ishod lečenja zavisi od anatomskog izvora infekcije, stepena zapaljenja peritoneuma i generalizovanog septičnog odgovora, kao i komorbiditeta.

Kontrola izvora infekcije obuhvata sve mere koje se preduzimaju da bi se izvor infekcije eliminisao, i na taj način smanjio bakterijski inokulum i ispravno uspostavila anatomsko-fiziološka funkcija (17, 18). To obično podrazumeva drenažu apscesa i/ili inficiranih tečnosti, *debridement* nekrotičnog ili inficiranog tkiva i definitivnu kontrolu izvora kontaminacije (4). Dobro je poznato da neadekvatna kontrola izvora infekcije u početnoj fazi operacije, može da bude povezana sa povećanim mortalitetom kod bolesnika sa teškom intraadominalnom infekcijom (19).

Primarni ciljevi hirurškog lečenja podrazumevaju:

- Utvrđivanje uzroka peritonitisa,
- Evakuaciju tečnih kolekcija,
- Kontrolu porekla abdominalne sepe.

Hiruško lečenje izvora infekcije, podrazumeva resekciju ili suturu perforiranog organa (npr. perforacija divertikuluma debelog creva ili gastroduodenalna perforacija), uklanjanje obolelog organa (npr. slepo crevo, žučna kes), *debridement* nekrotičnog tkiva, resekciju ishemijskog creva i suturiranje/resekciju traumatske

perforacije, sa formiranjem anastomoze ili eksteriorizacije creva. Medijalna laparotomija je uobičajena incizija u peritonitisu.

Posebu pažnju treba posvetiti prostorima u abdominalnoj šupljini, gde se mogu formirati abscesi, kao što su subfrenični prostori, parakolični prostori i Duglasov prostor. U ovim prostorima treba pažljivo uraditi *debridement*, izbegavajući nastanak krvarenja prekomernim uklanjanjem fibina. Posebno pažljivo treba pristupiti *debridmanu* levog subfreničnog prostora, kada zbog fibroznih priraslica postoji mogućnost povrede slezine i kada je uklanjanje slezine zbog nekontrolisanog krvarenja opravdano. U slučaju sumnje na gastroduodenalnu crevnu perforaciju treba detaljno pregledati ceo gastrointestinalni trakt, počev od ezofagogastričnog prelaza do rektuma. U slučaju da ne postoji perforacija treba resecerati gastrokolični ligament i pristupiti u *burzu omentalis* kako bi se eksplorisao zadnji zid želuca, telo i rep pankresa (4). Intraabdominalna lavaža je i dalje kontroverza. Naime, neki autori su favorizovali peritonealno ispiranje, jer to pomaže u uklanjanju i razblaživanju peritonealne kontaminacije, kao i ispiranje velikim količinama fiziološkog rastvora (20). Međutim, primena antibiotika prilikom lavaže trbušne duplje u velikoj meri nije potkrepljena u literaturi (21).

U određenim okolnostima, infekcija se ne može u potpunosti kontrolisati, kada dovodi do prekomernog imunog odgovora, te se sepsa „razbuktava“ i dovodi do septičkog šoka i otkazivanja organa (22). Postavlja se pitanje, da li bi ti pacijenti imali koristi sa ponovnim operativnim lečenjem u cilju suzbijanja širenja infekcije. Nažalost, rana procena težine peritonitisa je teška kod hitnih hiruških bolesnika i pored velikog broja skorova te i dalje objektivno predstavlja problem kod kritično obolelih, tako da je procena da li će biti neohodna relaparotomija vrlo delikatna (23).

1.1.2.1.1 „On-demand“-ponovljena laparotomija

On-demand laparotomija je planirana relaparotomija na svakih 36-48 sati za potrebe inspekcije, dodatnog uklanjanja infektivnog sadržaja iz trbušne duplje i peritonealne lavaže, i predstavlja još jedan koncept u lečenju teških formi difuznog peritonitisa. Prednosti planirane relaparotomije su optimizacija korišćenja resursa, smanjenje potencijalnih rizika od pojave gastrointestinalnih fistula i postoperativne kile. Upravo

ovakav pristup smanjuje potrebu za ponovljenim laparotomijama, smanjuje zavisnost od narednih zdravstvenih usluga i samim tim smanjuje ukupne troškove lečenja (24).

U nekoliko studija su ocenjivane kliničke varijable koje mogu biti povezane sa potrebom „on-demand“ ponovljene laparatomije u neposrednom postoperativnom periodu (25-31). Koliki je značaj definisanja kliničkih varijabli kod odluke o relaparotomiji, van Ruler je ispitivao hirurge putem upitnika i došao do zaključka da su stepen difuzne kontaminacije trbušne duplje, lokalizacija infektivnog fokusa (gornji gastrointestinalni trakt, uključujući i tanko crevo) ili oba, ekstremno niski ili visoki leukociti, nezavisno prediktori relaparotomije. Rezultati ove studije sugerišu da ne postoji koncenzus među hirurzima. Konačna odluka se generalno zasniva na tome da ne postoji kliničko poboljšanje u uslovima progresije septičnog stanja. Studija sprovedena od strane Koperne i Šulca je takođe pokazala da je mnogo veća smrtnost kod bolesnika koji su posle 48 sati reoperisani od onih koji su reoperisani ranije (25).

1.1.2.1.2 Otvoren trbuh - „open abdomen“

Otvoren trbuh (engl. *open abdomen*, OA), je procedura koja je najbolji način sprovođenja ponovljenih laparotomija, ali i dalje velika kontroverza kod teških formi peritonitisa. Naime, randomizirana studija sprovedena 2007. godine, upoređivala je rezultate otvorenih i zatvorenih sa „on demand“ relaparotomijama. Nažalost, studija je bila prekinuta nakon opservacije 40 bolesnika zbog značajno veće stope smrtnosti u grupi bolesnika sa otvorenim abdomenom. OA procedura je sprovedena korišćenjem samo neresorptivne propilen mrežice (24). Takođe vodiči sugerišu da se u hitnoj hiruškoj intervenciji, OA ne koristi rutinski kao metoda operativnog lečenja intraperitonealne kontaminacije (32), mada je sada OA prihvaćena kao strategija u lečenju intraabdominalne sepe (33).

OA pristup u teškom sekundarnom peritonitisu se primenjuje kada postoji:

- neadekvatno kontrolisanje izvora kontaminacije;
- zbog teško poremećenih fizioloških uslova- izuzetno izražen edem creva, za koji treba vremena da se oporave, nakog čega je moguće eventualno uspostavljanje kontinuiteta digestivnog trakta crevnom anastomozom (34);
- radi sprečavanja nastanka „kompartment“ sindroma (35-37).

Pored ovih razloga, značajno mesto predstavlja objašnjenje da OP sa svojim mehaničkim uklanjanjem septičkog fokusa, uklanja i izlučene proinflamatorne citokine čiji je nivo u peritonealnoj duplji značajno veći nego u plazmi, da bi nakon uzastopnih lavaža bio znatno niži, te se i na taj način kontroliše i prekida lokalni inflamatorni odgovor. Naime, kod bolesnika sa teškim peritonitisom, pokazalo se da postoji značajan pad nivoa TNF, IL-1, IL-6 i endotoksina u peritonealnom sadržaju kod preživelih (38).

OA procedura se sprovodi i kada se nije uspeo kontrolisati lokalni inflamatorni odgovor i kada postoji povećan rizik od disfunkcije organa nakon jednokratne laparotomije sa *debridment*-om i drenažom (39-41). Iako se intraabdominalna hipertenzija može razviti nakon jednokratnog operativnog lečenje kod teških peritonitisa, u ovom trenutku ne postoje definitivni kriterijumi koji bi usmerili hirurga da donose odluku o korišćenju strategije OA (42).

1.1.2.1.3 Hirurgija radi kontrole oštećenja - „control damage surgery“

Hirurgija radi kontrole oštećenja (engl. *control damage surgery*, CDS), takođe ima svoje mesto u teškom peritonitisu i septičkom šoku. Naime, kod ovih bolesnika kao i u traumi dolazi do vazodilatacije, hipotenzije i miokardne depresije u kombinaciji sa koagulopatijom, tako da su i ovi bolesnici veoma hemodinamski nestabilni i nisu kandidati za složeno operativno lečenje (43). Abdominalno zatvaranje bi trebalo da bude privremeno, a bolesnik brzo odveden u intenzivnu negu, gde se primenjuju mere reanimacije sa mehaničkom ventilacijom, korekcijom koagulopatije, acidoze i hipotermije. Nakon 24-48 sati i stabilizacije stanja, bolesnik se ponovo operiše. Dodatna prednost ovakvog pristupa lečenju ogleda se u tome da postoji mogućnost smanjenja otoka creva i kreiranje primarne anastomoze (44). Naime, veliki hirurški izazov i dalje predstavlja odluka šta uraditi u situaciji kada postoji edem creva u teškom peritonitisu, da li uraditi anastomozu ili spoljnu diverziju nakon reseciranog creva, kada znamo da su ti bolesnici hemodinamski nestabilni sa kompromitovanom tkivnom perfuzijom. Kod ovakvih bolesnika upotreba primarne anastomoze je ograničena zbog visokog rizika od dehiscencije šavne linije i pojave fistule, a samim tim i povećanja komplikacija i mortaliteta. Studija sprovedena u Kolumbiji na 112 bolesnika, pokazala je da kod kritično obolelih bolesnika sa teškim peritonitisom treba primeniti etapne laparotomije, u toku kojih dolazi do adekvatne kontrole

septičkog fokusa i stabilizacije fizioloških parametara kako bi se mogla uraditi primarna anastomoza (45).

Takođe je značajno konstatovati da rano zatvaranje trbuha nakon stabilizacije bolesnika smanjuje komplikacije povezane sa otvorenim abdomenom (46). Naime, primarno zatvaranje fascije često se može sprovesti u roku od nekoliko dana od prvobitne operacije. To naravno neće biti uspešno ako nije uspela rana hirurška kontrola izvora abdominalne sepse (47, 48). Fascijalno zatvaranje bi moglo da se sprovede onda kada je abdominalna sepsa dobro kontrolisana (49), ali što ranije, da ne bi došlo do retrakcije fascije. Idealna privremena metoda zatvaranja trbuha trebala bi da obezbedi zaštitu abdominalnog sadržaja, da prevenira evisceraciju organa, da omogući uklanjanje inficiranog ili toksičnog sadržaja iz trbuha, da prevenira stvaranje fistula, da spreči oštećenje fascije i očuva abdominalni zid, kako bi ponovna operacija definitivnog zatvaranja trbuha bila olakšana i sigurna. U novije vreme, poseban akcenat se stavlja na privremeno zatvaranje trbuha tehnikom koja koristi negativan pritisak (engl. *vacuum assisted closure*, VAC). Ovom tehnikom se uklanjaju toksini, ili bakterijama bogat sadržaj iz trbuha, a sa druge strane, sprečava se retrakcija fascije trbušnog zida (42). I pored toga što je ova metoda i dalje udružena sa velikim morbiditetom i pojavom ventralnih kila kod preživelih bolesnika, ona obećava u lečenju bolesnika sa teškim peritonitisom i povećanim intraabdominalnim pritiskom (50).

1.1.2.1.4 Laparoskopija

Poslednjih nekoliko godina, laparoskopija postaje sve značajnija operativna tehnika u dijagnostici i lečenju intraabdominalne infekcije. Naime, laparoskopski pristup lečenju peritonitisa od strane iskusnog hirurga, izvodljiv je i vrlo efikasan, bez ikakvih komplikacija. Laparoskopija ima prednost i u dijagnostici i u lečenju kod inatrabdominalne infekcije, zbog manje invazivnog pristupa u lečenju (51). Međutim, kod nestabilnih bolesnika generalno, treba izbegavati laparoskopiju zbog povećanja intraabdominalnog pritiska nastalog kreiranjem pneumoperitoneuma, usled čega dolazi do poremećaja u kardiopulmonalnoj funkciji kao i acido-bazne ravnoteže (52).

1.1.2.2 Antimikrobna terapija

Ključna komponenta u prvoj liniji lečenja septičnog bolesnika, svakako je primena antimikrobne terapije. Empirijsku antimikrobnu terapiju treba početi što je pre

moguće kod pacijenata sa teškom sepsom sa ili bez prisutnog septičnog šoka (53-55). Analizirajući dobijene kulture iz peritonealne tečnosti, Riche i saradnici su konstatovali da se najčešće radi o polimikrobnim kulturama, ili anaerobima (56). Dokazi o konkretnoj ulozi nekih patogena na obrasce sepse su prilično mali, što nas sprečava da donosimo bilo kakav definitivan zaključak. Međutim, poznato je da pacijenti sa sepsom ili u septičkom šoku, mogu imati koristi od agresivnog tretmana antimikrobnim lekovima, kako bi se suzbila multiorganska disfunkcija organa izazvana postojanjem abdominalnog fokusa kao okidača. Za ovakve pacijente, *deeskalaciona* terapija bi mogla da bude najpogodnija strategija. Povećanje stope rezistencije i sveobuhvatnije razumevanje procesa sepse, naveli su mnoge stručnjake da zagovaraju upotrebu antibiotika širokog spektra u početnim fazama lečenja sepse (57, 58).

U toku lečenja abdominalne sepse, kliničari moraju biti svesni da se farmakokinetika značajno razlikuje među pacijentima, zbog različitih patofizioloških mehanizama u toku sepse, a takođe se mora uzeti u obzir i patofiziološki i imunološki status bolesnika. Naime, dilucija leka, koja se još naziva i nagomilavanje leka u „treći prostor“, takođe se mora uzeti u obzir prilikom davanja hidrofilnih lekova kao što su β -laktami, aminoglikozidi i glukopeptidi, koji se selektivno distribuiraju u ekstraćelijskom prostoru. Nizak nivo antimikrobnih lekova, doprinosi manjem nivou od očekivanog nivoa antimikrobne koncentracije u peritonelanoj tečnosti sa potencijalno smanjenim antimikrobnim dejstvom u ciljanim tkivima i, upravo zato treba davati veće doze ovih hidrofilnih lekova, za razliku od lipofilnih antibiotika (makrolida, fluorohinolona, tetraciklina, hloramfenikola, rimfapicina, linezolida), koji nemaju dilucioni efekat (59).

Intraabdominalna sepsa kod kritično obolelih može biti tretirana jednostrukim ili vešestrukim antimikrobnim režimom, u zavisnosti od opsega antimikrobne pokrivenosti (60). Kod kritično obolelih bolesnika kontinuirano davanje infuzija β -laktamskih antibiotika može olakšati brže i uspešnije lečenje u odnosu na bolus terapiju (61). Piperacilin/tazobaktam je beta-laktam/beta-laktamaze inhibitor koji u *in vitro* uslovima deluje na gram-pozitivne (uključujući i *Enterococcus*), gram-negativne i anaerobne mikroorganizme (62). Takođe je dokazano da piperacilin/tazobaktam u *in vitro* uslovima deluje i na izolovane *Enterobacteriaceae* i *Pseudomonas aeruginosa* koji takođe produkuju produženi spektar beta-laktamaza (63).

Karbapenemi deluju na gram-pozitivne (osim rezistentne gram pozitivne koke) i gram-negativne, aerobne i anaerobne patogene. Grupa karbapenema, uključujući imipenem/cilastin, meropenem i doripenem, deleći aktivnost prema nefermentativnoj grupi gram-negativnih bacila, posebno je pogodna za teške intraabdominalne infekcije (64). Doripenem je novi 1-SS-metil karbapenem i efikasniji je od Imipenema i Meropenema u *in vitro* uslovima na *Pseudomonas aeruginosa* (65). U poslednjih nekoliko godina, konstatovano je postojanje rezistencije na *Klebsiella-om* izazavano zapaljenje pluća, usled preterane upotrebe (66). Tigacilin se primenjuje kod komplikovanih intraabdominalnih infekcija usled svojih povoljnih *in vitro* aktivnosti na enterokoke, ESBL-proizvode sojeva *E. Coli*, *Klebsiella-e* i anaerobnih mikroorganizama. Takođe je pokazao značajno antimikrobno dejstvo protiv *Acinetobacter spp* (67, 68). Intraabdominalna infekcija sa *C. Albicans* se adekvatno leči flukonazolom (69).

1.1.2.3 Intezivna terapija

1.1.2.3.1 Hemodinamska podrška

U teškoj sepsi dolazi do hipovolemije koja nastaje kao posledica povećanog propuštanja tečnosti u kapilarima sa jedne strane, a sa druge strane depresije miokarda, izazavane ekcesivnim lučenjem citokina. Ove promene su često povezane i sa ekcesivnom potrošnjom kiseonika, a sa druge strane, oštećenjem dotoka kiseonika tkivima, čime se izaziva globalna hipoksija tkiva, što ponovo vodi do aktiviranja inflamatorne kaskade karakteristične za sepsu (70, 71).

Rano započeta terapija tečnostima već u hitnoj službi u bolnici, značajno smanjuje stopu smrtnosti bolesnika od septičnog šoka (72). To se pre svega odnosi na nadoknadu kristaloidnim rastvorima (13). Sa druge strane, kod bolesnika sa difuznim peritonitisom, davanje tečnosti treba držati pod kontrolom, kako bi se izbeglo preopterećenje tečnostima, što između ostalog može dovesti do edema creva i povećanja intraabdominalnog pritiska. To dalje vodi u translokaciju bakterija i oslobađanje citokina, te se i na taj način produbljuje sepsa (73).

1.1.2.3.2 Vazopresori

Vazopresori su lekovi koji izazivaju vazokonstrikciju i time održavaju adekvatan krvni pritisak, zahvaljući kome se optimizira protok krvi u organima.

Među najznačajnijim lekovima, svakako je norepinefrin, koji predstavlja prvu liniju lekova u borbi protiv sepse (13). U dvostruko slepoj randomiziranoj studiji sprovedenoj još 1993. godine, Martin i saradnici su pokazali da je norepinefrin bio efikasniji i pouzdaniji od dopamina (74). Takođe, De Becker i saradnici su pokazali da je primena dopamina bila povezana sa većim mortalitetom od davanja norepinefrina (75).

Postoji zabrinutost prilikom upotrebe epinefrina zato što dovodi do smanjenog protoka pre svega u splahničnoj regiji i povišenja serumskog laktata, međutim ni jedna studija nije pokazala da ima lošije rezultate u davanju, te se može koristiti kao alternativa norepinefrinu (76).

Vazopresin je takođe opravdano davati samostalno i u kombinaciji sa norepinefrinom za podizanje arterijskog pritiska, pošto deluje na vaskularne glatke mišiće direktnim aktiviranjem V1 receptora i istovremeno povećava vaskularni odgovor na kateholamine (77).

Dobutamin treba davati u slučaju postojanja disfunkcije miokarda, kada postoji povišeni srčani dotok krvi u srce a niski pritisak na izlasku iz srca ili hipoperfuzije, uprkos postizanju adekvatnog intravaskularnog volumena i arterijskog krvnog pritiska (13).

1.1.2.3.3 Kortikosteroidi

Upotreba kortikosteroida u lečenju sepse i septičkog šoka je i dalje kontroverza. Naime, sprovedena je studija 2011. godine, kada je objavljen i vodič po kome 0,5mg/kg u minuti ili više norepinefrina, treba davati od 5 do 7 dana, osim kod pacijenata sa lošim hemodinamskim odgovorom nakon dva dana i, sa porastom kortizola preko 250 nmol/l posle primene standardnog adrenokortikotropin (ACTH) testa(78). Vodič za "preživjele sepsu kampanje" preporučuje upotrebu kortikosteroida kod bolesnika sa septičnim šokom koji slabo reaguju na terapiju tečnostima i ne preporučuje rutinsku procenu za relativnu adrenalnu insuficijenciju (13).

1.1.2.3.4 Nutritivna potpora

Rana enteralna ishrana je izuzetno važna kod septičnih bolesnika zbog prevencije oštećenja crevne sluzokože i translokacije bakterija. Stoga enteralnu ishranu treba

započeti što ranije, čim se postigne hemodinamska stabilizacija i ostvari perfuzioni pritisak (79).

1.2 DEFINICIJA SEPSE

Infekcije različitim vrstama mikroorganizama (bakterije, virusi i gljivice), postale su često nezaobilazni deo života. Klinički simptomi ovih infekcija se veoma razlikuju, od jedva primetnih, pa do smrti. Teška sepsa i septički šok su ozbiljna manifestacija zaraznih bolesti koje mogu biti i po život opasne. Imaju visok mortalitet koji se kreće od 30% do 60% , ako je šok prisutan. Teška sepsa i septički šok su dijagnostikovani kod 750 000 slučajeva, a smrtni ishod kod 215 000 slučajeva godišnje u Sjedinjenim Američkim Državama, prema jednoj citiranoj epidemiološkoj studiji (80). Termini sepsa, teška sepsa i septički šok, koriste se već decenijama, mada nisu bili jasno definisani kriterijumi koji ih precizno kvalifikuju i objektivno su stvarali zabune u komunikaciji između kliničara i istraživača. Tako je bilo sve do Koncensus konferencije koja je održana 1992. godine, kada su dogovorene univerzalne definicije sindroma i time se omogućilo upoređivanje postignutih rezultata u istraživanjima (81). Sepsa je definisana kao sindrom sistemskog inflamatornog odgovora na prisustvo infekcije, dok se teška sepsa odnosi na sepsu sa organskom disfunkcijom. Septički šok predstavlja sepsu udruženu sa hipotenzijom ili hipoperfuzijom (Tabela 1).

Tabela 1. Definicije za sistemske inflamatorne sindrome i sepsu

Sindrom	kriterijum
SIRS-sindrom sistemskog inflamatornog odgovora	Najmanje dva ili više 1. telesna temperatura >38,0C ili <36,0C 2. srčana frekvenca >90 otkucaja/min 3. tahipnea >20 udisaja/min ili PaCO ₂ <4,3kPa 4. broj leukocita >12 000 ili <4 000 ili prisustvo >10% nezrelih neutrofila
Sepsa	SIRS + sumnja na postojanje kliničke infekcije
Teška sepsa	Sepsa udružena sa organskom disfunkcijom (sa najmanje jednom kliničkom manifestacijom): 1. akutnog pogoršanja mentalnog stanja 2. arterijske hipoksemije (PaO ₂ <75Kpa bez dokaza primarne plućne bolesti) 3. oligurija (urin <0,5ml/kg/h za ≥2h 4. akutno oštećenje funkcije jetre (S-bilirubin >43pmol/L ili S-alanin tranzaminaza više nego dvostruko iznad referentnih vrednosti) 5. metabolička acidoza (povišeni lakatati u plazmi ili negativni bazni eksces ≥5mEq/L 6. koagulopatija (protrombinsko ili tromboplastinsko vreme ≥1,2 puta iznad gornje granice, plus D-dimer ≥0,5mg/L ili trombociti ≤75x10 ⁹)
Septički šok	Teška sepsa udružena sa hipotenzijom koja zahteva terapiju vazopresorima ili sa vrednostima sistolnog pritiska <70mmHg za ≥30min, uprkos adekvatnoj nadoknadi tečnosti
MODS-Sindrom multiple organske disfunkcije	Poremećaj funkcije dva ili više organa usled loše perfuzije i oksigenacije organa

1.2.1 APACHE II skor

APACHE skor (engl. *Acute Physiology And Chronic Health Evaluation*) je bodovni sistem, koji ima za cilj kvantifikovanje slučaja i koristi rezultate za procenu ishoda. Ishod lečenja se obično meri po broju letalnih ishoda posle lečenja u jedinicama intenzivne nege. APACHE sistem je prvi opšti sistem bodovanja fizioloških funkcija i sistem koji kvantifikuje ozbiljnost bolesti. APACHE II skor omogućava procenu o verovatnoći smrtnog ishoda pre otpusta iz bolnice.

U početku su izabrane 34 varijable za koje su kliničari smatrali da imaju uticaja na ishod lečenja. One su potom smanjene na 12 češće merenih varijabli za APACHE II sistem bodovanja koji je objavljen 1985. godine. Do četiri poena se dodaje svakoj

fiziološkoj promenljivoj prema veličini abnormalnih vrednosti u toku prvih 24 sata u intenzivnoj nezi. Bodovi se takođe dodeljuju za starost, istoriju teških prethodnih bolesti i hirurški status. (Tabela 2).

Tabela 2: APACHE II sistem bodovanja

Fiziološki bodovi	4	3	2	1	0	1	2	3	4
Rek. Temp. (°C)	> 41,0	39,0-40,9		38,5-38,9	36,0-38,4	34,0-35,9	32,0-33,9	30,0-31,9	≤29,9
Krvni pritisak (mmHg)	≥160	130-159	110-129		70-109		50-69		≤49
Puls (otkucaji/min)	≥180	140-179	110-139		70-109		55-69	40-54	≤9
Respira, stopa (udisaj/min)	> 50	35-49		25-34	12-24	10-11	6-9		≤5
Oksigenacija (kPa): FiO ₂ > 50%-aDo ₂ FiO ₂ < 50% PaO ₂	66,5	46,6-66,4	26,6-46,4		<26,6 >9,3	8,1-9,3		7,3-8,0	<7,3
Arterijski pH	≥7,70	7,60-7,59		7,50-7,59	7,33-7,49		7,25-7,32	7,15-7,24	<7,15
Serum natrijum (mmol/l)	≥180	160-179	155-159	150-154	130-149		120-129	111-119	≤110
Serum kalijum (mmol/l)	≥7,0	6,0-6,9		5,5-5,9	3,5-5,4	3,0-3,4	2,5-2,9		<2,5
Serum kreatinin (μmol/l)	≥300	171-299	121-170		50-120		<50		
hematokrit (%)	≥60		50-59,9	46-49,9	30-45,9		20-29,9		<20
leukociti (x10 ⁹ /l)	≥40		20-39,9	15-19,9	3-14,9		1-2,9		<1

Ako je deo udahnutog kiseonika (FiO₂) > 50% alveolarnog-arterijskog gradijenta (A-a) se boduje. Ako je deo udahnutog kiseonika < 50% parcijalnog pritiska kiseonika dodeljen je poen

Ostale tačke:

-Glazgov koma skala

-Starost <45 = 0 bodova, 45-54 = 2, 55-64 = 3, 65-75 = 5, ≥75 = 6.

-Hronične bolesti dobijaju 5 bodova (koje su prisutne pre bolničkog prijema): hronično oboljenje jetre sa hipertenzijom ili prethodna insuficijencija jetre, encefalopatija, ili koma; hronična srčana insuficijencija (New York Heart Association); hronična respiratorna bolest sa teškim ograničenjima vežbanja, sekundarna policitemija, ili plućna hipertenzija; dijaliza zbog hronične bubrežne insuficijencije;

imunosupresija, na primer nakon zračenja, hemoterapije; nedavna ili dugoročna upotreba visokih doza steroida; leukemije, AIDS.

-5 bodova za hitne operacije ili nehirurške bolesnike, 2 boda za elektivnog hirurškog bolesnika.(82, 83).

Ukupan broj bodova daje ocenu od 0 do 71; oni sa većim rezultatom predstavljaju ozbiljniji stepen bolesti (Tabela 3). Što je skor veći to je i stopa umiranja veća:

Tabela 3. Stopa umiranja u odnosu na APACHE II skor (84)

APACHE II skor	Stopa umiranja (%)
0-4	~ 4
5-9	~ 8
10-14	~ 15
15-19	~ 25
20-24	~ 40
25-29	~ 55
30-34	~ 75
>35	~ 80

1.2.2 ASA skor

Američko društvo anesteziologa (ASA) je davne 1941. godine zatražilo od komisije koju su sačinjavala tri lekara - Meyer Saklad, Emery Rovenztine i Ivan Taylor, da na osnovu prikupljenih i tabeliranih statističkih podataka osmisle sistem koji će omogućiti anesteziologu da snimi ukupno zdravstveno stanje bolesnika pre operacije i na taj način proceni ishod lečenja. Iako je njihov zadatak bio da utvrde prediktore za operativni rizik, vrlo brzo je ovaj koncept bio odbačen jer ga je bilo nemoguće osmisliti, te je 1963.godine ASA predložila klasifikaciju preoperativnih bolesnika za procenu rizika od uvođenja u anesteziju.

ASA skor je subjektivna procena opšteg stanja zdravlja bolesnika i zasniva se na pet klasa:

- I. Bolesnik je potpuno zdrav
- II. Bolesnik ima blago sistemsko oboljenje
- III. Bolesnik ima ozbiljno sistemsko oboljenje koje ga ne osposobljava
- IV. Bolesnik ima oboljenja koja ga onesposobljavaju i predstavlja pretnju po život
- V. Moribundni bolesnik za kojeg se ne očekuje da živi 24 sata sa ili bez operacije.

E-se dodaje ispred rimske oznake kada je hitna operacija.

Suština ASA skora je njegova jednostavnost kao i široka svakodnevna upotreba te se često koristi u kliničkim ispitivanjima (85).

Stopa postoperativnih komplikacija je takođe blisko povezana sa ASA klasifikacijom (ASA skor I=0,41/1,000; skor IV I V=9,6/1,000) i kod urgentnih operacija (ASA skor I=1/1,000 raste do 2,65/1,000 kod skora IV I V) (86).

Dokazano je da postoji specifična korelacija ASA rezultata sa operativnim tokom, dužinom bolničkog boravka, postoperativnih infekcija, ukupne smrtnosti kod operacija na gastrointestinalnom traktu (87, 88), te je upotreba ASA skora u rutinskoj praksi izuzetno važna u procenjivanju ishoda ukupnog lečenja bolesnika (kako intraoperativno tako i postoperativnog toka lečenja).

1.3 IMUNOPATOGENEZA SEPSE

Nerazjašnjeni imunoregulatorni procesi u sepsi predstavljaju izazov sa ciljem pronalaženja što bolje strategije u lečenju. Početni inflamatorni odgovor na patogene odlikuje pojava tzv. „citokinske oluje“ koju karakteriše visok nivo citokina/hemokina u plazmi. Klinički simptomi uključuju pojavu groznice, ubrzan rad srca i disanja, praćene hipotenzijom, šokom, multiorganskom disfunkcijom i smrću (89). Pacijenti koji prežive ovaj početni septički šok ulaze u imunosuprimirano stanje. Gubitak imunološke funkcije predstavlja ključnu odliku kasnije faze sepse. Pojava proinflamatorne faze u sepsi je karakteristična za početak sepse i kod eksperimentalnih životinja i kod ljudi i predstavlja važan ključni mehanizam koji može da izazove septički šok. Za razumevanje nastanka septičkog šoka ključno je poznavanje inicijalnog imunskog odgovora. Pored toga, ne zna se dovoljno ni o faktorima koji posreduju prelazak iz proinflamatorne u antiinflamatornu fazu i podstiču i održavaju imunosupresiju (90).

1.3.1.1 Početak imunskog odgovora u sepsi

Nakon invazije patogena i kroz narušenu kožu ili sluzokožu, sledeću liniju odbrane predstavljaju ćelije urođenog imuniteta: monociti/makrofagi i neutrofilii- ujedno sve ćelije koje poseduju sposobnost fagocitoze. Ove ćelije reaguju na širok spektar patogena, uglavnom prepoznajući evolutivno ustaljene molekule infektivnih agenasa koji su od suštinskog značaja za njihov opstanak, tzv. molekulske obrasce patogena (engl. *pathogen-associated molecular patterns, PAMP*).

Važni primeri PAMP su:

- Lipopolisaharid (LPS) iz gram-negativnih bakterija,
- flagelin,
- lipoteihocinska kiselina kod gram- pozitivnih bakterija,
- peptidoglikan iz bakterijskog ćelijskog zida, različite strukture kao što je:
- zimosan porekla gljivica,
- nukleinske kiseline virusa,
- dvolančana RNK (dsRNK),
- nemetilovana CpG ostrva (91).

Patogeni i njihovi produkti bivaju prepoznati putem četiri klase receptora: receptorima sličnim Toll-u (engl. *Toll-like receptors*, TLR) i receptorima sličnim lektinu C-tipa (engl. *C-type lectin receptors*, CLR), koji su membranski, i citosolnim receptorima sličnim RIG-u (engl. *NOD-like receptors*, NLR, RLR) i receptorima sličnim NOD-u (engl. *NOD-like receptors*, NLR) (92, 93).

Vezivanje će inicirati različite procese, uključujući fagocitozu (94), proizvodnju i oslobađanje proinflamatornih medijatora, uključujući citokine (95), pre svega TNF- α , IL-1 i IL-6 (89, 96, 97). (89, 96, 97). Vezivanjem LPS tokom infekcije gram-negativnim bakterijama za TLR-4 i prenos unutarćelijskog signala dovodi do transkripcije proinflamatornih molekula (98). Ovaj proces može uticati na ishod sepse (99). Aktivacija NLR rezultuje obrazovanjem inflamazoma, unutar ćelijskog multiproteinskog kompleksa koji regrutuje kaspazu 1, koja pro-IL-1 β prevodi u aktivnu formu (100). Najnovije studije ukazuju da LPS može intracelularno da aktivira kaspazu 1, nezavisno od TLR-4 i da dovede do sličnog imunološkog odgovora u septičkom šoku (101, 102).

Početni imunski odgovor uključuje nekoliko vrsta leukocita. Osnovna funkcija B-limfocita je produkcija antitela. Opisane su dve podgrupe B-ćelija i to B1 i B2 (103, 104). B1 ćelije sintetizuju IgM slabog afiniteta, nazvanih prirodna antitela (105, 106). IgM imaju ulogu u aktivaciji komplementa u toku ishemije, odnosno u toku oštećenja na bazi ishemija/reperfuzija poremećaja (107). Deficijencija B ćelija ili insuficijencija funkcije rezultuje nedostatkom antitela a samim tim i nemogućnošću kontrole infekcije (108). Posebna podgrupa nazvana B1a ćelije, doprinose početnoj odbrani od gram negativnih bakterija (109, 110). Nedavno ispitivanje bolesnika sa abdominalnom infekcijom pokazalo je da postoji podgrupa B ćelija, koja podstiče urođeni imunološki odgovor (engl. *innate response activator*, IRA) (111). IRA B ćelije se razvijaju i odstupaju od B1a i B ćelija koje se obično nalaze u telesnim šupljinama (112). Mehanizam kojim IRA B ćelija produkuje GM-CSF štiti od mikrobne sepse, još uvek je nepoznat ali će svakako zavisiti od intraćelijske aktivnosti citokina koji posreduju CD131, zajednički beta lanac GM-CSF receptora (113, 114).

Pored GM-CSF, još jedan citokin deluje preko CD131 subjedinice receptora a to je IL-5. Među brojnim funkcijama, IL-5 deluje na eozinofile da oslobode DNK, ekstraćelijski na kiseonik, reaktivno zavisano način nakon stimulacije LPS (115). Tokom sepse, IL-5 dovodi do infiltracije crevnog zida eozinofilima i do ekstraćelijskog oslobađanja

mitohondrijalne DNK. Ovo oslobađanje rezultira stvaranjem ekstraćelijskih kompleksa i granula proteina koji dovode do bakterijskog vezivanja i uništavanja, i *in vitro* i *in vivo* na do sada nepoznat način. Zbog toga što je funkcija intestinalne barijere od krucijalnog značaja u sepsi, ovaj proces ukazuje na veoma važnu i do sada nepoznatu ulogu imunskog odgovora posredovanog eozinofilima IL-5 još regrutuje neutrofile i monocite na mesto infekcije, od kojih oba eksprimiraju receptore za IL-5 na svojoj površini (116).

Neutrofili su od suštinskog značaja za urođeni imunitet (117, 118), a njihova migracija na mesto infekcije je od ključnog značaja tokom početne imunološke reakcije i eliminacije patogena, a sa druge strane inhibicija migracije neutrofila značajno utiče na sposobnost imunskog sistema u borbi protiv infekcije. Hemopeksin na primer, je nedavno istražen faktor koji je odgovoran za inhibiciju migracije neutrofila, te je dokazano da je visok nivo hemopeksina u korelaciji sa smanjenim preživljavanjem kod sepse. Pored toga, hemopeksin smanjuje CXCR2, L-selektin i CD11b ekspresiju na neutrofilima, koji su potrebni za hemotaksu i endotelnu transmigraciju. Sprečavanjem inhibitornog efekta na serin proteaze ili ATP uz povećanje IL-5 je pozitivan efekat na eozinofilne i ne-eozinofilne mijeloidne populacije, što može dovesti do budućih mogućnosti lečenja sepse kao i dalja istraživanja, ali se njihov značaj mora još istraživati (119).

Iako su neke od funkcija GM-CSF i IL-5 tokom imunog odgovora u sepsi razjašnjeni, korist od njihove primene u terapijske svrhe ostaje nejasna. Jedan od razloga može biti to što dolazi do ometanja vezivanja za receptore: zajedničku subjedinicu receptora za GM-CSF i IL-5, CD131 koristi i IL-3, hematopoetski proliferativni faktor koji oslobađaju aktivirane T ćelije i indukovano je tokom hronične inflamacije, ali mu je uloga u akutnom imunološkom odgovoru u toku sepse još uvek nepoznata (120, 121).

Takođe nedavna istraživanja su usmerena na izučavanje uloge T ćelija u sepsi. Pacijenti sa teškom sepsom pokazuju smanjen broj CD4⁺CD28⁺ imunokompetentnih T ćelija (122), kao i smanjenje broja ovih ćelija u slezini kod bolesnika koji su umrli od sepse (123) što je udruženo sa obilnom T ćelijskom apoptozom. Teška sepsa je takođe povezana sa povećanim brojem CD4⁺PD-1⁺ i regulatornih CD4⁺FoxP3⁺CD25⁺ T ćelija (122). Oba tipa ćelija imaju imunosupresivna svojstva i povišeni su kod umrlih od sepse (123).

1.3.1.2 Reakcije endotela

Lokalno oslobađanje inflamatornih medijatora aktivira endotelne ćelije (endotelna aktivacija podrazumeva promene oblika ćelija, promenu funkcije barijere i proteinske ekspresije na površini ćelija) (124) duž zidova krvnih sudova, koje onda ekspimiraju adhezivne molekule koji vezuju ligande na leukocitima, limfocitima i trombocitima. Vezivanje receptora na površini leukocita nazvanih funkciji pridružen antigen (LFA-1) za intracelularni adhezioni molekul (ICAM-1) endotelne ćelije, upravo je odgovorno za adheziju leukocita za endotel i migraciju u tkiva, u toku sepse (125). Ovo vezivanje LFA-1/ICAM-1 je sprečeno lučenjem endokana (126). Endokan (endotelijalni specifični molekul-1) je proteoglikan koga prezentuju ćelije pluća i bubrega (127). Kao posledica stimulacije endotelnih ćelija od strane endotoksina (LPS) i proinflamatornih proksimalnih citokina dolazi do ekcesivnog oslobađanja endokana koji može biti u vezi sa fatalnim ishodom i nakon oštećenja endotela (126).

Nakon adhezije monocita na zidove krvnog suda i agregacije, započinje njihova migracija na mesto postojanja infektivnog fokusa gde se diferenciraju u makrofage i vrše fagocitozu. Oni predstavljaju glavni izvor proinflamatornih medijatora. Varijacije u funkcionalnim sposobnostima makrofaga zavise od ekspozicije različitim citokinima, hormokinima i neurotransmiterima, koncentracije ovih medijatora, vremena ekspozicije i aspekta mikrosredine (128). Makrofagi koji su pod uticajem IFN- γ nazivaju se klasično aktivirani ili M1 makrofagi. Makrofagi regulisani od strane IL-4, IL-13 ili IL-10 nazvani su alternativno aktivirani ili M2 makrofagi (129, 130). Takođe, aktiviraju se i neutrofil, koje karakteriše visok antimikrobni potencijal ali zbog neselektivnog delovanja, odgovorni su i za tkivna oštećenja koja su evidentna u patogenezi sepse. Najčešće dolazi do oštećenja pluća, jetre, bubrega i gastrointestinalnog trakta (131, 132). Hemotaksa neutrofila zavisi od signala emitovanih iz inflamatornog fokusa (formil peptidi bakterija i IL-8) (133). Prepoznavanje mikroorganizma ili oštećenog tkiva vrši se pomoću TLR koji prenose transmembranski signal dalje kroz citoplazmu i aktiviraju gensku ekspresiju neutrofila. TLR2 i TLR4 prepoznaju delove ćelijskog zida gram-negativnih i gram-pozitivnih bakterija (134). Citolitičko delovanje neutrofila podrazumeva proces fagocitoze i egzocitoze. Potentno antimikrobno dejstvo se ostvaruje putem kiseonik-zavisnog i kiseonik-nezavisnog procesa (135).

1.3.1.3 Reakcija epitela

Brojne studije su pokazale da u septičnim stanjima dolazi do disfunkcijske promene na epitelnim ćelijama (136). Naime, pokazano je da signali koji indukuju produkciju azot-oksida (NO), koji je odgovoran za povećanu propustljivost epitelne barijere (137). Takođe inhibicija inducibilne azot-oxid sintetaze (iNOS) može prevenirati citokinsku indukciju poremećaja permeabiliteta (138). Kasnija saznanja ukazuju da produkcija peroksi-nitrita (nastaje kao posledica reakcije NO sa superoksidom) može biti od većeg značaja za alteraciju epitelne barije od strane NO. Smatra se da utiče na epitelnu barijeru promenom strukture i funkcije tesnih veza (engl. *tight junction*) između epitelnih ćelija, tako što vrši poremećaj na nivou Na⁺ K⁺ ATP-aze. Na osnovu ovih saznanja Fink i sar. predlažu sledeću paradigmu: proinflamatorni citokini dovode do indukcije iNOS što dovodi do produkcije NO koji inhibira Na/K ATP-azu što dovodi do poremećaja ekspresije i/ili subćelijske lokalizacije finih veza što rezultira povećanjem permeabiliteta epitela (136). Subletalni endotoksinski stimulus ima za posledicu poremećaj funkcije epitelne barijere creva, pluća i jetre (139-141). Poremećaj intestinalne barijere uzrokuje translokaciju bakterija, produkata bakterija i bioaktivnih supstanci u sistemsku cirkulaciju. Prelazak bakterijskih toksina u krvotok može imati presudnu ulogu u patogenezi sepse (142). Pokazano je da u sepsi dolazi do ubrzane ćelijske smrti simultano sa smanjenjem proliferativne sposobnosti epitela i depresijom ćelijske produkcije (143).

1.3.2 Proinflamatorni odgovor u sepsi

Ravnoteža između proinflamatornih i antiinflamatornih medijatora određena je urođenim imunitetom čime je definisano ponašanje u endotoksemiji. Ukoliko dođe do neravnoteže u sekreciji, pre svega u prokomernoj sekreciji proinflamatornih medijatora, uključujući citokine, faktor aktivacije trombocita (engl. *Platelet-activating factor-PAF*), slobodne kiseonične radikale i azot-oxid (NO), svi oni sinergistički međusobno dovode do hipotenzije, multiple organske disfunkcije i smrti. Napredovanje u sepsi i septičkom šoku podudara se sa povećanjem nivoa cirkulišućih proinflamatornih citokina, kao što su TNF, INF- γ , IL-1 β i IL-6 (144). Studije na životinjskim modelima sugerišu da inhibicija ovih ranih medijatora suzbija razvijanje sepse. Na primer, neutrališuća antitela prema TNF-u (prvi citokin koji je proučen u inflamatornoj kaskadi), kada su data babunima koji su dobili letalne doze žive *Echerihichie coli*, prevenirali su smrtni ishod (145).

TNF je izuzetno važan citokin koji se uglavom luči iz makrofaga ali i niza drugih ćelija, brzo se osloboda u ekseprimentalnim modelima životinja posle bakterijske infekcije (146, 147). Pored toga TNF mogu da sekretuju i mastociti, T i B limfociti, NK ćelije i neke tumorske ćelije. Pod dejstvom TNF-a dolazi do aktivacije sistema koagulacije, promene interakcije leukocita i endotelnih ćelija, pojave povišene telesne temperature i kaheksije usled katabolizma proteina i masti. Dejstvom na fibroblaste, dovodi do proliferacije i produkcije „distalnih“ citokina i prostaglandina, aktivaciju i adheziju za endotel neutrofilnih polimorfonukleara i makrofaga. Svojim dejstvom da utiče na proliferaciju i sinetezu imunoglobulina od strane B limfocita i povećava produkciju IFN- γ i ekspresiju IL-2 od strane T limfocita (148). Takođe davanje TNF-a normalnim životinjama dovodi do razvijanja simptoma septičkog šoka (149, 150). Identifikacija TNF kao esencijalnog medijatora u septičkom šoku izazvanom gram-negativnim bakterijama usmerila je pažnju na razvoj terapije usmerene na endogene toksine.

Pored TNF, za druge proinflamatorne citokine se smatra da utiču na nastanak smrtnog ishoda u endotoksičnom šoku. Jedan od njih je IL-1 (151, 152).

Izvorne ćelije za IL-1 najvećim su delom monociti/makrofagi, zatim ćelije endotela, neutrofilni PMN, limfociti T i B, dendritske, glijalne i NK ćelije, fibroblasti i druge.

Sistemska dejstva IL -1 su mnogobrojna:

- indukcija sinteze „distalnih“ citokina (IL-2, TNF, IL-6) u ćelijama zida krvnih sudova, mezenhimalnim, epitelnim i nervnim ćelijama;
- aktivacija T i B limfocita i NK ćelija;
- indukcija groznice: porast telesne temperature delovanjem na hipotalamus posredstvom prostaglandina;
- mobilizacija PMN iz koštane srži, oslobadjanje proteina akutne faze, hipoferemija i dr.

U lokalna dejstva sekrecije IL-1 spadaju: aktivacija i adhezija neutrofilnih PMN za endotel krvih sudova i oslobađanje prostaglandina E₂ i monokina uz ispoljavanje citotoksičnog efekta, infiltracija okolnog tkiva i edem. (148).

IL-6 deluje proinflamatorno i sinergistički sa IL-1, TNF-om i IFN-alfa, ali ima i antiinflamatorna dejstva. Čelije koje proizvode IL-6 najvećim su delom T limfociti i makrofagi, čelije endotela, čelije glatkog mišićnog tkiva, osteoblasti, fibroblasti (153, 154). IL-6 deluje na aktivirane B limfocite, stimulišući njihovu diferencijaciju u čelije koje sekreciju imunoglobulina. IL-6 je jedan od najvažnijih medijatora groznice (dovodi do porasta telesne temperature) i akutne faze imunološkog odgovora.

Leukemija-inhibitorni faktor (LIF) (155, 156), INF- γ (157, 158) i faktor inhibicije migracije makrofaga (MIF) (159, 160) svaki od ovih proinflamatornih citokina mogu doprinesti razvoju endotoksemije i septičnog šoka. Svaki od ovih medijatora mogu biti indukovani sekrecijom TNF. Jasno je da je sepsa modulirana interakcijom između ovih i mnogih posrednika.

U toku septičkog šoka dolazi do aktivacije efektorskih i regulatornih T limfocita. Broj T regulatornih čelija u odmaklom toku raste, što se povezuje sa lošom prognozom. Smatra se da je prevaga antiinflamatornog odgovora nad proinflamatornim, uzrok imunodeficijencije i povećane osetljivosti na infekciju (161)

1.3.3 Antiinflamatorni odgovor

Tokom endotoksemije, rani odgovor TNF-a aktivira smrtonosni nishodni patološki odgovor (149). Endotoksin, takođe, aktivira antiinflamatorne mehanizme i/ili suprimira potencijalno štetne proinflamatorne citokine. Na primer, nakon LPS, stimulacija monocita dovodi do lokalne kumulacije prostaglandina E₂ (PGE₂), koji inhibira sintezu proinflamatornih citokina (162). Drugi lokalni mehanizam se ostvaruje pomoću spermina, rasprostranjenog molekula koji se akumulira na mestu infekcije ili povrede i koji posttranskripciono inhibira oslobađanje više proinflamatornih citokina: TNF, IL-1 β , makrofagni inflamatorni protein 1 α (MIP1 α) i MIP-1 β iz makrofaga i monocita (163-166). TGF- β je potentni inhibitor monocitne aktivnosti (167). Značajno mesto u imunskom odgovoru predstavlja i monocitna energija koja se ogleda u oslabljenoj produkciji inflamatornih citokina (TNF i IL-1) kao odgovor na prisustvo bakterija i oslabljenoj fagocitnoj aktivnosti kao i sposobnosti antigen prezentacije (168-170). Oslabljena sposobnost prezentacije antigena, podrazumeva deficit ekspresije HLA-D na površini monocita. Indikativno je da proces apoptoze može imati udela u moćnoj deaktivaciji s obzirom da je kod septičnih bolesnika primećena povećana apoptoza čelija (171). Takođe, ekspresija

receptora odgovornih za prepoznavanje patogena (TLR) je deficitarna, što objašnjava insuficijenciju signalnog puta preko monocita (172, 173). Pokazano je da je IL-10 najpotentniji deaktivator monocita (174).

IL-10 je pleotropni citokin sa pretežno antiinflamatornim dejstvom. Sinteza se odigrava u aktiviranim monocitima/makrofagima, mastocitima, B limfocitima. Najznačajniji efekti su smanjenje efekta inflamatornih citokina kao što su TNF, IL-1 i nekih hemokina na antigen prezentujuće ćelije, i inhibišuće delovanje na aktivaciju T limfocita posredovanu IL-12. Pored toga delovanje IL-10 na NK ćelije smanjuje njihovu aktivaciju posle stimulacije pomoću IL-2 (148).

Novija istraživanja su pokazala da, centralni nervni sistem može direktno i brzo da smanji produkciju TNF izazavanu endotoksinom, direktnom stimulacijom preko nerva vagusa na makrofage. Ovaj efekat se ostvaruje preko acetil-holina, glavnog transmitera, koji se luči na vlaknima nerva vagusa i stimulacije holinergičkih receptora na makrofagima (175). Na osnovu gore navedenih činjenica, lučenje antiinflamatornih i proinflamatornih citokina koji čine tzv. "citokinsku oluju" u toku sepse, možemo konstatovati da je regulisano i nervnim i humoralnim mehanizmima.

1.4 SISTEM KOAGULACIJE U SEPSI

Važan deo patogeneze teške sepse, podrazumeva prekomerno aktiviranje sistema koagulacije, što može dovesti do tromboze mikrocirkulacije i razvijanja diseminovane intravaskularne koagulopatije (DIK) (92). Stepem poremećene ravnoteže koagulacije i fibrinolize može varirati od neznatnog smanjenja broja trombocita i subklinički produženog vremena koagulacije, do fulminantne forme DIK. Teška krvarenja se javljaju kod manjeg broja pacijenata sa DIK, češća je pojava organiskih oštećenja (176). Naime, nalazi na autopsiji kod bolesnika sa DIK dokazali su uporednu pojavu difuznih krvarenja u različitim tkivima sa prisutnom hemoragičnom nekrozom. Prisutna hemoragična nekroza i ishemija povezuju se sa pojavom mikrotromba u malim krvnim sudovima i tromboze srednjih i većih krvnih sudova. Upravo, prisustvo tromboze smatra se odgovornom za kliničku disfunkciju oštećenih organa (177). U eksperimentalnim studijama pokazano je da bakterijemija i endotoksemija uzrokuju intravaskularno, ali i ekstravaskularno deponovanje fibrina (bubrezi, jetra, pluća, mozak). Korelacija hemostatskih defekata na različitim nivoima može da utiče na smanjenje mortaliteta (178). Dokazano je takođe da DIC može biti nezavisan

prediktor mortaliteta kod pacijenata sa sepsom (179). Eksperimentalne studije su pokazale da se u vreme maksimalne koagulacione aktivnosti fibrinolitički sistem nalazi pod supresijom (180). Takođe je evidentno da su svi važni antikoagulantni putevi ugroženi kod pacijenata sa DIK (180). Pored toga se u sepsi aktivira i sistem komplementa (181). Vrednosti aktivirane komponente C5a su više kod bolesnika sa lošijom prognozom i u težim formama sepse (182). Brojni su pokušaji ispitivanja inhibicije aktivacije komplementa u samom početku, odnosno na nivou C1 komponente. C1 inhibitor je pokazao efekat na inhibiciju C1 komponente klasičnog puta aktivacije, ali i inhibitornu sposobnost na nivou XII faktora koagulacije i prekalikreina. Takođe, C1 inhibitor suprimira oslobađanje proinflamatornih citokina TNF i IL-1 β (183).

Aktivirani protein C, inaktiviše koagulacioni faktor Va, VIIIa i neutrališe efekte plazminogen aktivatora inhibitor 1 (PAI-1) (184-186). Pored svojih antitrombotičkih i profibrinolitičkih svojstava, aktivirani C protein je sposoban da direktnom antiinflamatornom aktivnošću smanji sintezu citokina (TNF i MIF) i time inhibira adheziju leukocita na endotel krvnih sudova (186, 187). Kao posledica, ovim mehanizmima aktivirani C protein značajno redukuje proces mikrovaskularne tromboze i endotelne disfunkcije (188). Takođe, dovodi do poremećaja funkcije CD-14+ monocita, tako što blokira Ca²⁺ pumpu, a samim tim i njegovog odgovora na stimulaciju endotoksinom (189). Pored toga, aktivirani protein C se vezuje za protein C mononuklearne receptore i na taj način blokira sintezu TNF (179). Takođe se konstatuje nishodna regulacija inflamatornog odgovora endotelnih ćelija nakon vezivanja aktiviranog proteina C za receptore (189). Teška redukcija protein C aktivnosti prati DIK i tešku formu septičkog sindroma (185, 190, 191). Nivo cirkulišućeg C proteina i proteina S je snižen kao rezultat povećane potrošnje. Cirkulišući citokini smanjuju aktivnost trombomodulina i endotelnih protein C receptora na endotelu i na taj način smanjuju aktivaciju C proteina (192).

Uloga trombocita u patogenezi sepse i do danas nije jasno definisana. Ono što se zna, jeste to, da u sepsi postoji trombocitopenija, broj trombocita je snižen za 35-40%. (193, 194). Vrednosti broja trombocita padaju prva četiri dana od prijema u jedinicu intenzivnog lečenja (195). Težina sepse korelira sa padom broja trombocita (196). U uslovima inflamacijom indukovane koagulacije, trombociti mogu biti aktivirani

neposredno endotoksinom (197) ili od strane proinflamatornih medijatora kao što je PAF (198).

1.5 MARKERI INFLAMACIJE U SEPSI

Sekundarni peritonitis je esencijalno hirurško stanje koje iziskuje neodložno operativno lečenje, međutim postojeća ili novonastala sepsa nastavlja da bude glavni problem u postoperativnom toku. Incidenca septičnih komplikacija zavisi prvenstveno od prirode patološkog supstrata, vrste i broja hirurških intervencija, kvaliteta hirurškog rada i najzad faktora rizika od kojih je jedan komorbiditet. Dobro je poznato da pravovremena reintervencija kod dokazanih septičnih abdominalnih žarišta značajno doprinosi povećanom preživljavanju. Ipak, ponovljene ili čak nepotrebne hirurške procedure su dodatni faktor rizika za pacijente i mogu dodatno povećati morbiditet. Suočen sa ovom kliničkom dilemom javlja se veliki interes za traženjem optimalnog dijagnostičkog metoda ili markera za rano, neinvazivno i pouzdano dijagnostikovanje abdominalnih infekcija i sepse (5).

1.5.1 Proteini akutne faze

Proteini akutne faze koji su značajni u dijagnostici sistemskog odgovora sintetišu hepatociti jetre. S obzirom na različite induktivne mehanizme, naznačene su dve grupe proteina. U prvu grupu spadaju C-reaktivni protein (CRP) i lipopolisaharid vezujući protein (LBP). Stimulacija hepatocita od strane IL-1 i IL-6 odgovorna je za njihovu produkciju. Drugu grupu čine antiproteaze, alfa 2 makroglobulin i fibrinogen. Indukcija njihove sinteze zavisi isključivo od IL-6 (199, 200).

Lipopolisaharid vezujući prtein (58 kDa) ima ulogu u podizanju senzitivnosti monocita i granulocita prema lipolisaharidnom ostatku mikroorganizama. Ubrzava vezivanje LPS za CD14 monocitima i granulocitima (201, 202). Takođe je dokazano postojanje slobodnih CD14 proteinskih molekula koji cirkulišu u plazmi i pomoću kojih LPS može aktivirati ćelije koje nemaju prezentaciju CD14 na površinske membrane kao što su endotelne i epitelne ćelije (203). LBP nije specifičan marker akutne faze imunog odgovora i ne može se koristiti kao dijagnostički parametar u diferencijaciji infektivne i neinfektivne etiologije SIRS-a. Takođe trend promena koncentracija LBP-a u plazmi je kod pojedinačno posmatranog bolesnika varijabilan (204).

1.5.1.1 C-reaktivni protein

C-reaktivni protein (CRP) prvi su detektovali još 1930-godine Tillet i Frances kada su otkrili supstancu u serumu bolesnika sa znacima pneumonije zaraženih pneumokokom, koja je formirala talog sa polisaharidom *C. S. pneumoniae* (205). Daljim istraživanjem nađeno je da ova reakcija nije jedinstvena samo za pneumokoknu pneumoniju već da se može pronaći i kod drugih akutnih infekcija. Ovo su rani dokazi o hemijskom odgovoru organizma inflamatornom reakcijom što je dovelo do definisanja i drugih proteina inflamacije nazvanih "proteinima akutne faze" (206, 207). Poput mnogih proteina akutne faze, CRP je prisutan u serumu zdravih ljudi, ali se brzo i dramatično povećava kao odgovor na infekciju ili u inflamatornim uslovima (208, 209). Od otkrića, CRP je proučavan kod vidljive inflamacije, kao marker aktivnosti bolesti i kao dijagnostičko sredstvo (210). Strukturni homolozi CRP-a postoje i kod nekih beskičmenjaka i ta svojevrsna filogenetska konzerviranost merena milionima godina ukazuje da je tokom evolucije CRP bio značajan za preživljavanje (211).

C-reaktivni protein se sintetiše u hepatocitima. On je pentamerni protein koji se sastoji od pet nekovalentno vezanih identično jednakih subjedica sa ukupnom molekularnom težinom od oko 118,00 daltona. Kao odgovor na infekciju ili inficirano tkivo, sinteza CRP-a je stimulirana citokinima pre svega TNF, IL-1 i IL-6 (208, 212). Sa druge strane, aktivnost CRP-a može ukazati na potencijalnu ulogu u kontroli akutne inflamacije vršeći suspenziju neutrofilne funkcije a takođe stimuliše monocite na produkciju antagosta IL-1 i IL-1 β (213).

CRP je prisutan i u serumu zdravih osoba ali je nivo obično manji od 10mg/l, međutim u stanjima bolesti nivo se povećava u prvi 6-8 sati i dostiže vrhunac od 350 do 400mg/l posle približno 48 sati (208, 210, 214). Kad se nađe u tkivu, CRP se kalcijum-zavisno vezuje za fosfatidilholin, kao što je lecitin, lizolecitin i sfingomijelin kao i za polisaharide i to peptopolisaharide koji su prisutni na bakterijama, parazitima i virusima (209). Funkcionalna osobina CRP-a jeste sposobnost da aktivira komplement putem klasičnog puta aktivacije i sposobnost da modulira funkciju fagocitnih ćelija. I ako tačna funkcija CRP-a *in vivo* nije poznata, ova osobina sugerira da ima ulogu u opsonizaciji infektivnog agensa i oštećenih ćelija (208).

Nakon inflamacije ili uništenja tkiva, nivo CRP-a ubrzano opada sa poluživotom eliminacije koja je procenjena na 4-9 sati. Ovaj brzi antiinflamatorni pad, čini ga korisnim kao marker aktivnosti bolesti (214). Za razliku od brzine sedimentacije eritrocita, CRP brže raste i dostiže svoj pik ranije u odgovoru na inflamatorni stimulus. Takođe se mnogo brže vraća na normalne vrednosti nakon rezolucije stimulusa dok se vrednost sedimentacije eritrocita vraća u normalne vrednosti za nekoliko nedelja uprkos kliničkom poboljšanju. Na nivo CRP-a ne utiče anemija, policitemija, nivo proteina, oblik eritrocita, starost bolesnika kao i pol. Pošto je utvrđeno da ovi faktori utiču na brzinu sedimentacije, možemo zaključiti da je CRP bolji test za monitoring kod akutne inflamacije i oštećenja tkiva (215-217).

1.5.1.2 Serum amiloid A

Serum amiloid A (SAA) je protein akutne faze kod većine kičmenjaka (218). Stimulisanjem makrofaga/monocita da oslobode kasne proinflamatorne medijatore, rani citokini takođe stimulišu hepatocite da izluče proteine akutne faze koji na sličan način učestvuju u regulisanju zapaljenskih odgovora. Na primer, TNF, IL-1 β i IFN indukuju ekspresiju SAA u hepatocitima (219) i makrofagima/monocitima (220), što dovodi do sledstvene sekrecije SAA nakon cepanja na signalnu sekvencu. Tokom zapaljenja, SAA postaje deo lipoprotein-visoke gustine (engl. *high density lipoprotein*, HDL), gde zamenjuje apolipoprotein A1 (APOA1) (221).

Trenutna nomenklatura se zasniva na SAA genima kod ljudi i miševa (222). Familiju SAA kod čoveka čine najrasprostranjeniji SAA1 i druge izoforme-SAA, SAA2 α , SAA2 β i SAA3. Članovi SAA familije imaju više od 95 do 98% podudarnosti aminokiselina unutar vrste i više od 75% homologih sekvenci između čoveka i glodara, što ukazuje na visok stepen evolutivnog očuvanja SAA (223).

Tokom endotoksemije, kod čoveka je konzistentno nađeno da je jedan od visoko i brzo indukovanih proteina akutne faze, čiji je cirkulišući nivo značajno povišen (do 1000 puta) unutar 16-14 sati kao rezultat *de novo* ekspresije ranih citokina koji su induktori naknadne sinteze i sekrecije SAA (224, 225). Klinički, SAA se pojavljuju kao biomarker kod kardiovaskularnih poremećaja (226), ulceroznog kolitisa (227) i sepse (228). Iako nije definisana precizna uloga SAA u odbrani domaćina tokom upale, mnoge potencijalno klinički važne funkcije su predložene za individualne članove SAA porodice. Ovo podrazumeva uključivanje u metabolizam/transport lipida, indukciju

ekstracelularnog-matriks-degradiranja enzima, i hemotaktično angažovanje inflamatornih ćelija na mestima inflamacije (218).

Ekstraćelijski signal, SAA ostvaruje putem porodice receptora kao što su RAGE, (229) TLR2 (230, 231) i TLR4 (232) aktivirajući NLRP3 inflamazoma (233) i sintezu različitih citokina i hemokina (234, 235). Farmakološka inhibicija aktivirane dvolančane RNK protein kinaze, inhibira SAA indukovano oslobađanje HMGB1 i administraciju SAA-neutrališućih IgG te značajno doprinosi preživljavanju životinja u sepsi (223).

1.5.2 Prokalcitonin

Početak devedesetih objavljena su prva istraživanja koja su ukazala da postoji veza između nivoa prokalcitonina u humanom serumu i prisustva sistemskog inflamatornog odgovora na infekciju (236). Prokalcitonin je dokazan kao prohormon kalcitonina, proteinski molekul koji sadrži 116 aminokiselina čija sekvenca odgovara hormonu kalcitoninu (32 aminokiseline) (237). U fiziološkim uslovima kalcitonin se sintetise u C-ćelijama štitne žlezde, specifičnim intraćelijskim proteolitičkim cepanjem prokalcitoninskog lanca. Štitasta mRNK kodira sintezu hormona kalcitonina dok se u moždanim ćelijama stvaraju novi neuropeptidi koji se nazivaju kalcitonin gen povezani peptid (CGRP) (238). Transkripcija i aktivacija iRNK dovodi do sinteze preprokalcitonina (141 aminokiselina) koji sadrži četiri segmenta: Signalni segment, N-terminalni segment, kalcitonin i C-terminalni region (katalcolcin) (239).

U uslovima teške bakterijske infekcije i sepse dokazane su visoke vrednosti prokalcitonina u serumu bolesnika (239). Studije su pokazale da makrofagi i monociti aktivirani imunomodulatornim medijatorima, predstavljaju izvor sepse (240-242). Smatra se da aktivacija monocita nakon koje sledi agregacija, predstavlja prvu fazu oslobađanja prokalcitonina. Naime, aktivirani monociti preko inflamatornih medijatora (IL-1 β i TNF) aktiviraju humane adipocite koji su odgovorni za oslobađanje prokalcitonina (243). Smatra se da parenhimske ćelije (adipociti) predstavljaju izvor visoke koncentracije prokalcitonina u ovim stanjima. Leukociti i neurokrine ćelije pluća i intestinalnih organa, takođe mogu biti izvor prokalcitonina (244, 245). U zavisnosti od toksinskog stimulusa, nakon 2-6 sati dolazi do porasta koncentracije prokalcitonina u plazmi (236). Fluktuacije koncentracije u plazmi ne razlikuju se značajno kod bolesnika sa bubrežnom insuficijencijom u odnosu na

bolesnike sa normalnom bubrežnom funkcijom, tj. bubrežna funkcija nema uticaja na klirens prokalcitonina u plazmi (246).

Bakterijski endo i egzotoksini jesu potentni i značajni, ali nisu i jedini induktori sinteze prokalcitonina. Sinteza prokalcitonina je u korelaciji sa inflamatornim odgovorom i povezana je sa indukcijom proinflamatornih citokina (247). Citokini (IL-2 i IL-6) i TNF indukuju povišene vrednosti prokalcitonina i u odsustvu infekcije (248). Na to su ukazale studije rađene na bolesnicima sa opekotinama (249, 250), nakon trauma (251). Povišene vrednosti su dokazane i u studiji u kojoj su ispitivani bolesnici u uslovima sistemskog šoka bez dokazanog infektivnog fokusa (252). I nakon elektivnih operacija bez znakova infekcije i kontaminacije nivo prokalcitonina je trazitorno umereno povišen (253, 254). Potvrdu da citokini igraju značajnu ulogu u sintezi prokalcitonina pokazala je studija u kojoj je dokazano da iRNK za prokalcitonin zavisi, takođe od inflamatornog odgovora (242).

Bakterijski toksini su najpotentniji ali ne i jedini stimulus za oslobađanje prokalcitonina. Smatra se da je oslobađanje i dokazivanje intaktnog prokalcitonina i njegovih fragmenata u uslovima aktiviranog imunog odgovora pod direktnom kontrolom endotoksina i citokina, tačnije endotoksin je odgovoran za značajnu amplifikaciju prokalcitoninske aktivnosti koja je već stimulisana od strane citokina (244).

Oslobađanje prokalcitonina u primarno nekontaminiranim uslovima (opekotine, politrauma) kada infekcija nije primarni induktor citokinske aktivnosti, je pod kontrolom citokina. Smatra se da su patogeni i delovi molekula koje imuni sistem prepoznaje (PAMP), dodatni induktor koji pojačava prokalcitoninski odgovor. Prisustvo sekundarne infekcije nastaje usled poremećaja intestinalne barijere odnosno insuficijencije i regionalnog poremećaja perfuzije (bakterijske translokacije). Koncentracije prokalcitonina su visoke nakon pojave infekcije u opisanim stanjima (250, 251).

1.5.3 HMGB1- High mobility group box 1

1.5.3.1.1 Struktura HMGB1

Pre više od četrdeset godina (1973), otkrivena je grupa proteina koja je zbog svoje mobilnosti u elektroforetskim poliakrilnim gelovima, nazvana proteini visoke

mobilnosti (engl. *high mobility group protein-HMG*)(255). HMGB1 predstavlja endogeni signalni molekul poznat kao „alarmin“-molekul koji se oslobađa tokom nekroze ćelija, ali ima i potencijala za aktivnu sekreciju imunih ćelija, i značaj u održavanju homeostaze (256). Postoje tri porodice HMG proteina- HMGA, HMGB i HMGN. HMGB porodica se sastoji od tri člana- HMGB1, HMGB2 i HMGB3 i sva tri proteina imaju 80% identičnih aminokiselina (257). Ovu grupu nehistskih, proteina udruženih s hromatinom, karakteriše uključivanje u transkripciju DNK (257).

HMGB1 su primarno unutarćelijski proteini koji se u uslovima oštećenja ćelija i nekroze mogu naći u ekstraćelijskom miljeu gde deluju kao „nekrotični markeri“ za imuni sistem, zbog čega su označeni i kao alarmini. U ekstraćelijsku sredinu se oslobadjaju „pasivnom sekrecijom“ iz oštećenih ili nekrotičnih ćelija, ili „aktivnom sekrecijom“ od strane imunih ćelija ili ćelija izloženih stresu. Zbog svojih ekstraćelijskih uloga, HMGB1 je u fokusu kliničkih istraživanja za koje ovaj protein predstavlja važan medijator sistemske inflamacije, citokin sposoban da orkestrira regulaciju procesa i inflamacije i tkivne regeneracije. Kao imunostimulatorni protein, i protein koji može da indukuje autoimuni odgovor, ukoliko se sekretuje hronično, HMGB1 se smatra terapijskom metom u eksperimentalnim modelima infektivnih inflamatornih bolesti i bolesti kao što su ishemija, akutni respiratorni sindrom, sepsa, reumatoidni artritis i kancer (256).

HMGB1 je veoma očuvan kroz evoluciju i istovetan je kod 99% sisara. Od njegovih 215 aminokiselina (AK) samo su dva ostatka supstituisana kod glodara i ljudi. HMGB1 ima tri funkcionalna domena: dva bazna, A-box (AK 1-79) i B-box (AK 89-163) i karboksiterminalni C domen kiselog karaktera sa velikim sadržajem ostataka asparaginske i glutaminske kiseline (89-163). (Fig. 1.) (258-261).

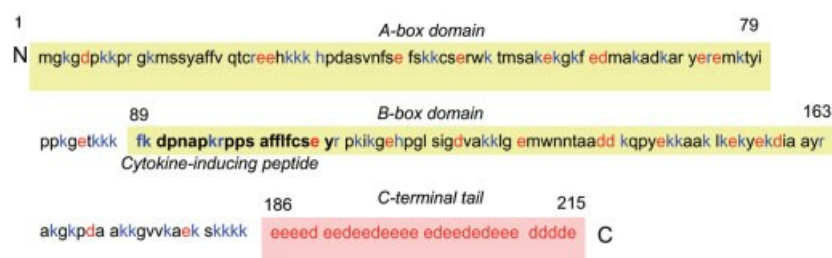


Fig. 1. Šematski prikaz HMGB1 molekula. DNK vezujući domeni A-box i B-box-su označeni sa žutom bojom. Kiseli C - terminalni rep je označen sa roze bojom. Kisele amino kiseline su označene crvenim slovima, osnovne aminokiseline su označene sa plavim slovima. Najkraći peptid sa zatamnjanim slovima označava strukturnu osnovu za citokine.

Deo molekula ekstracelularno oslododjenog HMGB1 u B domenu, koji indukuje citokine obuhvata prvih 20 aminokiselina. Njih čine aminokiseline (89-108) i one utiču na sintezu TNF, IL-1 i IL-6 (262).

HMGB1 se dominantno nalazi u jedru ćelija, ali je detektovan i van jedra u zavisnosti od vrste tkiva. Tako u ćelijama testisa i limfoidnom tkivu ima visok nivo i u jedru i citoplazmi, dok se utkivu mozga i jetre nalaze niski nivoi, i to uglavom u citoplazmi (263), na neuroblastima se nalazi na ćelijskoj membrani (264).

HMGB1 se oslobađa ekstracelularno kao medijator zapaljenja na dva načina: aktivnim izlučivanjem iz zapaljenskih ćelija ili pasivno oslobađanjem iz nekrotičinih ćelija.

Aktivna sekrecija HMGB1 iz makrofaga stimulisanim sa TNF je proučavana u modelu endotoksinom indukovane sistemske inflamacije (265). Od tada je pokazano da nekoliko proinflamatornih stimulusa indukuje aktivno otpuštanje HMGB1 iz makrofaga i monocita. U poređenu sa proizvodnjom i sekrecijom TNF i IL-1 u aktiviranim makrofagima/mocitima, oslobađanje HMGB1 je odloženo, sa još većim zaostajanjem od 12 do 18 sati (266). Početna faza sekrecije HMGB1 zahteva inflamatorni signal koji potiče od LPS, IL-1 ili TNF (265). Naime LPS dovodi do acetilacije određenih lizinzkih ostataka, što uzrokuje da HMGB1 ostane u citoplazmi i blokira vraćanje i ulazak u jedro, (267) dok će TNF indukovati sekreciju fosforilacijom

(268). Citoplazmatski HMGB1 će potom biti preuzet od sekretornih lizozoma koji se mogu fuzionisati sa ćelijskom membranom i sekretovati eksraćelijski (266). Većina HMGB1 izlučena tokom prvih 16 sati potiče iz jedra ćelije. Tek nakon tog perioda započinjena ćelijska sinteza (265).

Pasivno oslobađanje HMGB1 iz nekrotičnih ćelija je dokazano tokom studije sprovedene od strane Scaffilda i saradnika 2002. godine. Detektovano je postojanje HMGB1 u nekrotičnim ćelijama nakon ponovljenog zamrzavanja. Naime, dodavanjem nekrotičnih fibroblasta kulturama makrofaga, indukovana je izrazita sinteza TNF-a, a nasuprot tome dodavanje nekrotičnih fibroblasta koji su bili deficitarni HMGB1 genima doveli su do niske produkcije TNF-a u makrofagima, što je ukazalo da je HMGB1 vodeći faktor u zapaljenskom procesu izazvanom nekrozom ćelija, i zadovoljava kriterijum endogenog zapaljenskog signala (269).

Činjenica da postoje dva mehanizma oslobađanja ovog proteina ukazuje na značaj HMGB1 kao endogenog medijatora u inflamaciji i pokazuje da HMGB1 može da deluje i kao rani inicijator zapaljenja (pasivnim oslobađanjem iz nekrotičnih ćelija) i kao generator zapaljenske reakcije (aktivno-sekrecijom iz makrofaga). Takođe je važno imati na umu da se pasivno oslobođeni HMGB1 iz nekrotičnih ćelija i aktivno izlučeni HMGB1 iz makrofaga, hemijski razlikuju, jer je aktivno izlučeni molekul acetilovan (267). Oslobođeni HMGB1 se vezuje za RAGE receptor (engl. *Receptor for advanced glycation endproducts*, RAGE) na dozno zavisani način i to je prvi receptor za koji se otkrilo da vezuje HMGB1. RAGE su transmembranski receptori kojih u normalnom tkivu ima malo ali su inducibilni. Interakcija između HMGB1 i RAGE može da se inhibira dodavanjem rastvorljivog RAGE ili anti-RAGE antitela (270). RAGE su eksprimirani na mononuklearnim fagocitima i vaskularnim glatko-mišićnim ćelijama (270-272). Signal sa RAGE se ostvaruje preko, ne samo NF- κ B signalnim putem, već i mitogen-aktiviranom protein kinazom (MAPK) (273). Pored RAGE, pokazalo se da HMGB1 prepoznaju i TLR (274). U Tabeli 4. je prikazana ekstraćelijska uloga HMGB1 u inflamaciji.

Tabela 4. Ekstraćelijska uloga HMGB1 u inflamaciji

Agenti	Biološki efekti
HMGB1	<p>Ćelijske kulture</p> <ul style="list-style-type: none"> • Podstiče oslobađanje TNF-a i drugih citokina iz makrofaga/monocita (275, 276) • Indukuje hemotaksu i reorganizaciju citoskeleta ćelija glatkih mišića (273) • Povećava propustljivost Caco-2 monoslojeva (277) • Indukuje ekspresiju RAGE receptora i adheziju molekula (ICAM-1, VCAM-1) na humanim endotelnim ćelijama (278) • Stimuliše oslobađanje TNF-a i IL-8 na endotelnim ćelijama (278) • Aktivira mitogen-aktivirani protein kinazu (kao što je p38 i ERK1/2) fosfatidilinozitol 3-kinaza/akt i poboljšava ekspresiju proinflamatornih citokina kod humanih neutrofila (279) <p>Životinje</p> <ul style="list-style-type: none"> • Intratrachealna injekcija izaziva akutno oštećenje pluća kod LPS-rezistentnih C3H/HeJ miševa (280) • Intraperitonealna injekcija je izazivala smrt u obe grupe i LPS-senzitivnih (Balb/C i C3H/HeN) i LPS-rezistentnih (C3H/HeJ) miševa (265, 281) • Peri-išijadično davanje je dovelo do smanjenja smrtnosti i obostrano alodiniju (smanjeni mehanički prag na toplotnu stimulaciju) (282) • Intracerebralna aplikacija dovodi do anoreksije i promene ukusa (283)
Anti-HMGB1 antitela	<p>Životinje</p> <ul style="list-style-type: none"> • Zaštita od LPS-indukovane akutne povrede pluća (280) • Zaštita od LPS-indukovane hipofagije (283) • Zaštita od smrtnosti u životinjskim modelima sa endotoksemijom i sepsom (265, 281) • Značajna zaštita u životinjskom modelu kolagen-indukovanog artritisa (284) <p>Ljudi</p> <ul style="list-style-type: none"> • Terapijska monoklonalna anti-HMGB1 antitela se trenutno proučavaju u mnogim kliničkim istraživanjima (285)
Inhibitori	<ul style="list-style-type: none"> • Etil piruvat inhibira oslobađanje HMGB1 i smanjuje smrtnost kod životinja od endotoksemije i sepse (281)
Antagonisti	<ul style="list-style-type: none"> • Odložena primena HMGB1 A domen štiti od smrtnog ishoda na životinjskim modelima od endotoksemije i sepse (281) • Sistemska primena HMGB1 A domen osigurava zaštitu kod kolagen-indukovanog artritisa (284)

1.5.3.2 HMGB1 kao proinflamatorni medijator

Wang i sar. proučavajući sepsu i endotoksemiju detektovali su HMGB1 i kao citokin (265). Brojni su pokušaji učinjeni u lečenju sepse i izučavanju poznatih citokina, uključujući i TNF. Najveća prepreka u izučavanju TNF i drugih proinflamatornih citokina u lečenju sepse je to, što se većina ovih citokina rano oslobađa tokom septičnog odgovora, obično u roku od jednog časa nakon izloženosti stimulusu. Ovaj brzi kinetički obrazac ne dozvoljava dovoljno vremena za terapijsku intervenciju u

kliničkim uslovima, uprkos uspešnim rezultatima u eksperimentalnim sistemima. Činjenica da smrt može nastupiti dugo nakon što se sistemski nivo proinfalatornih citokina vrati na normalan nivo, naterali su istraživače da sistematski istražuju i neotkrivene medijatore koji se značajni za nastanak sepse (276). Oni su stoga počeli da definišu proteine otpuštene iz aktiviranih makrofaga nakon stimulisanja ćelija sa TNF, IL-1 ili LPS i potom analizirali sekretovane proteine. HMGB1 je detektovan nakon 8 h posle stimulacije sa LPS, sa pikom u lučenju nakon 18 h. Slično tome, kod miševa ubrizgavanjem LPS ili TNF, HMGB1 je bilo moguće detektovati u uzorcima seruma posle 8-32 h. Rekombinantni HMGB1 je bio smrtonosan i za LPS-osetljive i LPS-otporne miševe, kada im je bilo ubrizgano intraperitonealno, što je ukazivalo da efekat nije izazvala LPS kontaminacija. Injekcija toksičnih doza HMGB1, dovodila je do groznice, gubitka na težini, piloerekcije, drhtanja i mikrotromboze u jetri i plućima. Takođe je došlo do porasta nivoa TNF u serumu *in vivo*. Tako je studija pokazala da je HMGB1 veoma potentan citokin i da indukuje proinflamatorni odgovor makrofaga i monocita (276, 279). Stimulacijom makrofaga pomoću HMGB1 dolazi do *de novo* sinteze TNF-a, budući da se, takođe, povećava nivo iRNK. Dodavanje HMGB1 kulturi monocita dovodilo je do njihovog aktiviranja i sinteze TNF-a, IL-1 α , IL-1 β , IL-1ra, IL-6, IL-8, MIP-1 α i MIP- β , ali ne i IL-10 ili IL-12. Zanimljivo, HMGB1-indukovana TNF produkcija je značajno odložena u poređenju sa LPS-indukovanom TNF sintezom. Produkcija TNF izazvana sa HMGB1 je dvofazna: prvi pik je nakon 3 h a drugi pik nakon 8-10 h. Nakon LPS indukovana produkcija TNF dostigla je pik nakon 2 h, i bila praktično nemejljiva nakon 8 h (276). T ćelije stimulisane HMGB1 oslobađaju citokine, dolazi do njihove proliferacije, preživljavanja i Th1 polarizacije (286, 287). Nakon stimulacije neutrofila povećava se interakcija sa MAC-1 i RAGE, čime se aktivira migracija i adhezija netrofila (288).

Dodatno je pokazano da endotelne ćelije mikrovaskulature takođe proizvode proinflamatorne citokine nakon stimulacije sa HMGB1, (278) kao što su TNF, IL-8 i MCP-1 (278, 289).

Na osnovu svih ovih istraživanja zaključeno je da HMGB1 ima veoma značajno mesto kao proinflamatorni medijator, ali i da indukuje sintezu višestrukih proinflamatornih medijatora (290).

1.5.3.3 Regenerativni efekti HMGB1

Pored uloge u zapaljenju, "alarmini" značajno utiču na regeneraciju tkiva (291). Posebno je važno da HMGB1 izaziva migraciju matičnih ćelija prema mestima u kojima se odigrava zapaljenje i na taj način utiče na regeneraciju tkiva (292). Dokazano je da mioblasti migriraju u oštećene regione i regenerišu tkiva stimulacije sa HMGB1 (293, 294). Ovi efekti na pojedinim vrstama ćelija se ogledaju na povećanju regeneracije na nivou tkiva.

HMGB1 stimuliše migraciju vaskularnih glatkih mišića i indukuje reorganizaciju ćelijskog skeleta (273). Kod skeletnih mišića, stimulacijom HMGB1 se povećava miogeneza i angiogeneza (293, 295, 296). Dalja potvrda ovih zaključaka nakon istraživanja dovela je do saznanja da inhibicija HMGB1 signalizacije dovodi do smanjene proliferacije krvnih sudova i regeneracije tkiva, (293) Osim toga, direktno ubrizgavanje egzogenog HMGB1 u tkivo srčanog mišića koje je pretrpelo infarkt, rezultira, kod miševa, povećanjem broja miocita sa strukturalnim ali i funkcionalnim poboljšanjima (297). Pored toga, HMGB1 izaziva migraciju i proliferaciju matičnih ćelija krvnih sudova (mezoangioblasta), što ukazuje na važnu ulogu u regeneraciji tkiva mišića (296), a samim tim promoviše zarastanje rana i tkivnu regeneraciju. Takođe HMGB1 regrutuje neutrofile, monocite i makrofage na mesta zapaljenja kao što je pokazano u modelima akutnog oštećenja pluća (280, 298) i povećava adhezivnost monocita (299).

Baktericidno dejstvo HMGB1- studija je pokazala da HMGB1 dobijen iz tkiva egzokrinih žlezda bez znakova zapaljenja, ispoljava direktna antibakterijska dejstva (300) i ograničava infekciju ili tkivno oštećenje.

Sa druge strane, prekomerno uvećanje nivoa HMGB1 dovodi do nekontrolisanog inflamatornog odgovora, tkivnih oštećenja i organskih disfunkcija. Sepsa je primarno stanje koje karakteriše prisustvo visoke serumske koncentracije HMGB1. Animalni eksperimentalni modeli teške sepse, uključujući i abdominalnu sepsu (265, 281) ukazuju da se, za razliku od „ranih“ proinflamatornih citokina (TNF, IL-1 β) koji se proizvode u prvim minutima nakon stimulacije endotoksinima i koji imaju kratak poluživot u cirkulaciji, HMGB1 pojavljuje tek nakon 8-72 sata, zbog čega je i označen kao „kasni“ inflamatorni medijator. Smrtnost ovih životinja je korelisala sa akumuliranjem HMGB1 proteina u cirkulaciji i bila znatno umanjena sa opadanjem

njegove koncentracije u prisustvu neutrališućih anti-HMGB1 antitela (301). Nekoliko kliničkih studija dodatno je impliciralo ulogu HMGB1 proteina kao kasnog medijatora sepsa (302, 303). Zbog toga se pretpostavlja da bi HMGB1 mogao da bude potentni marker težine patološkog procesa i meta terapijskog tretmana tokom različitih infektivnih i inflamatornih bolesti. Ova pretpostavka ima oslonac i u literaturnim podacima koji se odnose na patološka stanja kod kojih dolazi do poboljšanja kliničke slike sa opadanjem uvećanog nivoa HMGB1 (304). Stoga je opravdanost kliničkih istraživanja vezanih za ekspresiju HMGB1 u različitim patološkim stanjima bazirana na mogućnosti identifikacije HMGB1 proteina kao prognostičkog faktora i otvaranju novog polja terapijskih istraživanja.

1.5.3.4 HMGB1 kao terapijska meta tokom zapaljenja

Sa otkrićem HMGB1 kao potentnog medijatora i njegovo prisustvo izvan ćelija su inicirali istraživanja mogućih korisnih efekata u terapiji pacijenata sa sepsom. Prva prijavljena studija je istraživala poliklonalna antitela usmerena protiv HMGB1 kod zečeva sa indukovanom LPS-sepsom (265). Tretman sa HMGB1 specifičnim poliklonskim antitelima takođe značajno unapređuje ishod bolesti kod zapaljenja pluća indukovano edotoksinom (280). Yang i sar. nakon istraživanja na miševima, kada je peritonitis izazvan cecalnom ligaturom i punkcijom (CLP), pokazali su da se poliklonalna antitela nakon 24 h i dalje efikasno održavaju (281), dok je u prethodnim pokušajima sa sličnim intervencijama sa anti-TNF ili anti-MIF (faktor inhibicije migracije makrofaga) antitelima, imao mnogo kraći terapijski prostor (160, 305). Ovi eksperimentalni rezultati podstiču na dalja istraživanja na polju terapije septičnih bolesnika. (217, 306).

2 CILJEVI

1. Procena prognostičkog značaja određivanja postoperativnog nivoa HMGB1 proteina u serumu pacijenata sa difuznim sekundarnim peritonitisom.
2. Ispitivanje uloge HMGB1 u predikciji mortaliteta u uslovima razvijenog septičnog sindroma.
3. Komparativna analiza kinetike HMGB1 proteina sa drugim serumskim markerima inflamacije – prokalcitoninom, C-reaktivnim proteinom, serum amiloidom A (SAA), u uslovima razvijenog septičnog sindroma.

3 MATERIJAL I METODE

Kohortna studija je izvedena na Klinici za urgentnu hirurgiju Urgentnog Centra Kliničkog centra Srbije i Institutu za biološka istraživanja „Siniša Stanković“ u Beogradu.

3.1 Pacijenti

U studijsku grupu je uključeno 100 pacijenata starosti od 18 do 70 godina života, sa znacima akutnog abdomena usled difuznog sekundarnog peritonitisa različite etiologije:

- a. Zbog patološke perforacije želuca i dvanaestopalačnog creva (duže od 12 časova), žučne kese, slepog creva, tankog i debelog creva.
- b. Usled komplikacija nastalih nakon prethodne elektivne ili hitne operacije.
- c. Zbog razvijanja inflamatornih oboljenja gastrointestinalnog trakta
- d. Usled vaskularnih oboljenja creva

Dijagnoza sepse /SIRS-a, bila je postavljena na osnovu prisustva najmanje dva, od sledećih kliničkih manifestacija: telesna temperatura >38 ili <36 °C; srčana frekvencija >90 /min; broj respiracija >20 /min ili $\text{PaCO}_2 < 4,3$ kPa; broj leukocita >12000 ili <4000 , ili prisustvo $>10\%$ nezrelih neutrofila. Kriterijumi koji su definisali abdominalnu sepsu bili su: definisan abdominalni izvor infekcije sa pozitivnom mikrobiološkom kulturom iz peritonealne duplje.

U okviru studijske grupe, formirane su dve grupe ispitanika: grupa koja je označena **SIRS grupa** i, grupa koja je označena **SEPSA grupa**, postoperativno u zavisnosti od mikrobiološkog nalaza. Bolesnici kod kojih nije dokazano prisustvo abdominalne infekcije (zasejane podloge su ostale sterilne), činili su SIRS grupu. Pacijenti kod kojih je dokazano prisustvo abdominalne infekcije (zasejane podloge-pozitivan mikrobiološki nalaz), svrstani su u SEPSA grupu.

U kontrolnu grupu bilo je uključeno 30 pacijenata, starosti od 18 do 70 godina života, operisanih zbog elektivne preponske kile, a kod kojih nije bila prisutna infekcija i inflamacija.

Isključni kriterijumi u ovoj studiji su bili trudnoća, puerperijum, diabetes mellitus, maligna stanja, pacijenti sa znacima akutnog pankreatitisa, pacijenti kod kojih se primenjuju citostatici ili su na imunosupresivnoj terapiji, pacijenti inficirani B i C hepatitis virusom kao i HIV virusom, pacijenti sa psihozom. Pacijenti kod kojih se sumnjalo na ekstraabdominalno poreklo infekcije, takođe su bili isključeni iz istraživanja.

Difuzni peritonitis je bio definisan prisustvom toksičnog sadržaja u najmanje tri kvadranta trbušne duplje.

Svim pacijentima je preoperativno izračunavan ASA (American Society of Anesthesiologist) skor, dok je prvog postoperativnog dana određivan APACHE II (Acute Physiology And Chronic Health Evaluation II) skor radi stratifikacije stanja i težine fiziološkog odstupanja od normale.

Indikacija za operativno lečenje je bila postavljena na osnovu kliničkog nalaza, laboratorijskih analiza, ultrazvuka (UZ) i native radiografije (RTG) trbuha i eventualno kompjuterizovane tomografije trbuha (CT).

3.2 Hirurške tehnike

Svim pacijentima sa peritonitisom je rađena medijalna laparotomija. Najčešće je izvođena sutura dvanaestopalačnog, tankog creva i debelog creva pojedinačnim šavovima, resekcija želuca i debelog creva. Pored toga rađena je ileostomija i kolostomija, apendektomija, holecistektomija i totalna kolektomija. Svim pacijentima je rađena peritonealna lavaža sa 3-4 l fiziološkog rastora uz plasiranje drenova u oba subfernična prostora, subhepatično i u Duglasov prostor. Svi pacijenti su primarno zatvoreni.

Kod pacijenata sa kilama, rađena je herniektomija sa plastikom ingvinalnog kanala i plastikom po *Linchestain*-u.

3.3 Mikrobiološka analiza

Svim pacijentima je intraoperativno bio uziman uzorak peritonealnog sadržaja, koji je upućivan na standardno mikrobiološko ispitivanje u Mikrobiološku laboratoriju Urgentnog centra Kliničkog centra Srbije u Beogradu.

3.4 Određivanje hematoloških, hemostatskih i biohemijskih parametara iz krvi

Uzorci krvi su uzimani pre hirurške intervencije i, svaki dan nakon hirurške intervencije, sa *Vacutainer*-ima (BD Vacutainer Systems, Franklin Lakes, New Jersey), na EDTA kao antikoagulansom za određivanje krvne slike (Le,Er, HGB, HCT, Tr), EDTA citratom kao antikoagulansom za određivanje parametara hemostaze (PT, aPTT, fibrinogen, antithrombin III, plasminogen, D-dimer). Određivanje broja krvnih ćelija je određivano pomoću HmXanalyser (Beckman Coulter, USA) uz korišćenje komercijalnih reagenasa. Komercijalni testovi (Siemens Healthcare GmbH, Marburg, Germany) su korišćeni za određivanje parametara hemostaze uz pomoć BCS XP analizatora koagulacije (Siemens Healthcare GmbH, Marburg, Germany) . Uzorci krvi za rutinsko biohemijsko ispitivanje (glukoza, urea, kreatinin, bilirubin, ukupni proteini, albumini, Na⁺, K⁺, Cl⁻, Ca²⁺, AST,ALT, alkalna fosfataza, alfa amilaza) dok su uzorci za određivanje C-reaktivnog proteina, Serum amyloid A i Prokalcitonin-a ostavljeni na sobnoj temperaturi 30 minuta da koagulišu a zatim su centrifugirani 2680 g 10 minuta za dobijanje serumskih uzoraka. Serumski rutinski biohemijski parametri, C-reaktivni protein, Prokalcitonin su određivani uz pomoć *Roche Cobas 6000* automatskog analizatora (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany). Vrednosti serum amyloid A su određivane uz pomoć pojačanog imunofelometrijskog testa (Siemens Healthcare GmbH, Germany) on BNII System (Siemens Healthcare GmbH, Germany). Takođe su određivani parametri na osnovu kojih su pacijenti bili skorovani -APACHE II skor.

3.5 Western blot

Western blot za određivanje HMGB1 u serumu rađen je tako što je 1µL serumskih proteina razdvažen pomoću SDS-PAGE na 12% poliakrilamidnom gelu. Nakon transfera proteina na *polyvinylidene difluoride* (PVDF) membranu (Hybond-P, RPN303F, Amersham Pharmacia Biotech), membrane su inkubirane sa primarnim anti HMGB1 antitelima (K-12, Santa Cruz Biotechnology – razblaženje 1:750) i potom, sekundarnim peroksidazom konjugovanim antitelom (sc-2379; Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA). Vizuelizacija nagrađenih antigen-antitelo kompleksa urađena je bojenjem luminol reagensom (*Western Blotting Chemiluminescence Luminol Reagen*, sc-2048, Santa Cruz Biotechnology) i stavljanjem

pod film (Hiperfilm ECL, RPN 3103 K, Santa Cruz Biotechnology) prema uputstvu proizvođača. Kvantifikacija HMGB 1 je učinjena u TotalLab v1.1 (Phoretix)(307).

3.6 Statistička analiza

Obrađeni su demografski, etiopatološki, laboratorijski, mikrobiološki, klinički i podaci o hirurškim intervencijama kao i postoperativni morbiditet.

Od dobijenih podataka formirana je baza podataka u EXCEL 7 u kojoj su prikazane numeričke vrednosti praćenih obeležja u okviru posmatranih grupa.

Normalnost raspodele je proveravana Kolmogorov-Smirnov-ljevim testom. Normalno distribuirani podaci su prikazani kao srednje vrednosti za grupu sa standardnom devijacijom (SD), a ostali kao medijana uz interkvartilni opseg (IQR). Statistička značajnost inicijalnih razlika kod pacijenata sa kilama, sepsom i SIRS-om je evaluirana Hi-kvadrat testom, Fischer-ovim testom, t-testom i Wilcoxon-ovim testom za nezavisne uzorke. Obrazac promene u vremenu odabranih serumskih parametara je analiziran linearnim modelom mešanih efekata, pri čemu su neparametarski podaci prethodno log-transformisani. P vrednosti za višestruka poređenja su korigovane po Bonfferoni-ju i ako su bile manje od 0,05 smatrane su statistički značajnim. Statistička analiza i grafički prikazi su urađeni u R 3.1.0. (308).

4 REZULTATI

4.1 Opšti demografski podaci

U ovo prospektivno istraživanje uključeno je 130 pacijenata, od kojih su 100 pacijenata bili pacijenti sa sekundarnim peritonitisom, podeljeni u dve grupe: u grupi SIRS bilo je 45 pacijenata, dok je u grupi SEPSA bilo 55 pacijenata; u kontrolnoj grupi, koju su činili pacijenti sa preponskim kilama bilo je 30 pacijenata. Prosečna starost, u grupi SIRS iznosila je $45,91 \pm 13,1$, u grupi SEPSA iznosila je $48,8 \pm 13,3$, dok je u grupi sa kilama iznosila $46,23 \pm 15,7$. U obe ispitivane grupe, dve trećine su bili pacijenti muškog pola, dok su u kontrolnoj grupi bili sve muškaraci. Prosečno lečenje obe ispitivane grupe, trajalo je oko sedam dana, dok su u kontrolnoj grupi pacijenti lečeni dva dana. U našoj studiji su svi ispitanici preživeli. Trećina pacijenata u sve tri grupe je imala arterijsku hipertenziju. Preoperativno je svim pacijentima izračunavan ASA skor, koji je u obe ispitivane grupe iznosio 2 dok je u kontrolnoj grupi iznosio 1. APACHE II skor izračunavan prvog postoperativnog dana bio je 7 u SIRS grupi, dok je u grupi SEPSA bio 8, a u kontrolnoj grupi je bio 4 (Tabela 5).

Tabela 5. Demografski podaci uz ASA i APACHE II skorove na prijemu

	SEPSA n=55	SIRS n=45	SIRS vs. SEPSA*	kontrolna grupa n= 30	sekundarni peritonitis vs. kontrolna grupa
	sekundarni peritonitis n=100				
starost (sv \pm SD)	48,8 \pm 13,3	45,9 \pm 13,1	nz	46,2 \pm 15,7	nz
Pol (muški)	69,1%	71,1%	nz	100%	nz
Dani hospitalizacije	7,1 \pm 1,9	7,2 \pm 1,8	nz	2,0 \pm 0,0	<0,001
Hronične bolesti	30,9%	28,9%	nz	33,3%	nz
ASA medijana (IQR)	2 (0)	2 (0)	nz	1 (0)	nz
APACHE II medijana (IQR)	8 (2,5)	7 (4)	1	4(3)	nz

* p vrednosti korigovane za višestruka poređenja, Bonferroni korekcija; nz, nije značajno

Postojala je statistički značajna razlika u dužini hospitalizacije između pacijenata sa sekundarnim peritonitisom i pacijenata sa kilama dok se grupe SIRS i SEPSA nisu statistički razlikovale (Tabela 5).

4.2 Dijagnostičke procedure:

U obe grupe pacijenata sa peritonitisom podjednako su rađeni EHO trbuha i nativna radiografija trbuha, dok je MSCT trbuha rađen veoma retko i nije postojala razlika među grupama (Tabela 6).

Tabela 6. Dijagnostičke procedure u grupi pacijenata sa peritonitisom

	SEPSA n=55	SIRS n=45	p
EHO trbuha	94,5%	91,1%	nz
RTG trbuha	98,2%	97,7%	nz
MSCT trbuha	1,8%	8,9%	nz

nz, nije značajno

4.3 Etiologija sekundarnog peritonitisa

Analizom uzroka sekundarnog peritonitisa, u grupi SEPSA bilo je najviše pacijenata sa perforativnim appendix-om, dok je u grupi SIRS najviše bilo pacijenata sa perforacijom duodenalnog ulkusa. Nije postojala statistički značajna razlika u odnosu na distribuciju po uzrocima peritonitisa (Tabela 7).

Tabela 7. Prikaz uputnih dijagnoza po grupama SIRS i SEPSA.

Dijagnoza na prijemu	SEPSA n=55	SIRS n=45	p*
Appendicitis acuta gangrenosa perforativa	34,5%	13,3%	
Cholecystitis acuta calcula gangrenosa perforativa	3,6%	6,7%	
Perforatio colonis	7,3%	4,4%	
Perforatio intestini tenui	1,81%	4,4%	nz
Perforatio recti proximalis	1,8%	0,0%	
Ulcus b. dudeni perforatum	47,3%	62,2%	
Ulcus prepylorici et pylorici perforatum	3,6%	8,9%	

*p vrednost na osnovu Fišerovog testa tačne verovatnoće; nz, nije značajno

4.4 Laboratorijska merenja

4.4.1 Parametri krvne slike

Postoji statistički visoko značajna razlika između pacijenata u grupama SIRS i SEPSA u preoperativnoj vrednosti leukocita u krvi. Ostali parametri se preoperativno nisu značajno razlikovali (Tabela 8).

Tabela 8. Preoperativne vrednosti parametara krvne slike

	SEPSA n=55	SIRS n=45	SIRS vs. SEPSA*	kontrolna grupa n= 30	sekundarni peritonitis vs. kontrolna grupa*
Le ($10^9/L$)	13,8±5,5	14,47±8,15	nz	6,5±1,4	<0,001
Er ($10^{12}/L$)	4,8±0,6	4,7±0,5	nz	4,9±0,3	nz
Hgb (g/L)	144,6±18,6	144,4±21,9	nz	149,6±9,2	nz
Ht (L/L)	0,4±0,1	0,4±0,1	nz	0,4±0,1	nz
Tr ($10^9/L$)	244,6±82,2	249,2±67,6	nz	204,7±30,9	nz

*p vrednosti korigovane za višestruka poređenja, Bonferroni korekcija; nz, nije značajno

Tabela 8a. Postoperativne vrednosti parametara krvne slike u grupama SIRS i SEPSA tokom hospitalizacije

p.o. dan	Le ($10^9/L$)		Er ($10^{12}/L$)		Hgb (g/L)		Ht (L/L)		Tr ($10^9/L$)	
	SEPSA	SIRS	SEPSA	SIRS	SEPSA	SIRS	SEPSA	SIRS	SEPSA	SIRS
1	13,3±6,0	13,7±6,4	4,3±0,5	4,3±0,4	130,1±16,1	132,0±16,2	0,38±0,01	0,39±0,04	209,2±71,4	220,8±66,7
2	12,1±4,1	12,3±6,3	4,04±0,7	3,9±0,5	123,1±14,5	123,1±16,7	0,37±0,04	0,36±0,05	204,2±63,4	210,2±57,0
3	11,3±4,1	10,4±4,6	5,1±8,3	12,1±53,8	120,3±15,9	121,5±19,3	0,36±0,04	0,36±0,06	219,1±68,0	228,7±71,4
4	10,1±4,2	9,1±3,0	4,0±0,6	3,9±0,6	119,7±15,0	122,2±21,1	0,36±0,04	0,36±0,06	231,8±74,4	252,3±73,0
5	9,4±3,6	9,1±3,8	3,9±0,5	3,9±0,5	116,2±22,9	122,8±16,5	0,35±0,05	0,36±0,05	243,8±85,8	268,8±82,7
6	9,9±4,1	9,3±3,7	3,9±0,4	16,3±69,1	117,9±16,6	124,6±17,6	0,35±0,05	0,37±0,05	270,3±113,9	293,2±92,6
7	10,8±4,3	10,1±3,2	3,9±0,5	4,0±0,5	119,9±15,3	124,3±15,9	0,36±0,04	0,37±0,05	247,7±100,3	333,3±80,9
8	11,9±3,3	11,1±3,6	4,2±0,6	3,8±0,5	125±17,7	115,6±18,8	0,38±0,05	0,34±0,05	301,9±166,8	399,8±66,9
9	12,3±4,3	11,81±4,2	4,1±0,7	3,9±0,5	119,1±23,8	115,8±19,3	0,37±0,06	0,34±0,05	256,8±123,9	436,6±97,4
10	13,2±6,5	11,2±2,3	3,9±0,3	3,4±0,4	119,0±9,2	97,0±9,9	0,36±0,02	0,29±0,03	286,3±182,5	464,5±3,5
11	14,1	/	3,8	/	107,0	/	0,32	/	127,0	/

Postoji statistički značajna promena postoperativnih vrednosti leukocita, Hgb, i trombocita u krvi po danima. Sa druge strane, nije ustanovljena razlika u obrascu tih promena među grupama SIRS i SEPSA. (Tabela 8b)

Tabela 8b. Uticaj SEPSA /SIRS i protoka vremena na parametre krvne slike. Prikazane su p vrednosti na osnovu linearnog modela mešanih efekata

	SIRS vs. SEPSA*	Vreme*	SIRS/SEPSA×vreme*
Le (10 ⁹ /L)	nz	<0,001	nz
Er (10 ¹² /L)	nz	nz	nz
Hgb (g/L)	nz	<0,001	nz
Ht (L/L)	nz	nz	nz
Tr (10 ⁹ /L)	nz	0.02	nz

*p vrednosti korigovane za višestruka poređenja, Bonferroni korekcija; nz, nije značajno

Sama operativna intervencija dovela je do statistički značajnih promena u vrednostima svih parametara krvne slike u grupi pacijenata sa ingvinalnom kilom (Tabela 9).

Tabela 9. Perioperativne promene u praćenim parametrima krvi, grupa pacijenata sa ingvinalnom kilom

	Prosečna razlika u parametru pre i posle operacije	p*
Le (10 ⁹ /L)	3,72	<0,001
Er (10 ¹² /L)	-0,27	<0,001
Hgb (g/L)	-9,03	<0,001
Ht (L/L)	-0,02	<0,001
Tr (10 ⁹ /L)	-13,87	<0,001

*p vrednosti na osnovu t-testa/Wilcoxon-ovog testa za vezane uzorke korigovana za višestruka poređenja po Bonferroni-ju; nz, nije značajno

4.4.2 Parametri plazmatskih sistema

D-dimer preoperativno, statistički se veoma značajno razlikovao u grupi sekundarnih peritonitisa u odnosu na kontrolnu grupu. Vrednosti plazminogena su, opet bile statistički značajno niže u grupi peritonitisa u odnosu na kontrolnu grupu. Pri tome su vrednosti u grupi SIRS bile statistički značajno niže u odnosu na grupu SEPSA (Tabela 10).

Tabela 10. Preoperativne vrednosti parametara koagulacionog statusa

	SEPSA n=55 sekundarni peritonitis n=100	SIRS n=45	SIRS vs. SEPSA*	kontrolna grupa n= 30	sekundarni peritonitis vs. kontrolna grupa*
aPTT(s)	25,7±12,2	24,0±4,3	nz	25,3±2,2	nz
PT(s)	12,8±1,8	12,3±1,1	nz	11,9±1,1	nz
INR	1,05±0,17	1,3±1,7	nz	1,0±0,1	nz
D-dimer (mg/L)	1,8±1,6	2,3±2,1	nz	0,4±0,1	<0,001
Plasminogen (% od normale)	93,9±9,3	87,8±8,3	nz	106,3±6,9	<0,001
AT3 (% od normale)	88,6±13,3	98,8±95,4	nz	91,0±3,7	nz

* p vrednosti korigovane za višestruka poređenja po metodu Bonferroni; nz, nije značajno

Tabela 10a. Vrednosti parametara koagulacionog statusa kroz dane praćenja u grupama SIRS i SEPSA

p.o. dan	aPTT (s)		PT (s)		INR	
	SEPSA	SIRS	SEPSA	SIRS	SEPSA	SIRS
1	29,9±8,8	28,2±4,6	13,7±1,6	20,3±47,0	1,13±0,21	1,36±1,73
2	31,2±5,9	30,9±5,2	13,4±1,5	13,1±1,2	1,11±0,14	1,36±1,92
3	29,5±6,7	29,7±4,7	12,9±1,4	13,0±1,8	1,07±0,13	1,35±1,79
4	28,6±5,7	27,1±2,8	12,9±1,5	12,7±0,9	1,07±0,15	1,35±1,93
5	28,2±7,2	26,2±2,9	13,2±1,6	12,9±0,9	1,10±0,15	1,40±2,09
6	26,8±4,9	24,8±5,3	13,3±2,5	13,1±0,9	1,14±0,14	1,06±0,08
7	27,8±7,2	25,5±3,5	13,6±1,6	12,9±0,9	71,35±306,01	1,05±0,08
8	30,2±14,6	24,9±3,9	14,1±2,3	12,8±0,8	1,19±0,20	1,06±0,09
9	29,0±10,3	24,7±3,6	14,7±2,1	13,4±1,5	1,67±1,20	1,11±0,15
10	25,5±2,8	27,4±3,7	15±4,1	13,9±1,7	1,28±0,37	1,185±0,10
11	28,6	/	20,9	/	1,81	/

Tabela 10a. Vrednosti parametara koagulacionog statusa kroz dane praćenja u grupama SIRS i SEPSA-nastavak.

p.o. dan	D-dimer(mg/L)		Plazminogen (% od normale)		AT3 (% od normale)	
	SEPSA	SIRS	SEPSA	SIRS	SEPSA	SIRS
1	4,49±1,96	4,09±2,34	76,2±15,1	81,02±9,24	82,0±6,9	92,6±7,6
2	6,31±3,24	19,91±83,00	74,9±13,9	71,7±9,3	105,9±132,9	95,1±8,9
3	6,77±4,10	4,67±1,66	71,8±13,1	74,5±11,7	83,1±16,2	97,1±11,2
4	6,22±2,77	4,89±1,81	72,2±15,2	78,8±10,2	83,7±18,8	97,3±11,5
5	6,02±2,45	5,17±1,43	74,1±15,4	82,6±8,5	83,9±11,4	98,8±10,4
6	5,90±1,84	4,89±1,28	75,2±18,3	84±12,7	89,0±10,7	97,4±8,9
7	6,08±1,36	4,75±1,79	88,1±17,3	86,2±13,5	98,6±9,4	106,3±10,5
8	38,89±112,47	5,97±0,61	92,5±18,9	86,7±18,5	110,9±11,7	98,2±7,8
9	4,13±1,12	5,67±1,42	91,1±23,8	95,6±19,8	115,8±13,1	97,7±9,3
10	4,73±2,74	3,12±0,16	102±3,6	68,5±0,7	112,3±2,1	93,0±16,9
11	6,91	/	104	/	117	/

Nakon korekcije za višestruka poređenja, nijedan parametar koagulacionog statusa se ne menja u vremenu, niti postoji statistički značajna razlika među grupama SIRS i SEPSA u ponašanju ovih parametara (Tabela 10b).

Tabela 10b. Uticaj SEPSA/SIRS-a i protoka vremena na koagulacioni status. Prikazane su p vrednosti na osnovu linearnog modela mešanih efekata.

	SIRS/SEPSA*	Vreme*	SIRS/SEPSA×vreme*
aPTT (s)	nz	nz	nz
PT (s)	nz	nz	nz
INR	nz	nz	nz
D-dimer (mg/L)	nz	nz	nz
Plasminogen (% od normale)	nz	nz	nz
AT3 (% od normale)	nz	nz	nz

*p vrednost korigovana za višestruka poređenja; nz, nije značajno

Sama operativna intervencija dovela je do statistički značajnih promena u vrednostima svih parametara koagulacionog statusa osim aPTT-a, u grupi pacijenata sa ingvinalnom kilom (Tabela 11).

Tabela 11. Perioperativne promene u praćenim parametrima koagulacionog statusa, grupa pacijenata sa ingvinalnim kilama

	prosečna razlika u parametru pre i posle operacije	p*
aPTT (s)	0,04	nz
PT (s)	0,82	<0,001
INR	0,06	<0,001
D-dimer (mg/L)	0,17	<0,001
Plasminogen (% od normale)	-10,97	<0,01
AT3 (% od normale)	-5,9	<0,001

*p vrednosti na osnovu t-testa/Wilcoxon-ovog testa za vezane uzorke korigovana za višestruka poređenja po Bonferroni-ju; nz, nije značajno

4.4.3 Biohemijski parametri

Pacijenti sa sekundarnim peritonitisom, preoperativno su imali statistički značajno više vrednosti glukoze u krvi. Pacijenti sa peritonitisom su, takođe imali statistički značajno niže vrednosti natrijuma, albumina i ukupnih protein (Tabela 12).

Tabela 12. Preoperativne vrednosti ostalih praćenih biohemijskih parametara iz krvi

	SEPSA n=55 sekundarni peritonitisi n=100	SIRS n=45	SIRS vs. SEPSA*	kontrolna grupa n= 30	sekundarni peritonitis vs. kontrolna grupa*
Glukoza (mmol/L)	7,7±5,6	7,0±1,8	nz	5,0±0,6	<0,001
Urea (mmol/L)	7,6±9,6	5,9±3,1	nz	5,4±1,6	nz
Kreatinin (mmol/L)	85,7±49,8	70,6±17,8	nz	84,7±15,4	nz
Bilirubin (µmol/L)	17,3±10,3	14,8±12,0	nz	17,4±11,4	nz
natrijum (mmol/L)	137,8±3,6	138,4±4,1	nz	140,8±1,9	<0,001
Ukupni proteini (g/L)	67,5±7,7	66,5±8,4	nz	72,3±34,0	0,014
Albumini (g/L)	41,9±6,2	40,7±6,8	nz	46,8±2,9	<0,001
kalijum (mmol/L)	4,2±0,4	4,2±0,8	nz	4,3±0,4	nz
hloridi (mmol/L)	99,6±5,2	100,0±4,5	nz	101,9±2,4	nz
kalcijum (mmol/L)	2,3±0,22	2,3±0,2	nz	2,3±0,1	nz
AST (U/L)	31,1±39,8	39,3±79,0	nz	79,0±12,6	nz
ALT (U/L)	13,8±18,8	16,4±11,7	nz	19,6±10,5	nz
Alkalna fosfataza (U/L)	69,0±23,0	66,9±41,6	nz	57,3±15,7	nz
Alfa amilaza (U/L)	88,9±128,26	79,37±574	nz	81,3±131,9	nz

*p vrednosti korigovane za višestruka poređenja po Bonferroni-ju; nz, nije značajno

Tabela 12a. Vrednosti ostalih praćenih biohemijskih parametara iz krvi kroz bolničke dane u grupama SEPSA i SIRS

p.o. dan	Glukoza (mmol/L)		Urea (mmol/L)		Kreatinin (mmol/L)		Bilirubin (μmol/L)	
	SEPSA	SIRS	SEPSA	SIRS	SEPSA	SIRS	SEPSA	SIRS
1	6,7±3,2	6,7±2,3	7,3±10,1	4,9±2,7	80,2±48,1	65,5±20,6	15,4±8,2	16,1±13,8
2	5,5±1,8	5,7±1,7	7,1±9,9	4,4±1,9	76,6±58,7	61,6±15,4	12,4±5,6	11,2±4,1
3	5,5±1,9	5,6±1,7	7,1±10,2	4,6±1,7	73,7±65,4	58,3±14,3	11,4±5,2	11,2±5,2
4	5,7±1,4	5,6±1,4	7,3±10,3	4,8±2,3	71,1±58,1	57,6±16,8	10,3±4,9	10,3±3,9
5	5,6±1,3	5,8±1,9	7,0±10,1	4,3±1,5	67,8±49,2	58,5±15,8	9,0±3,9	9,4±4,1
6	5,9±2,3	5,7±1,8	5,8±6,1	4,2±1,9	68,1±53,7	60,3±16,9	8,9±3,7	8,7±4,4
7	5,8±1,5	5,7±1,3	6,3±7,1	3,6±1,4	80,1±63,6	54,5±18,3	9,7±3,7	9,1±4,6
8	6,5±2,1	6,3±1,9	7,8±8,4	4,2±0,8	85,3±56,2	61,4±16,9	8,9±3,1	8,3±4,0
9	7,5±4,7	5,5±0,9	9,8±11,5	3,4±0,8	87,3±63,1	57,2±14,2	10,0±3,3	9,7±4,1
10	7,1±3,7	8,6±3,2	11,9±14,9	1,9	87±54,7	55,0±21,2	13,3±4,7	7,5±6,4
11	11,4	/	14,7	/	73	/	39	/

Tabela 12a. Vrednosti ostalih praćenih biohemijskih parametara iz krvi kroz bolničke dane u grupama SEPSA i SIRS-nastavak

p.o. dan	Ukupni protein (U/L)		Albumini (U/L)		Natrijum (mmol/L)		Kalijum (mmol/L)		Hloridi (mmol/L)	
	SEPSA	SIRS	SEPSA	SIRS	SEPSA	SIRS	SEPSA	SIRS	SEPSA	SIRS
1	54,9±6,4	55,4±6,2	34,8±5,3	34,4±4,9	138,5±3,8	138,3±3,2	4,2±0,5	4,2±0,6	103,6±4,3	103,1±3,4
2	53,9±4,9	54,2±4,8	33,1±4,3	32,7±4,4	139,1±3,2	138,1±3,1	3,9±0,6	4,0±0,4	102,2±3,7	101,8±3,7
3	53,2±4,7	54,5±5,6	32,4±4,1	32,4±4,3	140,3±3,6	138,7±2,6	3,7±0,5	3,8±0,4	103,0±4,0	100,9±3,6
4	52,6±4,5	54,5±5,5	31,9±3,3	32,1±4,4	140,6±3,3	139,3±2,7	3,6±0,5	3,8±0,4	102,3±4,3	100,9±3,2
5	51,9±4,7	54,3±5,9	30,9±3,3	32,2±3,9	139,9±3,1	138,5±3,1	3,5±0,4	3,8±0,4	101,5±4,9	100,7±3,5
6	53,2±5,1	55,2±6,6	31,5±3,7	32,7±3,9	139,2±4,5	138,7±3,1	3,8±0,7	4,0±0,4	101,3±5,5	101,1±3,4
7	53,4±4,4	55,5±7,2	30,5±3,4	32±3,7	139,8±5,1	137,5±4,1	3,9±0,7	4,1±0,3	100,9±8,0	99,1±3,6
8	54,6±6,1	56,7±8,5	31,6±3,9	31,4±5,1	141±6,6	137,2±2,7	4,1±0,4	4,1±0,5	102,3±7,7	99,3±4,3
9	55,0±8,0	56,6±5,1	30,3±3,1	29,5±5,1	140,8±5,7	136,6±2,5	4,0±0,5	4,1±0,4	103,6±7,2	99,5±1,0
10	56,7±4,7	44,0±8,5	35±2,6	25,5±4,9	141,3±9,2	140±7,1	3,9±0,4	3,5±0,1	100,7±9,9	102,0±2,8
11	61,0	/	32,0	/	152,0	/	3,0	/	112,0	/

Tabela 12a. Vrednosti ostalih praćenih biohemijskih parametara iz krvi kroz bolničke dane u grupama SEPSA i SIRS-nastavak

p.o. dan	Kalcijum (mmol/L)		AST (U/L)		ALT (U/L)		Alkalna fosfataza (U/L)		Alfa amilaza (U/L)	
	SEPSA	SIRS	SEPSA	SIRS	SEPSA	SIRS	SEPSA	SIRS	SEPSA	SIRS
1	2,1±0,2	2,1±0,1	31,0±24,1	40,7±37,5	26,6±16,7	39±47,2	60,0±29,7	55,5±26,6	63,5±56,3	72,7±60,5
2	2,1±0,7	2,1±0,1	26,1±11,6	31,4±20,1	21,7±11,6	30,3±28,9	57,6±21,51	51,4±16,0	57,7±40,7	54,8±43,2
3	5,9±27,3	2,1±0,1	25,4±9,1	28,1±14,7	18,96±7,1	26,6±21,7	59,4±23,4	56,3±34,3	61,6±47,1	60,5±59,1
4	4,9±19,7	2,1±0,1	28,2±14,0	28,8±21,5	20,6±10,6	23,6±19,3	60,3±25,7	54,7±29,5	59,9±36,9	73,2±87,1
5	2,1±0,8	2,1±0,2	29,7±12,4	35,0±31,6	21,0±9,6	26,6±23,0	60,4±25,0	57,0±41,5	57,0±35,19	61,3±33,9
6	4,7±15,6	2,1±0,1	37,3±15,7	36,7±22,8	25,5±12,2	30,34±25,2	62,6±26,7	59,5±41,3	64,0 ±40,5	63,8±36,7
7	2,0±0,3	2,1±0,2	40,3±20,4	41,6±25,7	28,2±22,3	36,4±32,8	65,1±31,7	65,9±50,9	70,1±39,2	60,8±41,0
8	2,0±0,1	2,1±0,2	40,8±24,7	45,1±34,1	39,3±35,1	31,2±11,6	73,3±42,8	88,4±56,1	70,3±47,0	73,7±77,8
9	2,0±0,2	2,1±0,1	38,3±22,3	59,2±47,7	48,0±50,8	31,4±14,5	85,1±57,5	97,5±59,4	98,3±74,1	86,8±83,6
10	2,1±0,2	1,9±0,2	28,0±14,0	41,0	18,7±4,9	37,5±23,3	77,0±67,6	75,5±7,8	67,3±26,8	119,5±145,0
11	2,1	/	17,0	/	8,0	/	148,0	/	59,0	/

Glukoza, kreatinin, bilirubin, natrijum, ukupni proteini, albumini i kalijum su takođe pokazali značajnu promenu vrednosti kroz vreme. Sa druge strane, nije postojala statistički značajna razlika, nakon korekcije za višestruka poređenja, u vrednostima ovih parametara među grupama SIRS i SEPSA pacijenata (Tabela 12b)

Tabela 12b . Uticaj SEPSE/SIRS-a i protoka vremena na “ostale” parametre krvi

	SIRS/SEPSA*	Vreme*	SIRS/SEPSA×vreme*
Glukoza (mmol/L)	nz	<0,001	nz
Urea (mmol/L)	nz	nz	nz
Kreatinin (mmol/L)	nz	<0,001	nz
Bilirubin (μmo/L)	nz	<0,001	nz
Natrijum (mmol/L)	nz	0,013	nz
Ukupni proteini (g/l)	nz	<0,001	nz
Albumini (g/l)	nz	<0,001	nz
Kalijum (mmol/L)	nz	<0,001	nz
Hloridi (mmol/L)	nz	nz	nz
Kalcijum (mmol/L)	nz	nz	nz
AST (U/L)	nz	nz	nz
ALT (U/L)	nz	nz	nz
Alkalna fosfataza (U/L)	nz	nz	nz
Alfa amilaza (U/L)	nz	nz	nz

*p vrednost, korigovana za višestruka poređenja; nz, nije značajno

Nivoi uree, kreatinina, bilirubina, ukupnih proteina, albumina i natrijuma su takođe na statistički značajan način izmenjeni prilikom intervencije ingvinalne kile, kao i vrednosti za AST, ALT i alkalnu fosfatazu (Tabela 13).

Tabela 13. Perioperativne promene u ostalim praćenim parametrima krvi, grupa pacijenata sa ingvinalnom kilom.

	prosečna razlika u parametru pre i posle operacije	p*
Glukoza (mmol/L)	0,55	nz
Urea (mmol/L)	-0,37	0,026
Kreatinin (mmol/L)	-5,40	0,009
Bilirubin (µmo/L)	2,12	0,049
Ukupni protein (g/l)	-6,73	<0,001
Albumini (g/l)	-4,37	<0,001
Natrijum (mmol/L)	-1,5	0,001
Kalijum (mmol/L)	-0,15	nz
Hloridi (mmol/L)	0,6	nz
Kalcijum (mmol/L)	7,53	nz
AST (U/L)	-3,1	<0,001
ALT (U/L)	-3,3	<0,001
Alkalna fosfataza (U/L)	-5,4	<0,001
Alfa amilaza (U/L)	-30,1	nz

*p vrednosti na osnovu t-testa/Wilcoxon-ovog testa za vezane uzorke korigovana za višestruka poređenja po Bonferroni-ju; nz, nije značajno

4.4.4 Markeri inflamacije

Praćene vrednosti CRP-a, PCT-a, SAA i HMGB1 bile su statistički značajno više kod pacijenata sa peritonitisom preoperativno u odnosu na pacijente sa kilama. PCT, CRP i HMGB1 su pri tom, takođe imali statistički značajno više vrednosti kod pacijenata u grupi SEPSA u odnosu na pacijente u grupi SIRS (Tabela 14).

Tabela 14. Preoperativne vrednosti CRP-a, PCT-a, SAA i HMGB1.

	SEPSA n=55	SIRS n=45	SIRS vs. SEPSA*	kontrolna grupa n= 30	sekundarni peritonitis vs. kontrolna grupa*
	sekundarni peritonitis n=100				
CRP (mg/L)	95,68±111	31,03±67,92	0,010	1,25±1,08	<0,001
PCT(µg/L)	2,82±8,57	1,21±0,44	0,018	0,03±0,01	<0,001
SSA (mg/L)	839,6±712, 74	773,05±920,1	nz	3,1±0,92	<0,001
HMGB1 (optička gustina trake)	161,8±27,9	137,17±26,61	<0,001	62,65±7,27	<0,001

* p vrednosti korigovane za višestruka poređenja po Bonferroni-ju; nz, nije značajno

Tabela 14a. Vrednosti markera inflamacije kroz bolničke dane u grupama SIRS i SEPSA

p.o. dan	CRP (mg/L)		PCT (µg/L)		SAA (mg/L)		HMGB1 (optička gustina trake)	
	SEPSA	SIRS	SEPSA	SIRS	SEPSA	SIRS	SEPSA	SIRS
1	180,3±105,8	137,6±93,8	10,6±29,7	5,1±1,9	1436,8±382,9	646,0±730,5	152,5±9,0	121,0±28,4
2	210,5±80,9	180,9±74,1	8,5±27,8	3,5±2,2	860,5±455,2	752,4±586,7	153,0±23,3	127,8±13,9
3	170,1±75,7	140,0±65,5	7,1±27,4	2,6±1,9	485,1±405,3	579,1±460,0	134,4±18,8	143,9±20,6
4	120,2±63,7	101,2±56,8	7,2±26,6	1,8±1,5	289,2±240,8	269,5±262,4	161,8±13,4	134,9±12,5
5	88,5±46,3	70,4±46,4	5,8±23,7	1,3±1,2	184,6±129,4	141,6±165,7	170,8±15,0	131,7±16,9
6	73,8±39,8	48,7±35,1	5,2±21,3	2,2±6,2	133,1±88,2	88,1±108,4	169,3±24,8	139,2±21,7
7	65,6±35,6	36,5±27,7	1,5±3,9	0,5±0,2	132,5±80,0	64,9±83,0	199,6±65,4	143,7±13,2
8	57,0±36,1	38,8±16,7	1,9±4,5	6,6±18,5	113,2±33,1	46,6±5,4	191,4±72,6	139,3±11,9
9	48,4±26,5	32,1±13,9	2,3±4,7	5,1±11,7	79,6±30,2	38,0±8,5	145,3±39,1	132,1±12,2
10	46,0±32,2	27,8±16,9	0,8±1,1	0,3±0,1	55,9±27,5	26,0±5,5	118,0±0,6	133,7±1,3
11	39,8	/	1,8	/	27,1	/	112,9	/

Sva četiri markera inflamacije su pokazala značajne promene tokom vremena praćenja. Pri tome su se vrednosti CRP-a, SAA i HMGB1 statistički visoko značajno razlikovale među pacijentima u grupi SIRS u odnosu na grupu SEPSA; samo za SSA i HMGB1 se može reći da su obrasci promene u toku vremena različiti u pomenute dve grupe (Tabela 10b)

Tabela 14b. Uticaj SEPSA/SIRS-a na markere inflamacije CRP, PCT i SAA i HMGB1

	SIRS vs. SEPSA*	Vreme*	SIRS/SEPSA×vreme*
CRP (mg/L)	0,005	<0,001	nz
PCT (µg/L)	nz	<0,001	nz
SAA (mg/L)	0,002	<0,001	<0,001
HMGB1 (optička gustina trake)	<0,001	<0,001	0,036

* p vrednosti korigovane za višestruka poređenja po Bonferroni-ju; nz, nije značajno

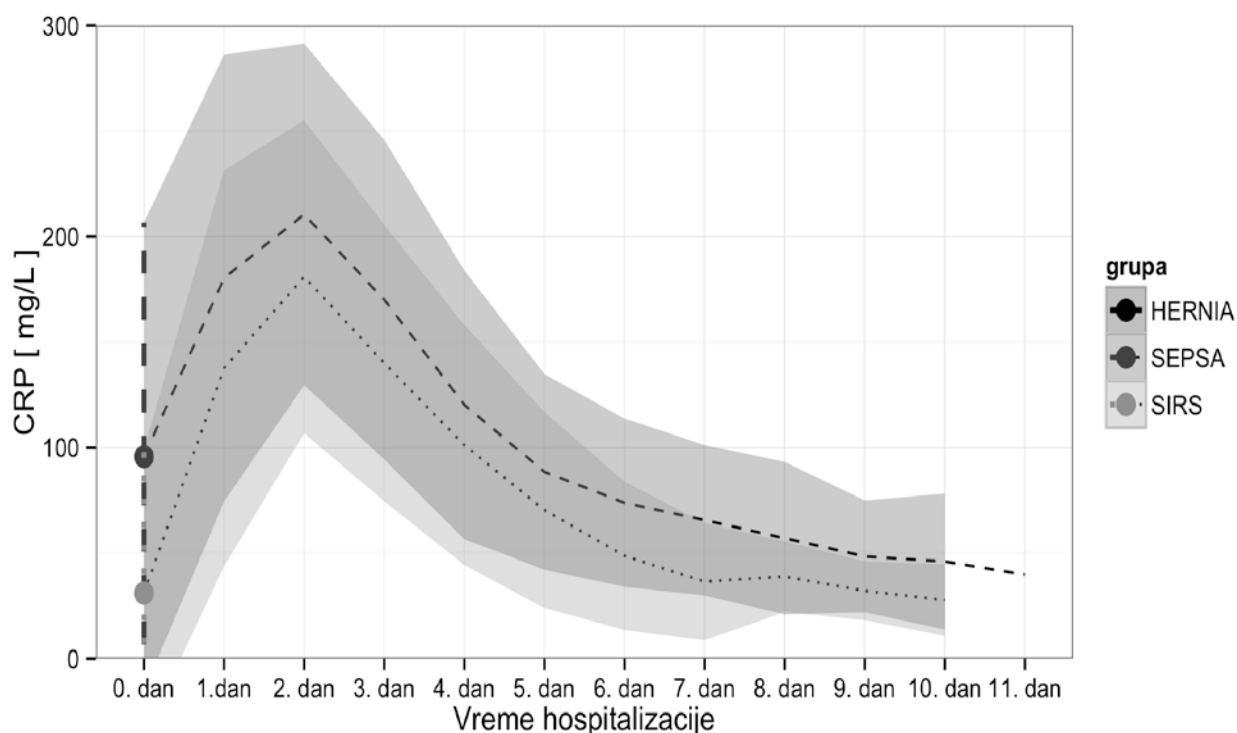
Najosetljiviji parametri u grupi markera inflamacije na uticaj operativnog lečenja ingvinalne kile, bili su HMGB1 i SAA, oba pokazavši statistički, visoko značajan skok neposredno postoperativno (Tabela 15).

Tabela 15. Perioperativne promene markera inflamacije, grupa pacijenata sa ingvinalnom kilom

	prosečna razlika u parametru pre i posle operacije*	p*
CRP (mg/L)	1,13	nz
PCT (µg/L)	0,01	nz
SAA (mg/L)	24,46	<0,001
HMGB1 (optička gustina trake)	30,27	<0,001

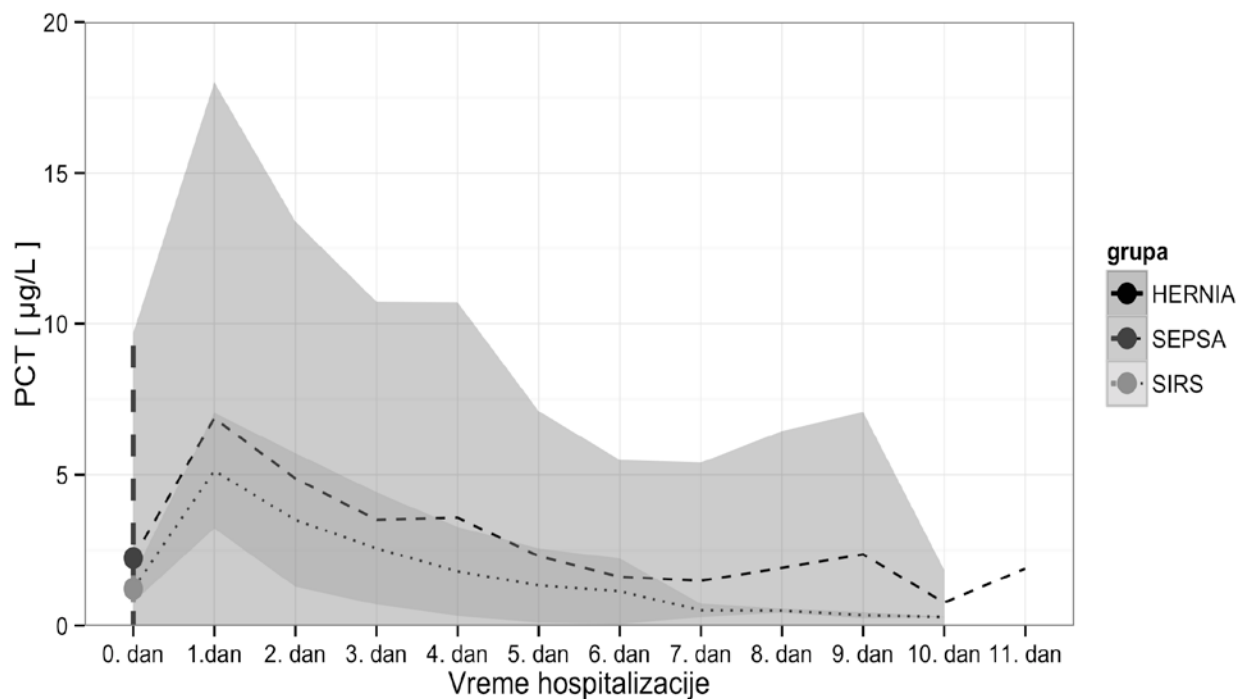
*p vrednosti na osnovu t-testa/Wilcoxon-ovog testa za vezane uzorke korigovana za višestruka poređenja po Bonferroni-ju; nz, nije značajno

CRP vrednosti su bile statistički značajno više u grupi SEPSA u odnosu na grupu SIRS tokom celog perioda praćenja. Koncentracija CRP se statistički visoko značajno menjala tokom vremena: evidentan je postoperativni porast sa maksimumom vrednosti drugog postoperativnog dana, a potom je vrednost padala u kontinuitetu do kraja hospitalizacije. Ovakav obrazac promene koncentracije CRP je bio prisutan u obe grupe, tj. nije postojala interakcija grupa u vremenu. (Grafik 1).



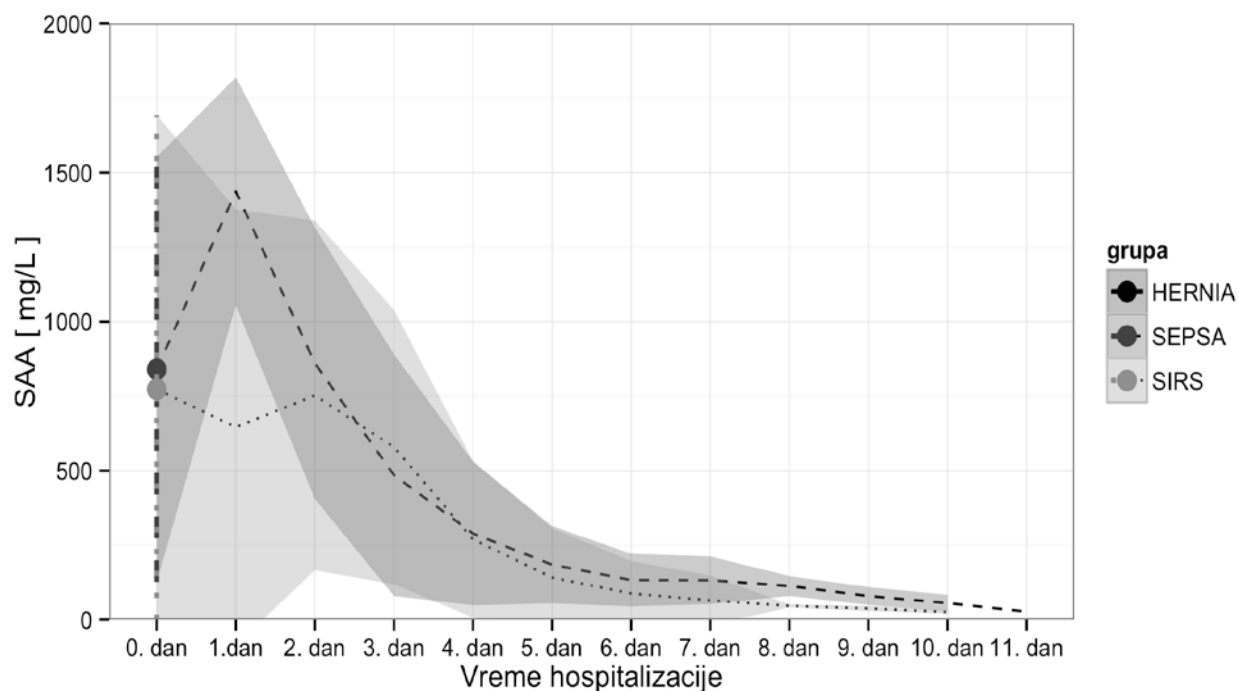
Grafik 1. Prosečne vrednosti CRP-a kroz bolničke dane. Svetlijim površinama su prikazane standardne devijacije za ocenu srednjih vrednosti.

Vrednosti PCT-a su se statistički značajno menjale tokom vremena praćenja. Postojao je jasan skok u vrednostima prvog postoperativnog dana, a nakon toga PCT pokazuje stalan opadajući trend do kraja perioda praćenja, kako u grupi SIRS tako i u grupi pacijenata sa SEPS-om (Grafik 2)



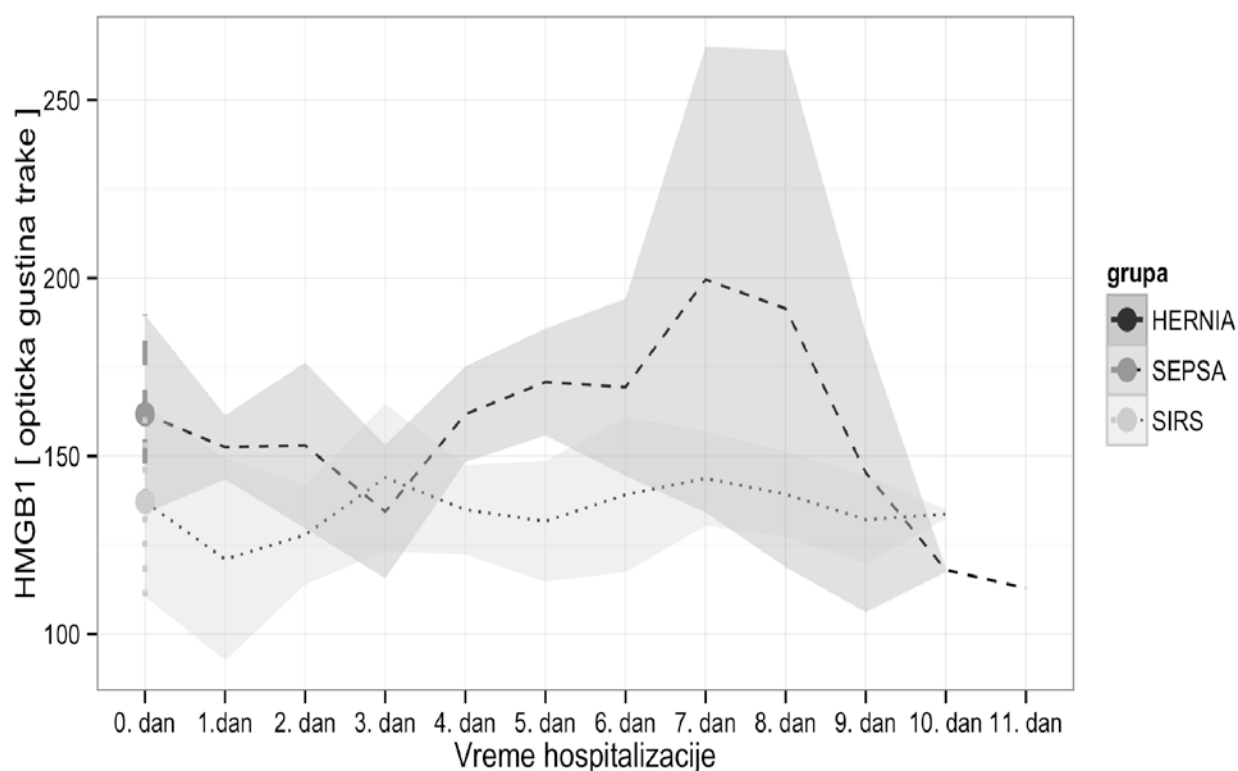
Grafik 2. Prosečne vrednosti PCT-a kroz bolničke dane. Svetlijim površinama su prikazane standardne devijacije za ocenu srednjih vrednosti.

SAA nivoi su se statistički visoko značajno razlikovali u grupi SEPSA u odnosu na grupu SIRS tokom perioda praćenja. Koncentracija SAA je bila statistički visoko značajno porasla nakon prvog postoperativnog dana, a zatim kontinuirano opadala do kraja perioda hospitalizacije kod grupe SEPSA. Nasuprot tome, kod grupe SIRS je vrednost nakon prvog postoperativnog dana prolazno snižena u odnosu na preoperativnu vrednost i zatim nastavila da opada tokom perioda hospitalizacije, tj. postojala je posebno značajna interakcija grupa u vremenu (Grafik 3)



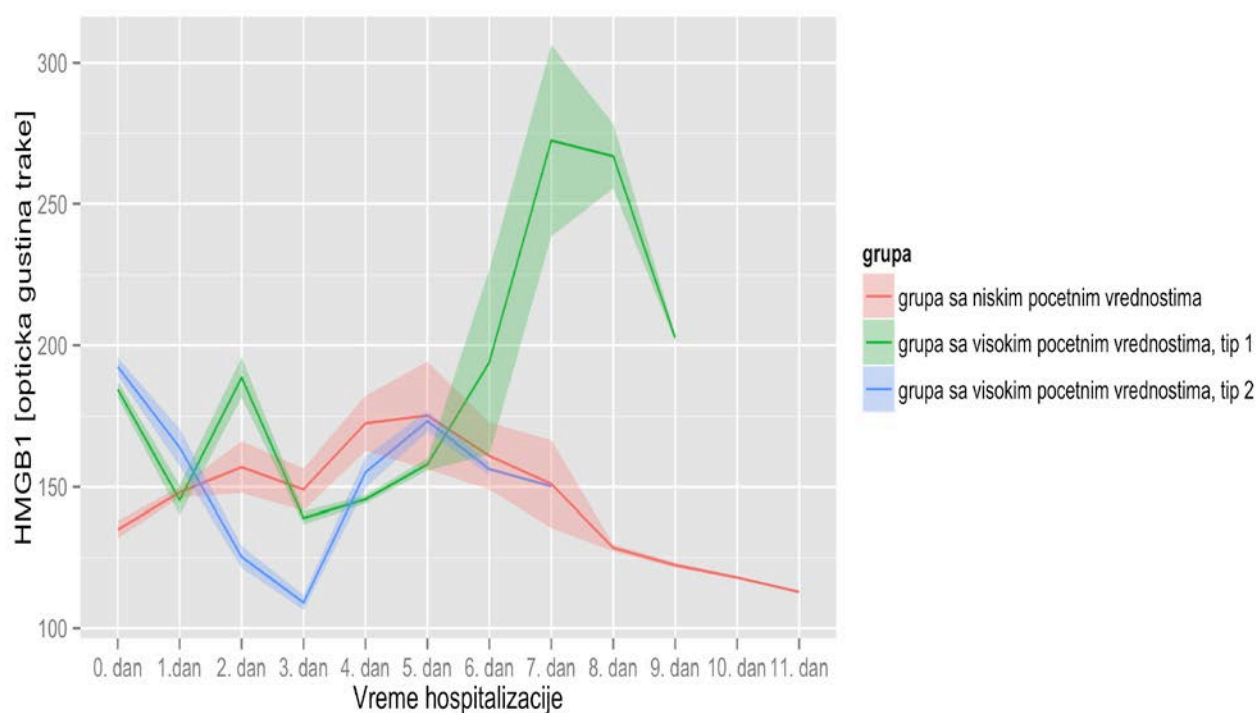
Grafik 3. Prosečne vrednosti SAA kroz bolničke dane. Svetlijim površinama su prikazane standardne devijacije za ocenu srednjih vrednosti.

Vrednosti HMGB1 su se statistički vrlo značajno razlikovale u grupi SEPSA u odnosu na grupu SIRS tokom perioda praćenja, štaviše obrasci promene vrednosti u vremenu su statistički veoma značajno različiti u te dve grupe. Kod pacijenata sa SEPSA, vrednosti HMGB1 blago opadaju prvih dana posle operacije, dosežući najnižu tačku trećeg dana praćenja. Potom rastu sa varijabilnim nagibom do sedmog postoperativnog dana, da bi nakon toga opet gubili na visini vrednosti. Sa druge strane, u grupi SIRS najniže vrednosti se registruju već prvog postoperativnog dana praćenja, da bi potom postepeno porasle sa maksimumom u trećem postoperativnom danu i oscilirale potom između te dve vrednosti do kraja perioda praćenja (Grafik 4)



Grafik 4. Prosečne vrednosti HMGB1 kroz bolničke dane. Svetlijim površinama su prikazane standardne devijacije za ocenu srednjih vrednosti.

HMGB1 u grupi pacijenata SEPSA, pokazuje tri distinktivna obrasca ponašanja u vremenu ($p=0.092$). Jedna grupa pacijenata, definisana niskim preoperativnim vrednostima HMGB1 koje blago opadaju do trećeg postoperativnog dana, potom postepenim porastom HMGB1 koji dostiže maksimum oko petog postoperativnog dana nakon čega postepeno opada; druge dve grupe, obe sa višim preoperativnim vrednostima, međusobno se mogu odvojiti u odnosu na postoperativnu dinamiku: "tip 1" pokazuje skok oko drugog postoperativnog dana nakon čega polako opada trećeg postoperativnog dana, a zatim vrednosti rastu i dostižu maksimalane vrednosti sedmog postoperativnog dana; "tip 2" ponire do najnižih vrednosti oko trećeg postoperativnog dana, potom dostiže maksimalne vrednosti petog postoperativnog dana, nakon čega vrednosti počinju da opadaju (Grafik 5)



Grafik 5. Prosečne vrednosti HMGB1 kroz bolničke dane u pogrupama grupe SEPSA. Svetlijim površinama su prikazane standardne devijacije za ocenu srednjih vrednosti.

4.5 Mikrobiološki nalazi

Većina pacijenata u grupi SEPSA imala je polimikrobnu infekciju (40%). Najčešće zastupljeni mikroorganizmi su bili *E. coli* (47,27%), potom *C. albicans* (40%) i anerobni mikroorganizmi (38,18%) (Tabela 16).

Tabela 16. Prikaz učestalosti nalaza pojedinačnih patogena u kulturi brisa peritonealne duplje

mikroorganizmi	Procenat zastupljenosti
<i>Echerichia coli</i>	47,27%
<i>Candida albicans</i>	40%
Anaerobni mikroorganizmi	38,18%
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	12,72%
<i>Staphylococcus aureus</i>	5,45%
<i>Streptococcus spp,</i>	3,63%
<i>Proteus mirabilis</i>	3,63%
<i>Enterococcus</i>	1,81%
<i>Klebsiella spp,</i>	1,81%
<i>Candida spp,</i>	1,81%

4.6 Antibiotiska terapija

Najčešći antibiotici koji su ordinirani u peritonitisu su Ceftriaxon i Metronidazol, s tim da je u grupi SIRS nešto manje ordiniran Metronidazol u odnosu na grupu SEPSA (Tabela 17).

Tabela 17. Antibiotiska terapija po grupama SEPSA i SIRS.

Naziv antibiotika	SEPSA	SIRS
Ceftriaxon	29 (52,72%)	28 (62,22%)
Metronidazol	53 (96,36%)	37 (82,22%)
Ertapenem	8 (14,54%)	5 (11,11%)
Tazobaktam+Piperacilin	15(27,27%)	7 (15,55%)
Vankogal	6 (10,9%)	0
Ciprofloxacilin	5 (9,09%)	5 (11,11%)
Imipenem+Clasztatin	6 (10,9%)	1 (2,22%)
Amikacin	1 (1,81%)	1 (2,22%)
Diflucan	3 (5,45%)	0
Rifamor	1 (1,81%)	0
Colistin	1 (1,81%)	0
Klindamicin	0	1 (2,22%)

4.7 Rezultati hirurškog lečenja

Shodno intraoperativnom nalazu, u grupi SEPSA najviše je rađena apendektomija a u grupi SIRS sutura ulkusa. Distribucija po tipu operativne intervencije se statistički značajno razlikuje u grupama pacijenata sa SEPSA i SIRS.

Herniektomija sa plastikom ingvinalnog kanala je urađena kod 30 pacijenata (Tabela 18).

Tabela 18. Prikaz izvršenih operacija po grupama SIRS i SEPSA

Operativna intervencija	SEPSA n=55	SIRS n=45	p*
Appenedectomy	34,54%	13,33%	0,024
Cholecystectomy	3,63%	6,66%	
Colectomia totalis cum ileostomia terminalis	3,63%	0%	
Excisio et suttura cum omentoplastica	3,63%	15,55%	
Excisio et suttura intestine tenui	1,81%	0%	
Excisio et suttura ulceri	14,54%	17,77%	
Excisio et suttura ulceri cum pyloroplastica	1,81%	0%	
Resectio colonis sygmoidei cum colostomia terminalis sec, Hartmann	1,81%	2,22%	
Resectio ventriculi sec, ROUX	5,45%	0%	
Sutture colonis cum colostomia bipolaris	3,63%	0%	
Sutture ulceri	25,45%	37,77	
Colostomia bipolaris	0%	2,22%	
Ileostomia bipolaris	0%	2,22%	
Sutture intestini tenui cum ileostomia bipolaris	0%	2,22%	

*p vrednost na osnovu Fišerovog testa tačne verovatnoće; nz, nije značajno

Analizom podataka, vidimo da je u grupi SEPSA bilo više infekcija operativne rane, kao i ostalih prikazanih komplikacija, u odnosu na grupu SIRS (Tabela 19).

Tabela 19. Komplikacije u grupama SIRS i SEPSA

Komplikacija	SEPSA	SIRS
Infekcija operativne rane	5 (9,09%)	1 (2,22%)
Pneumonija	1 (1,81%)	0
Pleuralni izliv	1 (1,81%)	2 (4,44%)
Celulitis	1 (1,81%)	0
Dijareja	1 (1,81%)	0

5 DISKUSIJA

Sekundarni peritonitis je veoma značajano hirurško oboljenje koje je i danas povezano sa visokim stepenom komorbiditeta i mortaliteta. Smrtnost od sekundarnog peritonitisa početkom prošlog veka je iznosila oko 90% kada je ovo oboljenje tretirano neoperativno. Značajan momenat u lečenju peritonitisa predstavlja menjanje strategije u lečenju. Naime, Kishner postavlja prve osnovne principe operativnog lečenja a to su:

1. Eliminacija septičnog fokusa
2. Uklanjanje nekrotičnog tkiva
3. Uklanjanjenje purulentnog sadržaja.

Primenjujuću ove mere u lečenju peritonitisa do 1930. godine, smrtnost je smanjena na 50%. Drugi značajan trenutak u lečenju peritonitisa, predstavlja uvođenje antibiotika u lečenje, kada smrtnost nastavlja polako da opada. Upotreba cefalosporina sedamdesetih godina prošlog veka i dalje smanjuje smrtonost koja se svodi na oko 30-40% (309). Mulier i sar. 2003. godine zaključuju da je mortalitet i dalje 30%. Analizirajući koji su to prognostički faktori značajni za prognozu peritonitisa kod 96 pacijenata, zaključuju da su nemogućnost uklanjanja abdominalne infekcije, ili kontrola septičkog izvora i starija životna dob, faktori koji utiču na ovako visok procenat smrtnosti (310). Sa druge strane Pomata i sar. (2002) nakon analize 94 bolesnika u periodu od deset godina, navode da je ukupan mortalitet u njihovoj studiji iznosio 6,3% (311).

U našoj studiji nije bilo umrlih verovatno iz više razloga, a na osnovu kojih smo objasnili povoljan ishod lečenja kao i prisustvo minimalnih, životno neugrožavajućih postoperativnih komplikacija. Verovatni razlozi zašto nije bilo umrlih u studiji su:

1) isključni faktori su bili vrlo restriktivni: trudnoća, puerperijum, diabetes mellitus, maligna stanja, pacijenti sa znacima akutnog pankreatitisa, pacijenti kod kojih se primenjuju citostatici ili su na imunosupresivnoj terapiji, pacijenti inficirani B i C hepatitis virusom kao i HIV virusom, pacijenti sa psihozom, često dovode do komplikacija tokom lečenja, a koje mogu biti i smrtonosne.

2) Preoperativno izračunati ASA skor je iznosio 2, što znači da su naši ispitanici imali blago sistemsko oboljenje i bili relativno zdravi.

3) izračunati APACHE II skor prvog postoperativnog dana u grupi SIRS je iznosio 7 a u grupi SEPSA 8, što je ukazivalo na dobar ishod lečenja u našoj ispitivanoj grupi i njihovo preživljavanje, jer je očekivani mortalitet bio 8% (84).

4) Naši ispitanici su bili relativno mladi i zdravi, prosečna starost u grupi SIRS iznosila $45,9 \pm 13,1$, a u grupi SEPSA $4,8 \pm 13,3$ godina. Studija izvedena od strane Igbala i sar. pokazala je da na morbiditet utiče starost pacijenata (312), ali i na krajnji ishod lečenja kod pacijenata sa sekundarnim peritonitisom (27).

5) Pravovremeno i adekvatno operativno lečenje. Analizirajući vrste izvedenih operacija kod naših ispitanika sa sekundarnim peritonitisom, vidimo da postoji značajna razlika među grupama. Naime u grupi SEPSA najčešće je izvođena apendektomija kod 19 (34,5 %) pacijenata, dok je u grupi SIRS to bila sutura ulkusa kod 17 (37,8%) pacijenata uz lavažu i drenažu trbuha, sa primarnim zatvaranjem trbuha. Pored ovih operacija, najčešće su izvođene resekcije tankog i debelog creva sa eksteriorizacijom kao sigurnija hirurška procedura dok anastomoza nije rađena. S druge strane Stumph i sar. zaključuju da je primarna anastomoza sigurna hirurška procedura za pacijente sa sekundarnim peritonitisom usled patologije na tankom i debelom crevu, s tim da je nakon procene rizika primarna anastomoza ipak prihvatljivije rešenje kod problema sa tankim crevom (313). Druga studija opisuje izvođenje primarne suture od 29%, resekciju sa anastomozom od 33% i 38% derivacija kod pacijenata sa peritonitisom uzrokovanim perforacijom nakon kolonoskopije (312). Ipak, resekcija i primarna anastomoza ne može biti optimalan tretman za svaku povredu debelog creva sa razvijenim peritonitisom (314). U našoj studiji nije bilo reintervencija.

6) primenjene mere intezivnog lečenja.

U našoj ispitivanoj grupi je bila zastupljena polimikrobna flora. Najčešće su bile zastupljene *E. coli* i anaerobe bakterije slično nalazima randomiziranih studija prikazanim u vodiču za lečenje kod komplikovanih inatraabdominalnih infekcija (60). Stoga, možemo isključiti da tip infektivnog agensa nije uticao na učestalost smrtnog ishoda u našoj studiji. Nasuprot tome, Riche i sar. su ustanovili da su u grupi pacijenata sa sekundarnim peritonitisom, starijim od 65 godina sa izolovanim dva ili

više mikroorganizama, ili anaerobima u peritonealnoj tečnosti, predstavljali nezavisni faktor rizika za nastanak septičkog šoka koji se razvio kod 41% i sa mortalitetom koji je iznosio 35% (56). Najčešće primenjeni antibiotici u obe ispitivane grupe bili su Ceftriaxon i Metronidazol. Raspodela frekvencija primene ovih antibiotika kod pacijenata koji su definisani kao grupa SEPSA i pacijenata u grupi SIRS bila slična, pa se terapija isključuje kao razlog za razlike u ponašanju markera inflamacije u ispitivanim grupama.

U našoj studiji smo svakodnevno ispitivali parametre krvne slike, čije određivanje je relativno jeftino i dostupno u svakodnevnom radu. Vrednosti leukocita su bile statistički značajno više u grupi sa peritonitisom u odnosu na kontrolnu grupu na prijemu u bolnicu, mada nije bilo razlike između grupe SEPSA u odnosu na grupu SIRS.

Iako su leukociti uključeni kao jedan od kriterijuma u definisanju sepse, neke studije su pokazale da leukociti imaju nisku senzitivnost i specifičnost za postavljanje dijagnoze sepse (315, 316). Studija sprovedena od strane Gucyetmeza-a i Atalana, je pokazala da su vrednosti leukocita značajno niže u grupi sa sepsom u odnosu na grupu sa SIRS-om, ali autori sugerišu da ova razlika nema biološki načaj, zbog toga što su srednje vrednosti bile u granicama normalnog opsega. Takođe pretpostavljaju da i pored toga što su vrednosti leukocita jedan od dijagnostičkih kriterijuma za sepsu, vrednosti leukocita po prijemu u jedinicu intenzivnog lečenja (JIL), su daleko od toga da budu važan marker u dijagnostici sepse. Sa druge strane zaključuju da bi povišene vrednosti CRP-a i vrednosti trombocita ispod $150 \times 10^9/L$, mogle biti od pomoći u identifikovanju sepse (317).

Pošto intraabdominalna infekcija dovodi do aktiviranja inflamatornog odgovora koji generiše stvaranje brojnih medijatora odgovornih za zbivanja u peritonitisu, to je sugerisalo da bi se neki od ovih medijatora mogli koristiti kao markeri težine novonastale sepse (318), ali pre svega da bi identifikovali ili isključili novonastalu sepsu. Identifikovanje pacijenata koji su razvili sepsu je veoma značajno pre svega sa aspekta primenjenih terapijskih mera kao i praćenja rezultata lečenja. Mnogi biomarkeri su korišćeni da bi potvrdili sepsu. Većina je klinički testirana pre svega kao prognostički marker. Pregledom literature Gustot i sar. konstatuju da od mnogobrojnih markera koji se koriste u sepsi, nijedan nema dovoljnu specifičnost i senzitivnost da bi se rutinski koristio u kliničkoj praksi. Takođe, zaključuju da je malo

verovatno, s obzirom na kompleksnost inflamatornog odgovora u sepsi da će biti pronađen jedan idealan biomarker. Smatraju da bi kombinacija nekoliko markera bila efikasnija u identifikovanju sepse (319).

Mi smo pretpostavili da bi i HMGB1 kao kasni marker sepse, mogao biti značajan prognostički marker u sekundarnom peritonitisu, te smo ispitivali njegove nivoe u krvi. Takođe smo ispitivali i akutne markere sepse kao što su CRP, PCT i SAA kod pacijenata sa peritonitisom i kod pacijenata sa kilama.

Pacijenti sa kilama nisu imali infekciju ni inflamaciju, ali i kod njih konstatujemo da se prvog postoperativnog dana značajno povećavaju SAA i HMGB1, što nas navodi na zaključak da i samo operativno lečenje dovodi do aktiviranja inflamatornog odgovora i sinteze SAA kao i pasivno oslobađanje već postojećeg HMGB1. U kojoj meri samo operativno lečenje kod pacijenata sa peritonitisom dovodi do povišenja markera, a koliko je posledica peritonitisa, teško je odgovoriti.

CRP je prisutan u serumu zdravih ljudi, ali se brzo i dramatično povećava kao odgovor na infekciju ili u inflamatornim uslovima (208, 209). U našoj studiji smo ispitivali vrednosti CRP-a kod pacijenata sa peritonitisom i kilama, kada smo konstatovali da su postojale značajno više vrednosti CRP-a u grupi sa sekundarnim peritonitisom po prijemu u bolnicu, u odnosu na kontrolnu grupu, što je bilo za očekivati s obzirom na aktiviranje inflamatornog odgovora sa ili bez prisutne infekcije u peritonitisu, što je značano doprinelo u postavljanju dijagnoze. Daljom analizom naših rezultata došli smo do zaključka da su vrednosti CRP-a u našoj studiji bile značajno više u grupi SEPSA u odnosu na grupu SIRS na prijemu, što objašnjavamo intenzivnijim inflamatornim odgovorom u grupi SEPSA.

Slične rezultate je pokazala skorašnja studija sprovedena od strane Gucyetmeza-a i Atalana, u kojoj su vrednosti CRP-a bile više kod pacijenata sa sepsom u odnosu na one sa SIRS-om (317). U studiji Reith i sar. (2000) vrednosti CRP-a su bile više kod pacijenata sa postoperativnom infekcijom i sepsom u odnosu na pacijente koji su imali postoperativni tok bez komplikacija, takođe konstatuju da su vrednosti CRP-a značajne u predviđanju prognoze kod pacijenata sa abdominalnom sepsom (320).

U studiji sprovedenoj od strane Witczak i sar. (2012), na 36 pacijenta koji su podvrgnuti elektvnom operativnom lečenju i koji su podeljeni na grupu pacijenata u kojima je bio razvijen SIRS i pacijente gde SIRS nije postojao, zaključili su, da su

serijska merenja CRP-a korisna u prvoj nedelji nakon operacije, jer mogu predvideti postoperativne septične komplikacije, ali takođe, konstatuju da se ishod bolesti ne može predvideti na osnovu nivoa CRP-a (321).

Berger i sar. su još 1999. godine pokazali da vrednosti CRP-a posle operacije, već prvog postoperativnog dana počinju da rastu i da dostižu maksimum drugog postoperativnog dana, nakon čega padaju (322). U našoj studiji koncentracija CRP-a se značajno menjala tokom vremena: evidentan je bio postoperativni porast, tako da je vrednost CRP-a dostigla maksimalnu vrednost drugog postoperativnog dana, zatim je padala u kontinuitetu do kraja bolničkog lečenja. Ovakvo ponašanje objašnjavamo dobrim oporavkom i preživljavanjem svih pacijenata u našoj studijskoj grupi sa peritonitisom nakon operativnog lečenja. CRP je protein akutne faze i vrlo brzo opada u krvi sa dobrim kliničkim oporavkom, što se i videlo kod naših ispitivanih pacijenata. Takođe, Luzzani i sar. konstatuju da je koncentracija CRP-a u plazmi kod pacijenata sa sekundranim peritonitisom pratila klinički tok, tako da je pad nivoa proteina akutne faze ukazivao na rezoluciju infekcije (323)

Obrazac promene koncentracije CRP je bio sličan u obe grupe, tj. nije postojala interakcija grupa u vremenu, te se grupe SEPSA i grupa SIRS nisu razlikovale na osnovu vremenskog toka ponašanja CRP-a među sobom, tako da nije bilo moguće razlikovati grupu sa infekcijom i one koje nisu imali infekciju, što u kliničkom radu može limitirati upotrebu CRP-a.

I pored porasta CRP-a Silvestre i sar. (2009) su kod 159 septičnih pacijenata pokazali da CRP nije dobar pokazatelj prognoze (324). S druge strane određivanje vrednosti CRP-a je relativno jeftino i lako izvodljivo, a samim tim i dostupno u svakodnevnom rutinskom radu. Međutim, njegova prediktivna vrednost može biti ograničena za predviđanje prisustava infekcije kod pacijenata sa SIRS-om zbog velikog preklapanja vrednosti u ove dve grupe.

Upravo zbog heterogenih rezultata u publikovanim studijama, i pored toga što serijska merenja CRP-a imaju izvesnu vrednost u praćenju odgovora na lečenje antibioticima u jedinicama intenzivnog lečenja (JIL), njegova uloga kao pojedinačnog prognostičkog biomarkera u sepsi je i dalja ograničena, što je i naša studija pokazala (325). Upravo iz ovih razloga mi smo merili vrednosti i PCT-a u serumu kod

pacijenata sa peritonitisom pošto su i Luzzani i sar. (2003) u svojoj studiji, u kojoj je učestvovalo 800 pacijenata, dokazali da je PCT bolji marker za sepsu od CRP-a.

Rau i sar. (2007) su uradili prospektivnu multicentričnu internacionalnu kohortnu studiju. U studiju su bila uključena 82 pacijenta sa intraoperativno dokazanim peritonitisom. Praćeni su nivoi CRP-a i PCT-a, uzastopno dvadeset jedan dan. Rezultati su pokazali da je PCT najuže povezan sa razvojem MODS-a, čija je vrednost najviša odmah nakon pojave prvih simptoma, ili u neposrednom postoperativnom toku. Takva povezanost nije uočena za CRP. Dijagnoza sepse sa MODS-om moguća je već prva dva dana nakon operacije pošto je senzitivnost i specifičnost gotovo ista. Perzistiranje nivoa PCT-a veće od 10 ng/l tokom prve nedelje bolesti je dobar indikator mortaliteta i bio je bolji pokazatelj u odnosu na CRP(5). Uzzan i sar. (2006) uradili su meta-analizu 33 objavljene studije (3943 pacijenta koji su imali sepsu, tešku sepsu ili septički šok i 1545 pacijenata sa SIRS-om), u kojima je merena vrednost CRP-a i PCT-a. Zaključili su da PCT predstavlja dobar dijagnostički biološki marker za dijagnostiku ovih stanja i superiorniji je u odnosu na CRP (326), ali su takođe konstatovali da postoje i studije u kojima nije postojala statistički značajna razlika kod pacijenata sa sepsom.

Mi smo ispitivali vrednosti PCT-a u grupi sa peritonitisom i grupi sa kilama po dolasku u bolnicu i, konstatujemo da su pacijenti sa peritonitisom imali značajno više vrednosti u odnosu na grupu sa kilama koji nisu imali znake inflamacije niti infekcije, što nam govori da se u peritonitisu značajno sintetiše PCT što je veoma značajno u postavljanju dijagnoze. Takođe je postojala statistički značajna razlika između grupe SIRS i grupe SEPSA preoperativno, po dolasku u bolnicu, u grupi sa peritonitisom. To objašnjavamo značajnom sintezom PCT-a u grupi SEPSA, izazavanim ekcesivnim oslobađanjem prisutnih bakterijskih endo i egzotoksina a koji su potentni i značajni za sintezu PCT-a. Takođe, konstatujemo da nije postojala statistički značajna razlika po danima u ponašanju PCT-a u grupi SEPSA u odnosu na grupu SIRS, što smo objasnili činjenicom da bakterijski endo i egzotoksini nisu i jedini induktori sinteze PCT-a, te da je sinteza PCT-a u korelaciji sa inflamatornim odgovorom, povezana i sa indukcijom sintetisanih proinflamatornih citokina(247). Na osnovu iznetog, zaključujemo da je inflamatorni odgovor u obe ispitivane grupe bio značajan u peritonitisu, ali činjenica da nije bilo razlike među grupama sa peritonitisom, u nekoj meri limitira upotrebu PCT-a u razlikovanju SIRS-a od SEPSA. Takođe je i istraživanje

Zheng Wao i sar. pokazalo da PCT nije idealan biomarker u diskriminaciji SIRS-a od sepsa (327).

Barbić i sar. (2013) su merili prva tri postoperativna dana vrednosti PCT-a nakon elektivne operacije, kada konstatuju da se najveće povećanje PCT-a vidi nakon prvog postoperativnog dana (328). Baykut i sar. (2000) su sproveli studiju na 400 pacijenta, u kojoj su merili koncentraciju PCT-a u postoperativnom periodu nakon kardiohiruške operacije sa infekcijom i, pokazali da su vrednosti PCT-a ostajale povišene do četvrtog postoperativnog dana, sa drugim skokom između četvrtog i šestog postoperativnog dana. Kod pacijenata koji nisu imali infekciju, povišene vrednosti PCT-a počinju da opadaju drugog postoperativnog dana (329).

Novotny i sar. (2009) su kod 104 pacijenata sa sekundarnim peritonitisom ispitivali trend nivoa PCT-a u plazmi, koji su uspešno operisani i konstatovali da se nivo PCT-a smanjuje drugog postoperativnog dana nakon operativnog lečenja i uklanjanja septičnog fokusa (330).

Analizom naših rezultata dobijenih u grupi pacijenata sa sekundarnim peritonitisom, zaključujemo da vrednosti PCT-a dostižu maksimalne vrednosti prvog postoperativnog dana, nakon čega opadaju već drugog postoperativnog dana, sa trendom opadanja u vremenu. Ovakav trend bi mogao da se objasni uspešnim operativnim lečenjem kao i adekvatnim konzervativnim postoperativnim lečenjem, što je rezultiralo relativno brzim oporavkom naših ispitanika bez pojave značajnih i vitalno ugrožavajućih postoperativnih komplikacija. U studiji izvedenoj od strane Junga i sar. (2013) kod 101 pacijenta, gde su analizirali vrednosti PCT-a nultog, prvog, trećeg i petog postoperativnog dana, konstatuju da već nakon prvog postoperativnog dana dolazi do pada nivoa vrednosti PCT-a u plazmi (331).

Daljom analizom naših rezultata konstatujemo da ne postoji značajna razlika u ponašanju vrednosti PCT-a tokom vremena praćenja među ispitivanim grupama sa peritonitisom. Na osnovu vremenskog toka ne mogu se razlikovati pacijenti koji su imali sepsu od neinfektivnog SIRS-a što može predstavljati otežavajuću okolnost u terapijskom pristupu kod pacijenata sa peritonitisom, iako je preoperativno postojala značajna razlika u ove dve ispitivane grupe.

Yang i sar. (2014) su u meta-analizu uključili 18 studija sa ukupno 1827 pacijenata. Cilj meta-analize je bio da se utvrdi potencijalna korist nivoa PCT-a u dijagnozi

bakterijskog peritonitisa. Rezultati su pokazali da je senzitivnost i specifičnost relativno dobra. Međutim, s obzirom na metodološka ograničenja i značajnu heterogenost u grupama, opšti zaključak je bio da medicinske odluke treba donositi nakon sumacije kliničkog nalaza i nivoa PCT-a. Takođe, konstatuju da se PCT ne može koristiti samostalno kao zlatni standard za dijagnozu peritonitisa (332). Analizirajući naše rezultate i publikovane rezultate drugih studija, dolazimo do zaključka da bi bilo poželjno u istraživanje uključiti merenje i SAA kao proteina akutne faze sekundarnom peritonitisu i analizirati njegovo ponašanje.

U našoj studiji izmerene preoperativne vrednosti SAA bile su značajno više u grupi pacijenata sa peritonitisom u poređenju sa pacijentima sa kila, što smo i očekivali, s obzirom da u kontrolnoj grupi nisu postojali znaci inlufamacije i infekcije. Daljom analizom konstatujemo da preoperativno nije postojala značajna razlika između vrednosti SAA u grupi SIRS u odnosu na grupu SEPSA, što smo objasnili malim uzorkom pacijenata, koji možda nije bio dovoljan da bi se ova razlika u vrednostima pojavila, u grupi SIRS je bilo 45 dok je u grupi SEPSA bilo 55 pacijenata.

Uvidom u literaturu, zapazili smo da su se studije koje su ispitivale ponašanje SAA u sepsi, uglavnom odnosile na neonatalni period. Arnon i sar. (2007) su u studiju uključili terminski rođenu decu, mlađu od 72h, koja su imala rizične faktore i/ili se sumnjalo da imaju sepsu. Vrednosti SAA su merene u nultom satu, 24h i 48h nakon dijagnostikovane sepse. Od 104 novorođenčeta, 23 su imala sepsu, a 81 nije imalo sepsu. Vrednosti SAA u grupi pacijenata sa sepsom su bile značajno više u nultom, 24h i 48h, od onih u grupi koja nisu imala sepsu. U poređenju sa CRP-om, vrednosti SAA rastu ranije i brže, dostižući više vrednosti, da bi se nakon toga brže od CRP-a vraćale na normalne vrednosti, kod dece sa rano dijagnostikovanom sepsom. Zaključuju da je SAA kao rani marker zapaljenja bolji dijagnostički pokazatelj od CRP-a u nultom času nakon evaluacije sepse (333).

Takođe, Yuan i sar. (2013) su u meta-analizu uključili devet studija u kojima je korišćen test za SAA za analizu neonatalne sepse. Rezultati analize pokazuju da SAA pokazuje umerenu tačnost u ciklusu postavljanja dijagnoze neonatalne sepse. Pored toga, konstatuju da SAA ima veću prediktivnu vrednost od CRP-a kada postoji sumnja na sepsu, jer se pojavljuje vrlo brzo u serumu, već nakon 8h-96h, nekada čak i pre pojave kliničkih simptoma sepse. Takođe, zaključuju da je određivanje nivoa vrednosti SAA u detekciji sepse, najkorisnije u kombinaciji sa drugim markerima CRP-

om i PCT-om kao i utvrđivanje njihove korelacije (334). CRP i SAA ispoljavaju sličan obrazac ponašanja u serumu kod većine inflamatornih bolesti, dostižući maksimalne vrednosti u serumu oko 24h nakon započinjanja inflamatornog procesa nakon čega polako opadaju (335). S obzirom da je koncentracija SAA obično paralelna sa koncentracijom CRP-a u serumu, neki autori smatraju da je SAA pored CRP-a, koristan klinički marker inflamacije ili virusne infekcije (316). S druge strane, neke studije ukazuju da je SAA osetljiviji marker kod inflamatornih bolesti, mada u ovom trenutku testovi za upotrebu nisu široko dostupni (336).

U našoj studiji u grupi sa peritonitisom koncentracija SSA je bila značajno porasla nakon prvog postoperativnog dana, a zatim kontinuirano opadala do kraja perioda hospitalizacije u grupi SEPSA, moguće zbog antibiotske terapije i eliminacije infektivnog fokusa. Nasuprot tome, u grupi SIRS, vrednost je nakon prvog postoperativnog dana prolazno bila snižena u odnosu na preoperativnu vrednost i zatim nastavila da opada tokom perioda hospitalizacije, što smo objasnili slabijim inflamatornim odgovorom u ovoj grupi. Takođe je postojala značajna interakcija grupa u vremenu. SAA nivoi su se visoko značajno razlikovali u grupi SEPSA u odnosu na grupu SIRS tokom perioda praćenja. Vremenski obrazac ponašanja SAA u grupi SEPSA je bio vrlo sličan u studiji sprovedenoj od strane Cicarelli i sar. kod preživelih od septičkog šoka (337) s tim da moramo naglasiti da su podaci o vremenskom obrascu ponašanja SAA u serumu kod odraslih ljudi sa sepsom veoma retki. Ucar i sar. (2008) su kod 36 septičnih i zdravih beba merili vrednosti SAA u serumu nultog, četvrtog i osmog dana po rođenju i konstatovali da SAA nije pouzdan marker za dijagnozu i praćenje neonatalne sepse (338).

U našoj kontrolnoj grupi takođe prvog postoperativnog dana dolazi do značajnog porasta vrednosti SAA u odnosu na preoperativne vrednosti, što nas navodi na zaključak da i samo operativno lečenje utiče na sintezu SAA.

Nakon svih dobijenih rezultata merenja kod pacijenata sa peritonitisom, možemo reći da je SAA veoma značajan marker akutnog inflamatornog odgovora. Pogotovo je značajno njegovo ponašanje tokom perioda hospitalizacije i lečenja, jer su izmerene vrednosti SAA kod naših ispitanika ukazivale na veoma značajne razlike po grupama sa SIRS-om u odnosu na grupu SEPSA a što je važno za postoperativno lečenje. Na žalost, u našim uslovima određivanje vrednosti SAA se ne koristi u rutinskom radu

mada bi mogao u perspektivi zajedno sa drugim markerima da bude prisutan u postavljanju dijagnoze i praćenju rezultata lečenja.

Sa druge strane, Wei Li i sar. (2015) su u zaključku svoje studije prezentovali dokaze koji potvrđuju mogućnost da vrednost SAA može da bude značajan samo kod manjeg broja pacijenata sa sepsom. Naime, na životinjskim modelima letalne endotoksemije i eksperimentalne sepse, rekombinantni SAA pogoršava lipopolisaharidom-indukovanu smrt životinja, dok SAA-neutrališuća IgG značajno poboljšavaju preživljavanje životinja. SAA značajno reguliše PKR i stimuliše oslobađanje HMGB1 preko TLR4/RAGE u zavisnom odnosu. Farmakološka inhibicija PKR fosforilaze inhibirala je SAA-indukovano HMGB1 oslobađanje, što ukazuje na ulogu SAA u oslobađanju HMGB1 i proizvodnju NO (339). U našoj studiji su preoperativno izmerene vrednosti HMGB1 u grupi sa peritonitisom bile značajno više u odnosu na pacijente sa kilama, što smo objasnili nekrozom tkiva u peritonitisu, i pasivnim oslobađanjem već postojećeg HMGB1 iz jedra ćelija.

Gaini i sar. (2007) su ispitivali 185 pacijenata, od kojih su 154 pacijenta imala dokazanu infekciju, dok su ostali bili kontrola. Konstatuju da su vrednosti HMGB1 u grupi sa infekcijom bile više u odnosu na kontrolnu grupu zdravih (340).

Singh i sar. (2015) su analizirali 23 pacijenta koji su imali akutni opstruktivni supurativni holangitis i poredili sa uzorcima 23 pacijenta u kontrolnoj grupi koji su bili zdravi. Nivoi iRNK za HMGB1 i HMGB1 proteina su bili povišeni kod bolesnika sa holangitisom, na osnovu čega su zaključili da HMGB1 može imati značajnu ulogu u zapaljenju žučne kese i može biti povezan sa razvojem sepse. Takođe, ukazuju na značaj praćenja nivoa HMGB1 u upravljanju ovim modelom sepse (341).

Analizom dobijenih vrednosti HMGB1 proteina kod pacijenata koji su operisani zbog preponske kile, konstatujemo da dolazi do značajnog oslobađanja i pojave HMGB1 u serumu ispitanika prvog postoperativnog dana u odnosu na preoperativne vrednosti, što verovatno nastaje kao posledica operativne traume tkiva i pasivnog oslobađanja već sintetisanog HMGB1 iz ćelija.

U našoj ispitivanoj grupi sa peritonitisom, vrednosti HMGB1 su bile značajno više kod pacijenata u grupi SEPSA u odnosu na pacijente u grupi SIRS, što smo objasnili razvijanjem intenzivnijeg inflamatornog odgovora zbog prisusva infektivnih mikroorganizama u grupi SEPSA i ekcesivnijim oslobađanjem HMGB1. Nakon toga

koncentracija HMGB1 u serumu je opadala naredna tri dana, verovatno zbog obilne peritonelane lavaže koju smo izvodili tokom operacije. Međutim, vrednosti HMGB1 ponovo rastu do sedmog postoperativnog dana, što bi moglo da bude uslovljeno aktivnom sintezom i oslobodanjem HMGB1 iz mononuklearnih ćelija aktiviranih bakterijskim produktima u sklopu inflamatornog odgovora u peritonitisu (265), da bi nakon toga opet vrednosti opale korelišući sa dobrim kliničkim oporavkom operisanih pacijenata. Alternativno, visoka koncentracija HMGB1 bi mogla biti posledica prisustva uporne infekcije ili nekrotičnog fokusa, ali pošto kod pacijenata koji su operisani zbog difuznog peritonitisa nije bila potrebna reintervencija, ne možemo pretpostaviti. Daljom analizom vrednosti HMGB1 u grupi pacijenata SEPSA, identifikovana su tri obrasca ponašanja u vremenu. Jedna grupa pacijenata, definisana niskim preoperativnim vrednostima HMGB1, odlikuje se postepenim porastom HMGB1 koji dostiže maksimum oko petog postoperativnog dana nakon čega postepeno opada; druge dve grupe, obe sa višim preoperativnim vrednostima, se međusobno mogu odvojiti u odnosu na postoperativnu dinamiku: dok "tip 1" pokazuje skok oko drugog postoperativnog dana, nakon čega polako opadaju trećeg postoperativnog dana a zatim vrednosti rastu i dostižu maksimalne vrednosti sedmog postoperativnog dana, "tip 2" ponire do najnižih vrednosti oko trećeg postoperativnog dana, a potom dostiže maksimalne vrednosti petog postoperativnog dana nakon čega vrednosti počinju da opadaju. U grupi SEPSA je bilo 55 pacijenata, tako da je teško pouzdano objasniti postojanje tri različita obrasca ponašanja s obzirom na mali broj ispitanika.

Sa druge strane, u grupi SIRS najniže vrednosti se registruju već prvog postoperativnog dana praćenja, da bi potom postepeno porasle sa maksimumom u trećem postoperativnom danu i oscilirale između te dve vrednosti do kraja perioda praćenja. Ovakav trend ponašanja u grupi SIRS objasnili smo slabijim sistemskim inflamatornim odgovorom kod ovih pacijenata, u odnosu na pacijente iz grupe SEPSA. Kohno i sar. (2011) su analizirali vrednosti HMGB1 kod dvadeset pacijenata nakon operacije aneurizme torakalne aorte i razvijenim SIRS-om, te konstatuju da vrednosti HMGB1 dostižu svoj prvi pik drugog postoperativnog dana nakon čega padaju i ponovo rastu sedmog postoperativnog dana. Našli su da vrednosti HMGB1 korelišu sa težinom i dužinom trajanja SIRS-a (342). Karlsson i sar. (2008) su u studiji u koju su uključili pacijente iz jedinice intenzivne nege, utvrđivali nivo HMGB1 nultog i trećeg dana. Autori potvrđuju da je nivo HMGB1 bio viši kod pacijenata sa sepsom, u odnosu

na zdrave osobe, koje su bile kontrolna grupa. Međutim, nije bilo razlike između pacijenata koji su umrli u odnosu na one koji su preživeli. Zaključuju da HMGB1 nije marker koji ukazuje na mortalitet (343).

Daljom analizom naših rezultata vidimo da su se vrednosti HMGB1 značajno visoko razlikovale u grupi SEPSA u odnosu na grupu SIRS tokom perioda praćenja, šta više obrasci promene vrednosti u vremenu su značajno različite u te dve grupe, što bi moglo biti korisno u razlikovanju sepse od neinfektivnog SIRS-a u sekundarnom peritonitisu.

Sunden-Cullberg i sar. (2005) u studiji su merili nivo HMGB1 kod pacijenata sa teškom sepsom i septičkim šokom i zaključili da su vrednosti HMGB1 ostale povišene nedelju dana, te zaključuju da je HMGB1 marker kasne inflamacije (302).

Van Zoelen i sar. (2007) su istraživali nivo HMGB1 kod pacijenata sa sepsom, nulti i treći dan. Pacijenti sa peritonitisom su imali povišene vrednosti nultog dana ali ne i trećeg postoperativnog dana, dok su se kod pacijenata sa cistitisom povišene vrednosti HMGB1 pojavile tek trećeg dana. Pokazali su da je kinetika oslobađanja HMGB1 zavisila od izvora infekcije, ali nije uticala na mortalitet i ozbiljnost bolesti (344). Gibot i sar. (2005) su istraživali nivoe HMGB1 kod pacijenata sa septičkim šokom. Pokazali su da su povećani nivoi povezani sa težinom septičkog šoka, koji su primećeni trećeg dan, kod pacijenata koji su umrli u odnosu na one koji su preživeli. Taj rezultat je bio povezan sa akutnim oštećenjem tkiva i proinflamatornim efektom HMGB1 (345).

Gaini i sar. (2007) su zaključili da je nivo HMGB1 u korelaciji sa drugim proinflamatornim citokinima i sa stanjem u kome se pacijent nalazi, ali nije povezan sa mortalitetom (340).

Na osnovu dosadašnjih istraživanja, zaključujemo da bi pronalažanje specifičnog markera za dijagnozu sepse, markera koji bi napravio razliku između SIRS-a i sepse i predočio prognozu u peritonitisu, svakakao bio od izuzetnog značaja u lečenju peritonitisa. Mi smo na osnovu našeg istraživanja zaključili da bi HMGB1 protein kao kasni parametar inflamacije, mogao da bude prognostički marker u sekundarnom peritonitisu.

6 ZAKLJUČCI

U skladu sa postavljenim ciljevima, a na osnovu rezultata ove doktorske disertacije, mogu se izvesti sledeći zaključci:

1. Više postoperativne vrednosti HMGB1 proteina u serumu pacijenata sa difuznim sekundarnim peritonitisom, mogle bi biti potencijalni prognostički marker sepse.
2. U ovoj studiji nije bilo umrlih pacijenata, te se na osnovu dobijenih rezultata ne može zaključiti kakva bi bila korist od određivanja HMGB1 u predikciji mortaliteta u uslovima razvijenog septičnog sindroma.
3. Pokazano je da su preoperativne vrednosti CRP-a, PCT-a i HMGB1 bile više u grupi septičnih pacijenata. Međutim, postoperativna kinetika promene ispitivanih markera inflamacije, ukazuje da su SAA i HMGB1 markeri koji su se razlikovali u SIRS-u u odnosu na sepsu.

7 LITERATURA

1. Mazuski JE, Solomkin JS. Intra-abdominal infections. *Surg Clin North Am* 2009;89:421-437, ix.
2. Babinchak T, Ellis-Grosse E, Dartois N, Rose GM, Loh E. The efficacy and safety of tigecycline for the treatment of complicated intra-abdominal infections: analysis of pooled clinical trial data. *Clin Infect Dis* 2005;41 Suppl 5:S354-367.
3. Mazuski JE, Sawyer RG, Nathens AB, DiPiro JT, Schein M, Kudsk KA, Yowler C. The Surgical Infection Society guidelines on antimicrobial therapy for intra-abdominal infections: evidence for the recommendations. *Surg Infect (Larchmt)* 2002;3:175-233.
4. Sartelli M, Catena F, Di Saverio S, Ansaloni L, Malangoni M, Moore EE, Moore FA, et al. Current concept of abdominal sepsis: WSES position paper. *World J Emerg Surg* 2014;9:22.
5. Rau BM, Frigerio I, Buchler MW, Wegscheider K, Bassi C, Puolakkainen PA, Beger HG, et al. Evaluation of procalcitonin for predicting septic multiorgan failure and overall prognosis in secondary peritonitis: a prospective, international multicenter study. *Arch Surg* 2007;142:134-142.
6. Wittmann DH, Schein M, Condon RE. Management of secondary peritonitis. *Ann Surg* 1996;224:10-18.
7. Larosa SP. Sepsis: menu of new approaches replaces one therapy for all. *Cleve Clin J Med* 2002;69:65-73.
8. Schein M, Wittmann DH, Holzheimer R, Condon RE. Hypothesis: compartmentalization of cytokines in intraabdominal infection. *Surgery* 1996;119:694-700.
9. Baue AE, Durham R, Faist E. Systemic inflammatory response syndrome (SIRS), multiple organ dysfunction syndrome (MODS), multiple organ failure (MOF): are we winning the battle? *Shock* 1998;10:79-89.
10. Holzheimer RG, Schein M, Wittmann DH. Inflammatory response in peritoneal exudate and plasma of patients undergoing planned relaparotomy for severe secondary peritonitis. *Arch Surg* 1995;130:1314-1319; discussion 1319-1320.
11. Riche F, Gayat E, Collet C, Mateo J, Laisne MJ, Launay JM, Valleur P, et al. Local and systemic innate immune response to secondary human peritonitis. *Crit Care* 2013;17:R201.

12. Angus DC, van der Poll T. Severe sepsis and septic shock. *N Engl J Med* 2013;369:2063.
13. Dellinger RP, Levy MM, Rhodes A, Annane D, Gerlach H, Opal SM, Sevransky JE, et al. Surviving sepsis campaign: international guidelines for management of severe sepsis and septic shock: 2012. *Crit Care Med* 2013;41:580-637.
14. Sartelli M, Viale P, Catena F, Ansaloni L, Moore E, Malangoni M, Moore FA, et al. 2013 WSES guidelines for management of intra-abdominal infections. *World J Emerg Surg* 2013;8:3.
15. Emmi V, Sganga G. [Diagnosis of intra-abdominal infections: clinical findings and imaging]. *Infez Med* 2008;16 Suppl 1:19-30.
16. Ceribelli C, Adami EA, Mattia S, Benini B. Bedside diagnostic laparoscopy for critically ill patients: a retrospective study of 62 patients. *Surg Endosc* 2012;26:3612-3615.
17. White LE, Hassoun HT, Bihorac A, Moore LJ, Sailors RM, McKinley BA, Valdivia A, et al. Acute kidney injury is surprisingly common and a powerful predictor of mortality in surgical sepsis. *J Trauma Acute Care Surg* 2013;75:432-438.
18. Marshall JC. Principles of source control in the early management of sepsis. *Curr Infect Dis Rep* 2010;12:345-353.
19. Wacha H, Hau T, Dittmer R, Ohmann C. Risk factors associated with intraabdominal infections: a prospective multicenter study. Peritonitis Study Group. *Langenbecks Arch Surg* 1999;384:24-32.
20. Sugimoto K, Hirata M, Kikuno T, Takishima T, Maekawa K, Ohwada T. Large-volume intraoperative peritoneal lavage with an assistant device for treatment of peritonitis caused by blunt traumatic rupture of the small bowel. *J Trauma* 1995;39:689-692.
21. Lopez N, Kobayashi L, Coimbra R. A Comprehensive review of abdominal infections. *World J Emerg Surg* 2011;6:7.
22. Koperna T, Semmler D, Marian F. Risk stratification in emergency surgical patients: is the APACHE II score a reliable marker of physiological impairment? *Arch Surg* 2001;136:55-59.
23. van Ruler O, Kiewiet JJ, Boer KR, Lamme B, Gouma DJ, Boermeester MA, Reitsma JB. Failure of available scoring systems to predict ongoing infection in patients with abdominal sepsis after their initial emergency laparotomy. *BMC Surg* 2011;11:38.

24. Robledo FA, Luque-de-Leon E, Suarez R, Sanchez P, de-la-Fuente M, Vargas A, Mier J. Open versus closed management of the abdomen in the surgical treatment of severe secondary peritonitis: a randomized clinical trial. *Surg Infect (Larchmt)* 2007;8:63-72.
25. Koperna T, Schulz F. Relaparotomy in peritonitis: prognosis and treatment of patients with persisting intraabdominal infection. *World J Surg* 2000;24:32-37.
26. van Ruler O, Lamme B, de Vos R, Obertop H, Reitsma JB, Boermeester MA. Decision making for relaparotomy in secondary peritonitis. *Dig Surg* 2008;25:339-346.
27. Lamme B, Mahler CW, van Ruler O, Gouma DJ, Reitsma JB, Boermeester MA. Clinical predictors of ongoing infection in secondary peritonitis: systematic review. *World J Surg* 2006;30:2170-2181.
28. Hinsdale JG, Jaffe BM. Re-operation for intra-abdominal sepsis. Indications and results in modern critical care setting. *Ann Surg* 1984;199:31-36.
29. Hutchins RR, Gunning MP, Lucas DN, Allen-Mersh TG, Soni NC. Relaparotomy for suspected intraperitoneal sepsis after abdominal surgery. *World J Surg* 2004;28:137-141.
30. van Ruler O, Lamme B, Gouma DJ, Reitsma JB, Boermeester MA. Variables associated with positive findings at relaparotomy in patients with secondary peritonitis. *Crit Care Med* 2007;35:468-476.
31. Holzheimer RG, Gathof B. Re-operation for complicated secondary peritonitis - how to identify patients at risk for persistent sepsis. *Eur J Med Res* 2003;8:125-134.
32. Kirkpatrick AW, Roberts DJ, De Waele J, Jaeschke R, Malbrain ML, De Keulenaer B, Duchesne J, et al. Intra-abdominal hypertension and the abdominal compartment syndrome: updated consensus definitions and clinical practice guidelines from the World Society of the Abdominal Compartment Syndrome. *Intensive Care Med* 2013;39:1190-1206.
33. Merrell RC. The abdomen as source of sepsis in critically ill patients. *Crit Care Clin* 1995;11:255-272.
34. Waibel BH, Rotondo MF. Damage control in trauma and abdominal sepsis. *Crit Care Med* 2010;38:S421-430.
35. Jansen JO, Loudon MA. Damage control surgery in a non-trauma setting. *Br J Surg* 2007;94:789-790.

36. Amin AI, Shaikh IA. Topical negative pressure in managing severe peritonitis: a positive contribution? *World J Gastroenterol* 2009;15:3394-3397.
37. Schmelzle M, Alldinger I, Matthaei H, Aydin F, Wallert I, Eisenberger CF, Schulte Am Esch J, 2nd, et al. Long-term vacuum-assisted closure in open abdomen due to secondary peritonitis: a retrospective evaluation of a selected group of patients. *Dig Surg* 2010;27:272-278.
38. Schein M. Planned reoperations and open management in critical intra-abdominal infections: prospective experience in 52 cases. *World J Surg* 1991;15:537-545.
39. Adkins AL, Robbins J, Villalba M, Bendick P, Shanley CJ. Open abdomen management of intra-abdominal sepsis. *Am Surg* 2004;70:137-140; discussion 140.
40. Horwood J, Akbar F, Maw A. Initial experience of laparostomy with immediate vacuum therapy in patients with severe peritonitis. *Ann R Coll Surg Engl* 2009;91:681-687.
41. Demetriades D. Total management of the open abdomen. *Int Wound J* 2012;9 Suppl 1:17-24.
42. Paul JS, Ridolfi TJ. A case study in intra-abdominal sepsis. *Surg Clin North Am* 2012;92:1661-1677.
43. Moore LJ, Moore FA. Epidemiology of sepsis in surgical patients. *Surg Clin North Am* 2012;92:1425-1443.
44. Ordonez CA, Pino LF, Badiel M, Sanchez AI, Loaiza J, Ballestas L, Puyana JC. Safety of performing a delayed anastomosis during damage control laparotomy in patients with destructive colon injuries. *J Trauma* 2011;71:1512-1517; discussion 1517-1518.
45. Ordonez CA, Sanchez AI, Pineda JA, Badiel M, Mesa R, Cardona U, Arias R, et al. Deferred primary anastomosis versus diversion in patients with severe secondary peritonitis managed with staged laparotomies. *World J Surg* 2010;34:169-176.
46. Yuan Y, Ren J, He Y. Current status of the open abdomen treatment for intra-abdominal infection. *Gastroenterol Res Pract* 2013;2013:532013.
47. Padalino P, Dionigi G, Minoja G, Carcano G, Rovera F, Boni L, Dionigi R. Fascia-to-fascia closure with abdominal topical negative pressure for severe

- abdominal infections: preliminary results in a department of general surgery and intensive care unit. *Surg Infect (Larchmt)* 2010;11:523-528.
48. Tsuei BJ, Skinner JC, Bernard AC, Kearney PA, Boulanger BR. The open peritoneal cavity: etiology correlates with the likelihood of fascial closure. *Am Surg* 2004;70:652-656.
 49. Pliakos I, Papavramidis TS, Mihalopoulos N, Koulouris H, Kesisoglou I, Sapalidis K, Deligiannidis N, et al. Vacuum-assisted closure in severe abdominal sepsis with or without retention sutured sequential fascial closure: a clinical trial. *Surgery* 2010;148:947-953.
 50. Plaudis H, Rudzats A, Melberga L, Kazaka I, Suba O, Pupelis G. Abdominal negative-pressure therapy: a new method in countering abdominal compartment and peritonitis - prospective study and critical review of literature. *Ann Intensive Care* 2012;2 Suppl 1:S23.
 51. Agresta F, Ciardo LF, Mazzarolo G, Michelet I, Orsi G, Trentin G, Bedin N. Peritonitis: laparoscopic approach. *World J Emerg Surg* 2006;1:9.
 52. Anderson ID, Fearon KC, Grant IS. Laparotomy for abdominal sepsis in the critically ill. *Br J Surg* 1996;83:535-539.
 53. Ferrer R, Artigas A, Suarez D, Palencia E, Levy MM, Arenzana A, Perez XL, et al. Effectiveness of treatments for severe sepsis: a prospective, multicenter, observational study. *Am J Respir Crit Care Med* 2009;180:861-866.
 54. Castellanos-Ortega A, Suberviola B, Garcia-Astudillo LA, Holanda MS, Ortiz F, Llorca J, Delgado-Rodriguez M. 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;38:1036-1043.
 55. Puskarich MA, Trzeciak S, Shapiro NI, Arnold RC, Horton JM, Studnek JR, Kline JA, et al. Association between timing of antibiotic administration and mortality from septic shock in patients treated with a quantitative resuscitation protocol. *Crit Care Med* 2011;39:2066-2071.
 56. Riche FC, Dray X, Laisne MJ, Mateo J, Raskine L, Sanson-Le Pors MJ, Payen D, et al. Factors associated with septic shock and mortality in generalized peritonitis: comparison between community-acquired and postoperative peritonitis. *Crit Care* 2009;13:R99.

57. Hoffken G, Niederman MS. Nosocomial pneumonia: the importance of a de-escalating strategy for antibiotic treatment of pneumonia in the ICU. *Chest* 2002;122:2183-2196.
58. Rello J, Vidaur L, Sandiumenge A, Rodriguez A, Gualis B, Boque C, Diaz E. De-escalation therapy in ventilator-associated pneumonia. *Crit Care Med* 2004;32:2183-2190.
59. Pea F, Viale P. Bench-to-bedside review: Appropriate antibiotic therapy in severe sepsis and septic shock--does the dose matter? *Crit Care* 2009;13:214.
60. Solomkin JS, Mazuski JE, Bradley JS, Rodvold KA, Goldstein EJ, Baron EJ, O'Neill PJ, et al. Diagnosis and management of complicated intra-abdominal infection in adults and children: guidelines by the Surgical Infection Society and the Infectious Diseases Society of America. *Surg Infect (Larchmt)* 2010;11:79-109.
61. Roberts JA, Lipman J, Blot S, Rello J. Better outcomes through continuous infusion of time-dependent antibiotics to critically ill patients? *Curr Opin Crit Care* 2008;14:390-396.
62. Powell LL, Wilson SE. The role of beta-lactam antimicrobials as single agents in treatment of intra-abdominal infection. *Surg Infect (Larchmt)* 2000;1:57-63.
63. Al-Hasan MN, Lahr BD, Eckel-Passow JE, Baddour LM. Antimicrobial resistance trends of *Escherichia coli* bloodstream isolates: a population-based study, 1998-2007. *J Antimicrob Chemother* 2009;64:169-174.
64. Jones RN, Huynh HK, Biedenbach DJ, Fritsche TR, Sader HS. Doripenem (S-4661), a novel carbapenem: comparative activity against contemporary pathogens including bactericidal action and preliminary in vitro methods evaluations. *J Antimicrob Chemother* 2004;54:144-154.
65. Brown SD, Traczewski MM. Comparative in vitro antimicrobial activity of a new carbapenem, doripenem: tentative disc diffusion criteria and quality control. *J Antimicrob Chemother* 2005;55:944-949.
66. Michalopoulos AS, Karatza DC. Multidrug-resistant Gram-negative infections: the use of colistin. *Expert Rev Anti Infect Ther* 2010;8:1009-1017.
67. Papaparaskevas J, Tzouveleki LS, Tsakris A, Pittaras TE, Legakis NJ. In vitro activity of tigecycline against 2423 clinical isolates and comparison of the available interpretation breakpoints. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2010;66:187-194.

68. Sekowska A, Gospodarek E. Susceptibility of *Klebsiella* spp. to tigecycline and other selected antibiotics. *Med Sci Monit* 2010;16:Br193-196.
69. Pfaller MA, Diekema DJ. Epidemiology of invasive candidiasis: a persistent public health problem. *Clin Microbiol Rev* 2007;20:133-163.
70. Karimova A, Pinsky DJ. The endothelial response to oxygen deprivation: biology and clinical implications. *Intensive Care Med* 2001;27:19-31.
71. Benjamin E, Leibowitz AB, Oropello J, Iberti TJ. Systemic hypoxic and inflammatory syndrome: an alternative designation for "sepsis syndrome". *Crit Care Med* 1992;20:680-682.
72. Rivers E, Nguyen B, Havstad S, Ressler J, Muzzin A, Knoblich B, Peterson E, et al. Early goal-directed therapy in the treatment of severe sepsis and septic shock. *N Engl J Med* 2001;345:1368-1377.
73. Walker J, Criddle LM. Pathophysiology and management of abdominal compartment syndrome. *Am J Crit Care* 2003;12:367-371; quiz 372-363.
74. Martin C, Papazian L, Perrin G, Saux P, Gouin F. Norepinephrine or dopamine for the treatment of hyperdynamic septic shock? *Chest* 1993;103:1826-1831.
75. De Backer D, Aldecoa C, Njimi H, Vincent JL. Dopamine versus norepinephrine in the treatment of septic shock: a meta-analysis*. *Crit Care Med* 2012;40:725-730.
76. Myburgh JA, Higgins A, Jovanovska A, Lipman J, Ramakrishnan N, Santamaria J. A comparison of epinephrine and norepinephrine in critically ill patients. *Intensive Care Med* 2008;34:2226-2234.
77. Holmes CL, Patel BM, Russell JA, Walley KR. Physiology of vasopressin relevant to management of septic shock. *Chest* 2001;120:989-1002.
78. Annane D. Corticosteroids for severe sepsis: an evidence-based guide for physicians. *Ann Intensive Care* 2011;1:7.
79. Cohen J, Chin w D. Nutrition and sepsis. *World Rev Nutr Diet* 2013;105:116-125.
80. Angus DC, Linde-Zwirble WT, Lidicker J, Clermont G, Carcillo J, Pinsky MR. Epidemiology of severe sepsis in the United States: analysis of incidence, outcome, and associated costs of care. *Crit Care Med* 2001;29:1303-1310.
81. Bone RC, Balk RA, Cerra FB, Dellinger RP, Fein AM, Knaus WA, Schein RM, et al. Definitions for sepsis and organ failure and guidelines for the use of innovative therapies in sepsis. The ACCP/SCCM Consensus Conference Committee.

- American College of Chest Physicians/Society of Critical Care Medicine. *Chest* 1992;101:1644-1655.
82. Knaus WA, Draper EA, Wagner DP, Zimmerman JE. APACHE II: a severity of disease classification system. *Crit Care Med* 1985;13:818-829.
 83. Brown PE, McClave SA, Hoy NW, Short AF, Sexton LK, Meyer KL. The Acute Physiology and Chronic Health Evaluation II classification system is a valid marker for physiologic stress in the critically ill patient. *Crit Care Med* 1993;21:363-367.
 84. Knaus WA, Wagner DP, Draper EA, Zimmerman JE, Bergner M, Bastos PG, Sirio CA, et al. The APACHE III prognostic system. Risk prediction of hospital mortality for critically ill hospitalized adults. *Chest* 1991;100:1619-1636.
 85. Daabiss M. American Society of Anaesthesiologists physical status classification. *Indian J Anaesth* 2011;55:111-115.
 86. Tiret L, Hatton F, Desmonts JM, Vourc'h G. Prediction of outcome of anaesthesia in patients over 40 years: a multifactorial risk index. *Stat Med* 1988;7:947-954.
 87. Tang R, Chen HH, Wang YL, Changchien CR, Chen JS, Hsu KC, Chiang JM, et al. Risk factors for surgical site infection after elective resection of the colon and rectum: a single-center prospective study of 2,809 consecutive patients. *Ann Surg* 2001;234:181-189.
 88. Sauvanet A, Mariette C, Thomas P, Lozac'h P, Segol P, Tiret E, Delpero JR, et al. Mortality and morbidity after resection for adenocarcinoma of the gastroesophageal junction: predictive factors. *J Am Coll Surg* 2005;201:253-262.
 89. Vincent JL, Opal SM, Marshall JC, Tracey KJ. Sepsis definitions - Authors' reply. *Lancet* 2013;381:2250.
 90. Weber GF, Swirski FK. Immunopathogenesis of abdominal sepsis. *Langenbecks Arch Surg* 2014;399:1-9.
 91. Netea MG, Ferwerda G, van der Graaf CA, Van der Meer JW, Kullberg BJ. Recognition of fungal pathogens by toll-like receptors. *Curr Pharm Des* 2006;12:4195-4201.
 92. Cinel I, Dellinger RP. Advances in pathogenesis and management of sepsis. *Curr Opin Infect Dis* 2007;20:345-352.

93. Medzhitov R, Shevach EM, Trinchieri G, Mellor AL, Munn DH, Gordon S, Libby P, et al. Highlights of 10 years of immunology in Nature Reviews Immunology. *Nat Rev Immunol* 2011;11:693-702.
94. Grunwald U, Fan X, Jack RS, Workalemahu G, Kallies A, Stelter F, Schutt C. Monocytes can phagocytose Gram-negative bacteria by a CD14-dependent mechanism. *J Immunol* 1996;157:4119-4125.
95. Karima R, Matsumoto S, Higashi H, Matsushima K. The molecular pathogenesis of endotoxic shock and organ failure. *Mol Med Today* 1999;5:123-132.
96. Hotchkiss RS, Karl IE. The pathophysiology and treatment of sepsis. *N Engl J Med* 2003;348:138-150.
97. Lotze MT, Tracey KJ. High-mobility group box 1 protein (HMGB1): nuclear weapon in the immune arsenal. *Nat Rev Immunol* 2005;5:331-342.
98. Medzhitov R. Toll-like receptors and innate immunity. *Nat Rev Immunol* 2001;1:135-145.
99. Aksoy E, Taboubi S, Torres D, Delbauve S, Hachani A, Whitehead MA, Pearce WP, et al. The p110delta isoform of the kinase PI(3)K controls the subcellular compartmentalization of TLR4 signaling and protects from endotoxic shock. *Nat Immunol* 2012;13:1045-1054.
100. Kayagaki N, Warming S, Lamkanfi M, Vande Walle L, Louie S, Dong J, Newton K, et al. Non-canonical inflammasome activation targets caspase-11. *Nature* 2011;479:117-121.
101. Kayagaki N, Wong MT, Stowe IB, Ramani SR, Gonzalez LC, Akashi-Takamura S, Miyake K, et al. Noncanonical inflammasome activation by intracellular LPS independent of TLR4. *Science* 2013;341:1246-1249.
102. Hagar JA, Powell DA, Aachoui Y, Ernst RK, Miao EA. Cytoplasmic LPS activates caspase-11: implications in TLR4-independent endotoxic shock. *Science* 2013;341:1250-1253.
103. Berland R, Wortis HH. Origins and functions of B-1 cells with notes on the role of CD5. *Annu Rev Immunol* 2002;20:253-300.
104. Herzenberg LA. B-1 cells: the lineage question revisited. *Immunol Rev* 2000;175:9-22.
105. Boes M. Role of natural and immune IgM antibodies in immune responses. *Mol Immunol* 2000;37:1141-1149.

106. Parker W, Yu PB, Holznecht ZE, Lundberg K, Buckley RH, Platt JL. Specificity and function of "natural" antibodies in immunodeficient subjects: clues to B cell lineage and development. *J Clin Immunol* 1997;17:311-321.
107. Zhang M, Austen WG, Jr., Chiu I, Alicot EM, Hung R, Ma M, Verna N, et al. Identification of a specific self-reactive IgM antibody that initiates intestinal ischemia/reperfusion injury. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004;101:3886-3891.
108. Hou L, Sasakj H, Stashenko P. B-Cell deficiency predisposes mice to disseminating anaerobic infections: protection by passive antibody transfer. *Infect Immun* 2000;68:5645-5651.
109. Ehrenstein MR, Notley CA. The importance of natural IgM: scavenger, protector and regulator. *Nat Rev Immunol* 2010;10:778-786.
110. Litvack ML, Post M, Palaniyar N. IgM promotes the clearance of small particles and apoptotic microparticles by macrophages. *PLoS One* 2011;6:e17223.
111. Rauch PJ, Chudnovskiy A, Robbins CS, Weber GF, Etzrodt M, Hilgendorf I, Tiglao E, et al. Innate response activator B cells protect against microbial sepsis. *Science* 2012;335:597-601.
112. Baumgarth N. The double life of a B-1 cell: self-reactivity selects for protective effector functions. *Nat Rev Immunol* 2011;11:34-46.
113. Hamilton JA. Colony-stimulating factors in inflammation and autoimmunity. *Nat Rev Immunol* 2008;8:533-544.
114. Hamilton JA, Achuthan A. Colony stimulating factors and myeloid cell biology in health and disease. *Trends Immunol* 2013;34:81-89.
115. Yousefi S, Gold JA, Andina N, Lee JJ, Kelly AM, Kozlowski E, Schmid I, et al. Catapult-like release of mitochondrial DNA by eosinophils contributes to antibacterial defense. *Nat Med* 2008;14:949-953.
116. Linch SN, Danielson ET, Kelly AM, Tamakawa RA, Lee JJ, Gold JA. Interleukin 5 is protective during sepsis in an eosinophil-independent manner. *Am J Respir Crit Care Med* 2012;186:246-254.
117. Nathan C. Neutrophils and immunity: challenges and opportunities. *Nat Rev Immunol* 2006;6:173-182.
118. Nathan C. Points of control in inflammation. *Nature* 2002;420:846-852.
119. Spiller F, Costa C, Souto FO, Vinchi F, Mestriner FL, Laure HJ, Alves-Filho JC, et al. Inhibition of neutrophil migration by hemopexin leads to increased mortality due to sepsis in mice. *Am J Respir Crit Care Med* 2011;183:922-931.

120. Ihle JN, Pepersack L, Rebar L. Regulation of T cell differentiation: in vitro induction of 20 alpha-hydroxysteroid dehydrogenase in splenic lymphocytes from athymic mice by a unique lymphokine. *J Immunol* 1981;126:2184-2189.
121. Yang YC, Ciarletta AB, Temple PA, Chung MP, Kovacic S, Witek-Giannotti JS, Leary AC, et al. Human IL-3 (multi-CSF): identification by expression cloning of a novel hematopoietic growth factor related to murine IL-3. *Cell* 1986;47:3-10.
122. Inoue S, Suzuki-Utsunomiya K, Okada Y, Taira T, Iida Y, Miura N, Tsuji T, et al. Reduction of immunocompetent T cells followed by prolonged lymphopenia in severe sepsis in the elderly. *Crit Care Med* 2013;41:810-819.
123. Boomer JS, To K, Chang KC, Takasu O, Osborne DF, Walton AH, Bricker TL, et al. Immunosuppression in patients who die of sepsis and multiple organ failure. *Jama* 2011;306:2594-2605.
124. Aird WC. The role of the endothelium in severe sepsis and multiple organ dysfunction syndrome. *Blood* 2003;101:3765-3777.
125. Springer TA. Traffic signals for lymphocyte recirculation and leukocyte emigration: the multistep paradigm. *Cell* 1994;76:301-314.
126. Bechard D, Meignin V, Scherpereel A, Oudin S, Kervoaze G, Bertheau P, Janin A, et al. Characterization of the secreted form of endothelial-cell-specific molecule 1 by specific monoclonal antibodies. *J Vasc Res* 2000;37:417-425.
127. Lassalle P, Molet S, Janin A, Heyden JV, Tavernier J, Fiers W, Devos R, et al. ESM-1 is a novel human endothelial cell-specific molecule expressed in lung and regulated by cytokines. *J Biol Chem* 1996;271:20458-20464.
128. Cavaillon JM. Pro- versus anti-inflammatory cytokines: myth or reality. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)* 2001;47:695-702.
129. Gordon S. Alternative activation of macrophages. *Nat Rev Immunol* 2003;3:23-35.
130. Mantovani A, Sica A, Sozzani S, Allavena P, Vecchi A, Locati M. The chemokine system in diverse forms of macrophage activation and polarization. *Trends Immunol* 2004;25:677-686.
131. Abraham E. Neutrophils and acute lung injury. *Crit Care Med* 2003;31:S195-199.
132. Smith JA. Neutrophils, host defense, and inflammation: a double-edged sword. *J Leukoc Biol* 1994;56:672-686.

133. Marshall JC. Neutrophils in the pathogenesis of sepsis. *Crit Care Med* 2005;33:S502-505.
134. Harter L, Mica L, Stocker R, Trentz O, Keel M. Increased expression of toll-like receptor-2 and -4 on leukocytes from patients with sepsis. *Shock* 2004;22:403-409.
135. Hampton MB, Kettle AJ, Winterbourn CC. Inside the neutrophil phagosome: oxidants, myeloperoxidase, and bacterial killing. *Blood* 1998;92:3007-3017.
136. Fink MP, Delude RL. Epithelial barrier dysfunction: a unifying theme to explain the pathogenesis of multiple organ dysfunction at the cellular level. *Crit Care Clin* 2005;21:177-196.
137. Menconi MJ, Unno N, Smith M, Aguirre DE, Fink MP. Nitric oxide donor-induced hyperpermeability of cultured intestinal epithelial monolayers: role of superoxide radical, hydroxyl radical, and peroxynitrite. *Biochim Biophys Acta* 1998;1425:189-203.
138. Chavez AM, Menconi MJ, Hodin RA, Fink MP. Cytokine-induced intestinal epithelial hyperpermeability: role of nitric oxide. *Crit Care Med* 1999;27:2246-2251.
139. Han X, Fink MP, Yang R, Delude RL. Increased iNOS activity is essential for intestinal epithelial tight junction dysfunction in endotoxemic mice. *Shock* 2004;21:261-270.
140. Han X, Fink MP, Uchiyama T, Yang R, Delude RL. Increased iNOS activity is essential for pulmonary epithelial tight junction dysfunction in endotoxemic mice. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2004;286:L259-267.
141. Han X, Fink MP, Uchiyama T, Yang R, Delude RL. Increased iNOS activity is essential for hepatic epithelial tight junction dysfunction in endotoxemic mice. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2004;286:G126-136.
142. Alverdy JC, Laughlin RS, Wu L. Influence of the critically ill state on host-pathogen interactions within the intestine: gut-derived sepsis redefined. *Crit Care Med* 2003;31:598-607.
143. Coopersmith CM, Stromberg PE, Davis CG, Dunne WM, Amiot DM, 2nd, Karl IE, Hotchkiss RS, et al. Sepsis from *Pseudomonas aeruginosa* pneumonia decreases intestinal proliferation and induces gut epithelial cell cycle arrest. *Crit Care Med* 2003;31:1630-1637.

144. Ayala A, Chaudry IH. Immune dysfunction in murine polymicrobial sepsis: mediators, macrophages, lymphocytes and apoptosis. *Shock* 1996;6 Suppl 1:S27-38.
145. Tracey KJ, Fong Y, Hesse DG, Manogue KR, Lee AT, Kuo GC, Lowry SF, et al. Anti-cachectin/TNF monoclonal antibodies prevent septic shock during lethal bacteraemia. *Nature* 1987;330:662-664.
146. Hesse DG, Tracey KJ, Fong Y, Manogue KR, Palladino MA, Jr., Cerami A, Shires GT, et al. Cytokine appearance in human endotoxemia and primate bacteremia. *Surg Gynecol Obstet* 1988;166:147-153.
147. Marano MA, Fong Y, Moldawer LL, Wei H, Calvano SE, Tracey KJ, Barie PS, et al. Serum cachectin/tumor necrosis factor in critically ill patients with burns correlates with infection and mortality. *Surg Gynecol Obstet* 1990;170:32-38.
148. Balint B. Cotokini-hemobiološki modiferi. *Transuziologija* 2004;21:563-587.
149. Tracey KJ, Beutler B, Lowry SF, Merryweather J, Wolpe S, Milsark IW, Hariri RJ, et al. Shock and tissue injury induced by recombinant human cachectin. *Science* 1986;234:470-474.
150. Tracey KJ, Lowry SF, Fahey TJ, 3rd, Albert JD, Fong Y, Hesse D, Beutler B, et al. Cachectin/tumor necrosis factor induces lethal shock and stress hormone responses in the dog. *Surg Gynecol Obstet* 1987;164:415-422.
151. Dinarello CA. The role of interleukin-1 in host responses to infectious diseases. *Infect Agents Dis* 1992;1:227-236.
152. Dinarello CA, Thompson RC. Blocking IL-1: interleukin 1 receptor antagonist in vivo and in vitro. *Immunol Today* 1991;12:404-410.
153. Febbraio MA, Pedersen BK. Contraction-induced myokine production and release: is skeletal muscle an endocrine organ? *Exerc Sport Sci Rev* 2005;33:114-119.
154. van der Poll T, Keogh CV, Guirao X, Buurman WA, Kopf M, Lowry SF. Interleukin-6 gene-deficient mice show impaired defense against pneumococcal pneumonia. *J Infect Dis* 1997;176:439-444.
155. Block MI, Berg M, McNamara MJ, Norton JA, Fraker DL, Alexander HR. Passive immunization of mice against D factor blocks lethality and cytokine release during endotoxemia. *J Exp Med* 1993;178:1085-1090.

156. Waring PM, Waring LJ, Metcalf D. Circulating leukemia inhibitory factor levels correlate with disease severity in meningococemia. *J Infect Dis* 1994;170:1224-1228.
157. Doherty GM, Lange JR, Langstein HN, Alexander HR, Buresh CM, Norton JA. Evidence for IFN-gamma as a mediator of the lethality of endotoxin and tumor necrosis factor-alpha. *J Immunol* 1992;149:1666-1670.
158. Heinzl FP. The role of IFN-gamma in the pathology of experimental endotoxemia. *J Immunol* 1990;145:2920-2924.
159. Bernhagen J, Calandra T, Mitchell RA, Martin SB, Tracey KJ, Voelter W, Manogue KR, et al. MIF is a pituitary-derived cytokine that potentiates lethal endotoxaemia. *Nature* 1993;365:756-759.
160. Calandra T, Echtenacher B, Roy DL, Pugin J, Metz CN, Hultner L, Heumann D, et al. Protection from septic shock by neutralization of macrophage migration inhibitory factor. *Nat Med* 2000;6:164-170.
161. Venet F, Pachot A, Debard AL, Bohe J, Bienvenu J, Lepape A, Monneret G. Increased percentage of CD4+CD25+ regulatory T cells during septic shock is due to the decrease of CD4+CD25- lymphocytes. *Crit Care Med* 2004;32:2329-2331.
162. Knudsen PJ, Dinarello CA, Strom TB. Prostaglandins posttranscriptionally inhibit monocyte expression of interleukin 1 activity by increasing intracellular cyclic adenosine monophosphate. *J Immunol* 1986;137:3189-3194.
163. Zhang M, Caragine T, Wang H, Cohen PS, Botchkina G, Soda K, Bianchi M, et al. Spermine inhibits proinflammatory cytokine synthesis in human mononuclear cells: a counterregulatory mechanism that restrains the immune response. *J Exp Med* 1997;185:1759-1768.
164. Zhang M, Borovikova LV, Wang H, Metz C, Tracey KJ. Spermine inhibition of monocyte activation and inflammation. *Mol Med* 1999;5:595-605.
165. Wang H, Zhang M, Bianchi M, Sherry B, Sama A, Tracey KJ. Fetuin (alpha2-HS-glycoprotein) opsonizes cationic macrophage deactivating molecules. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998;95:14429-14434.
166. Zhang M, Wang H, Tracey KJ. Regulation of macrophage activation and inflammation by spermine: a new chapter in an old story. *Crit Care Med* 2000;28:N60-66.

167. Tsunawaki S, Sporn M, Ding A, Nathan C. Deactivation of macrophages by transforming growth factor-beta. *Nature* 1988;334:260-262.
168. Astiz M, Saha D, Lustbader D, Lin R, Rackow E. Monocyte response to bacterial toxins, expression of cell surface receptors, and release of anti-inflammatory cytokines during sepsis. *J Lab Clin Med* 1996;128:594-600.
169. Manjuck J, Saha DC, Astiz M, Eales LJ, Rackow EC. Decreased response to recall antigens is associated with depressed costimulatory receptor expression in septic critically ill patients. *J Lab Clin Med* 2000;135:153-160.
170. Nierhaus A, Montag B, Timmler N, Frings DP, Gutensohn K, Jung R, Schneider CG, et al. Reversal of immunoparalysis by recombinant human granulocyte-macrophage colony-stimulating factor in patients with severe sepsis. *Intensive Care Med* 2003;29:646-651.
171. Ayala A, Lomas JL, Grutkoski PS, Chung CS. Pathological aspects of apoptosis in severe sepsis and shock? *Int J Biochem Cell Biol* 2003;35:7-15.
172. Adib-Conquy M, Moine P, Asehnoune K, Edouard A, Espevik T, Miyake K, Werts C, et al. Toll-like receptor-mediated tumor necrosis factor and interleukin-10 production differ during systemic inflammation. *Am J Respir Crit Care Med* 2003;168:158-164.
173. Kawasaki T, Ogata M, Kawasaki C, Tomihisa T, Okamoto K, Shigematsu A. Surgical stress induces endotoxin hyporesponsiveness and an early decrease of monocyte mCD14 and HLA-DR expression during surgery. *Anesth Analg* 2001;92:1322-1326.
174. Petit-Bertron AF, Pedron T, Gross U, Coppee JY, Sansonetti PJ, Cavillon JM, Adib-Conquy M. Adherence modifies the regulation of gene expression induced by interleukin-10. *Cytokine* 2005;29:1-12.
175. Borovikova LV, Ivanova S, Zhang M, Yang H, Botchkina GI, Watkins LR, Wang H, et al. Vagus nerve stimulation attenuates the systemic inflammatory response to endotoxin. *Nature* 2000;405:458-462.
176. Levi M, de Jonge E, van der Poll T, ten Cate H. Disseminated intravascular coagulation. *Thromb Haemost* 1999;82:695-705.
177. Shimamura K, Oka K, Nakazawa M, Kojima M. Distribution patterns of microthrombi in disseminated intravascular coagulation. *Arch Pathol Lab Med* 1983;107:543-547.

178. Creasey AA, Chang AC, Feigen L, Wun TC, Taylor FB, Jr., Hinshaw LB. Tissue factor pathway inhibitor reduces mortality from Escherichia coli septic shock. *J Clin Invest* 1993;91:2850-2860.
179. Fourrier F, Chopin C, Goudemand J, Hendrycx S, Caron C, Rime A, Marey A, et al. Septic shock, multiple organ failure, and disseminated intravascular coagulation. Compared patterns of antithrombin III, protein C, and protein S deficiencies. *Chest* 1992;101:816-823.
180. Levi M, de Jonge E, van der Poll T. Rationale for restoration of physiological anticoagulant pathways in patients with sepsis and disseminated intravascular coagulation. *Crit Care Med* 2001;29:S90-94.
181. Guo RF, Ward PA. Role of C5a in inflammatory responses. *Annu Rev Immunol* 2005;23:821-852.
182. Jansen PM, Eisele B, de Jong IW, Chang A, Delvos U, Taylor FB, Jr., Hack CE. Effect of C1 inhibitor on inflammatory and physiologic response patterns in primates suffering from lethal septic shock. *J Immunol* 1998;160:475-484.
183. Fischer MB, Prodeus AP, Nicholson-Weller A, Ma M, Murrow J, Reid RR, Warren HB, et al. Increased susceptibility to endotoxin shock in complement C3- and C4-deficient mice is corrected by C1 inhibitor replacement. *J Immunol* 1997;159:976-982.
184. Bernard GR, Vincent JL, Laterre PF, LaRosa SP, Dhainaut JF, Lopez-Rodriguez A, Steingrub JS, et al. Efficacy and safety of recombinant human activated protein C for severe sepsis. *N Engl J Med* 2001;344:699-709.
185. Mesters RM, Helterbrand J, Utterback BG, Yan B, Chao YB, Fernandez JA, Griffin JH, et al. Prognostic value of protein C concentrations in neutropenic patients at high risk of severe septic complications. *Crit Care Med* 2000;28:2209-2216.
186. Marlar RA, Endres-Brooks J, Miller C. Serial studies of protein C and its plasma inhibitor in patients with disseminated intravascular coagulation. *Blood* 1985;66:59-63.
187. Bernard GR, Macias WL, Joyce DE, Williams MD, Bailey J, Vincent JL. Safety assessment of drotrecogin alfa (activated) in the treatment of adult patients with severe sepsis. *Crit Care* 2003;7:155-163.
188. de Jonge E, van der Poll T, Kesecioglu J, Levi M. Anticoagulant factor concentrates in disseminated intravascular coagulation: rationale for use and clinical experience. *Semin Thromb Hemost* 2001;27:667-674.

189. Ely EW, Bernard GR, Vincent JL. Activated protein C for severe sepsis. *N Engl J Med* 2002;347:1035-1036.
190. Hesselvik JF, Malm J, Dahlback B, Blomback M. Protein C, protein S and C4b-binding protein in severe infection and septic shock. *Thromb Haemost* 1991;65:126-129.
191. Vincent JL, Angus DC, Artigas A, Kalil A, Basson BR, Jamal HH, Johnson G, 3rd, et al. Effects of drotrecogin alfa (activated) on organ dysfunction in the PROWESS trial. *Crit Care Med* 2003;31:834-840.
192. Bernard GR, Ely EW, Wright TJ, Fraiz J, Stasek JE, Jr., Russell JA, Mayers I, et al. Safety and dose relationship of recombinant human activated protein C for coagulopathy in severe sepsis. *Crit Care Med* 2001;29:2051-2059.
193. Vanderschueren S, De Weerd A, Malbrain M, Vankersschaever D, Frans E, Wilmer A, Bobbaers H. Thrombocytopenia and prognosis in intensive care. *Crit Care Med* 2000;28:1871-1876.
194. Strauss R, Wehler M, Mehler K, Kreutzer D, Koebnick C, Hahn EG. Thrombocytopenia in patients in the medical intensive care unit: bleeding prevalence, transfusion requirements, and outcome. *Crit Care Med* 2002;30:1765-1771.
195. Akca S, Haji-Michael P, de Mendonca A, Suter P, Levi M, Vincent JL. Time course of platelet counts in critically ill patients. *Crit Care Med* 2002;30:753-756.
196. Mavrommatis AC, Theodoridis T, Orfanidou A, Roussos C, Christopoulou-Kokkinou V, Zakyntinos S. Coagulation system and platelets are fully activated in uncomplicated sepsis. *Crit Care Med* 2000;28:451-457.
197. Zielinski T, Wachowicz B, Saluk-Juszczak J, Kaca W. Polysaccharide part of *Proteus mirabilis* lipopolysaccharide may be responsible for the stimulation of platelet adhesion to collagen. *Platelets* 2002;13:419-424.
198. Zimmerman GA, McIntyre TM, Prescott SM, Stafforini DM. The platelet-activating factor signaling system and its regulators in syndromes of inflammation and thrombosis. *Crit Care Med* 2002;30:S294-301.
199. Kushner I. The acute phase response: an overview. *Methods Enzymol* 1988;163:373-383.
200. Tobias PS, Soldau K, Ulevitch RJ. Isolation of a lipopolysaccharide-binding acute phase reactant from rabbit serum. *J Exp Med* 1986;164:777-793.

201. Ulevitch RJ, Tobias PS. Recognition of gram-negative bacteria and endotoxin by the innate immune system. *Curr Opin Immunol* 1999;11:19-22.
202. Triantafilou M, Triantafilou K. Lipopolysaccharide recognition: CD14, TLRs and the LPS-activation cluster. *Trends Immunol* 2002;23:301-304.
203. Arditi M, Zhou J, Dorio R, Rong GW, Goyert SM, Kim KS. Endotoxin-mediated endothelial cell injury and activation: role of soluble CD14. *Infect Immun* 1993;61:3149-3156.
204. Prucha M, Herold I, Zazula R, Dubska L, Dostal M, Hildebrand T, Hyanek J. Significance of lipopolysaccharide-binding protein (an acute phase protein) in monitoring critically ill patients. *Crit Care* 2003;7:R154-159.
205. Tillett WS, Francis T. SEROLOGICAL REACTIONS IN PNEUMONIA WITH A NON-PROTEIN SOMATIC FRACTION OF PNEUMOCOCCUS. *J Exp Med* 1930;52:561-571.
206. Abernethy TJ, Avery OT. THE OCCURRENCE DURING ACUTE INFECTIONS OF A PROTEIN NOT NORMALLY PRESENT IN THE BLOOD : I. DISTRIBUTION OF THE REACTIVE PROTEIN IN PATIENTS' SERA AND THE EFFECT OF CALCIUM ON THE FLOCCULATION REACTION WITH C POLYSACCHARIDE OF PNEUMOCOCCUS. *J Exp Med* 1941;73:173-182.
207. Macleod CM, Avery OT. THE OCCURRENCE DURING ACUTE INFECTIONS OF A PROTEIN NOT NORMALLY PRESENT IN THE BLOOD : II. ISOLATION AND PROPERTIES OF THE REACTIVE PROTEIN. *J Exp Med* 1941;73:183-190.
208. Kolb-Bachofen V. A review on the biological properties of C-reactive protein. *Immunobiology* 1991;183:133-145.
209. Ballou SP, Kushner I. C-reactive protein and the acute phase response. *Adv Intern Med* 1992;37:313-336.
210. Pepys MB. C-reactive protein fifty years on. *Lancet* 1981;1:653-657.
211. Du Clos TW. Function of C-reactive protein. *Ann Med* 2000;32:274-278.
212. Jupe D. The acute phase response and laboratory testing. *Aust Fam Physician* 1996;25:324-329.
213. Pue CA, Mortensen RF, Marsh CB, Pope HA, Wewers MD. Acute phase levels of C-reactive protein enhance IL-1 beta and IL-1ra production by human blood monocytes but inhibit IL-1 beta and IL-1ra production by alveolar macrophages. *J Immunol* 1996;156:1594-1600.

214. Young B, Gleeson M, Cripps AW. C-reactive protein: a critical review. *Pathology* 1991;23:118-124.
215. Jaye DL, Waites KB. Clinical applications of C-reactive protein in pediatrics. *Pediatr Infect Dis J* 1997;16:735-746; quiz 746-737.
216. Guidelines on selection of laboratory tests for monitoring the acute phase response. International Committee for Standardization in Haematology (expert panel on blood rheology). *J Clin Pathol* 1988;41:1203-1212.
217. Deodhar SD. C-reactive protein: the best laboratory indicator available for monitoring disease activity. *Cleve Clin J Med* 1989;56:126-130.
218. Uhlar CM, Whitehead AS. Serum amyloid A, the major vertebrate acute-phase reactant. *Eur J Biochem* 1999;265:501-523.
219. Ramadori G, Sipe JD, Dinarello CA, Mizel SB, Colten HR. Pretranslational modulation of acute phase hepatic protein synthesis by murine recombinant interleukin 1 (IL-1) and purified human IL-1. *J Exp Med* 1985;162:930-942.
220. Urieli-Shoval S, Meek RL, Hanson RH, Eriksen N, Benditt EP. Human serum amyloid A genes are expressed in monocyte/macrophage cell lines. *Am J Pathol* 1994;145:650-660.
221. Coetzee GA, Strachan AF, van der Westhuyzen DR, Hoppe HC, Jeenah MS, de Beer FC. Serum amyloid A-containing human high density lipoprotein 3. Density, size, and apolipoprotein composition. *J Biol Chem* 1986;261:9644-9651.
222. Sipe J. Revised nomenclature for serum amyloid A (SAA). Nomenclature Committee of the International Society of Amyloidosis. Part 2. *Amyloid* 1999;6:67-70.
223. Li W, Zhu S, Li J, D'Amore J, D'Angelo J, Yang H, Wang P, et al. Serum Amyloid A Stimulates PKR Expression and HMGB1 Release Possibly through TLR4/RAGE Receptors. *Mol Med* 2015.
224. McAdam KP, Sipe JD. Murine model for human secondary amyloidosis: genetic variability of the acute-phase serum protein SAA response to endotoxins and casein. *J Exp Med* 1976;144:1121-1127.
225. Hudgins LC, Parker TS, Levine DM, Gordon BR, Saal SD, Jiang XC, Seidman CE, et al. A single intravenous dose of endotoxin rapidly alters serum lipoproteins and lipid transfer proteins in normal volunteers. *J Lipid Res* 2003;44:1489-1498.

226. Liuzzo G, Biasucci LM, Gallimore JR, Grillo RL, Rebuffi AG, Pepys MB, Maseri A. The prognostic value of C-reactive protein and serum amyloid A protein in severe unstable angina. *N Engl J Med* 1994;331:417-424.
227. Niederau C, Backmerhoff F, Schumacher B, Niederau C. Inflammatory mediators and acute phase proteins in patients with Crohn's disease and ulcerative colitis. *Hepatology* 1997;44:90-107.
228. Ng PC, Ang IL, Chiu RW, Li K, Lam HS, Wong RP, Chui KM, et al. Host-response biomarkers for diagnosis of late-onset septicemia and necrotizing enterocolitis in preterm infants. *J Clin Invest* 2010;120:2989-3000.
229. Yan SD, Zhu H, Zhu A, Golabek A, Du H, Roher A, Yu J, et al. Receptor-dependent cell stress and amyloid accumulation in systemic amyloidosis. *Nat Med* 2000;6:643-651.
230. Cheng N, He R, Tian J, Ye PP, Ye RD. Cutting edge: TLR2 is a functional receptor for acute-phase serum amyloid A. *J Immunol* 2008;181:22-26.
231. He RL, Zhou J, Hanson CZ, Chen J, Cheng N, Ye RD. Serum amyloid A induces G-CSF expression and neutrophilia via Toll-like receptor 2. *Blood* 2009;113:429-437.
232. Sandri S, Rodriguez D, Gomes E, Monteiro HP, Russo M, Campa A. Is serum amyloid A an endogenous TLR4 agonist? *J Leukoc Biol* 2008;83:1174-1180.
233. Niemi K, Teirila L, Lappalainen J, Rajamaki K, Baumann MH, Oorni K, Wolff H, et al. Serum amyloid A activates the NLRP3 inflammasome via P2X7 receptor and a cathepsin B-sensitive pathway. *J Immunol* 2011;186:6119-6128.
234. Song C, Hsu K, Yamen E, Yan W, Fock J, Witting PK, Geczy CL, et al. Serum amyloid A induction of cytokines in monocytes/macrophages and lymphocytes. *Atherosclerosis* 2009;207:374-383.
235. Sandri S, Hatanaka E, Franco AG, Pedrosa AM, Monteiro HP, Campa A. Serum amyloid A induces CCL20 secretion in mononuclear cells through MAPK (p38 and ERK1/2) signaling pathways. *Immunol Lett* 2008;121:22-26.
236. Assicot M, Gendrel D, Carsin H, Raymond J, Guilbaud J, Bohuon C. High serum procalcitonin concentrations in patients with sepsis and infection. *Lancet* 1993;341:515-518.
237. Le Moullec JM, Jullienne A, Chenais J, Lasmoles F, Guliana JM, Milhaud G, Moukhtar MS. The complete sequence of human preprocalcitonin. *FEBS Lett* 1984;167:93-97.

238. Rosenfeld MG, Mermod JJ, Amara SG, Swanson LW, Sawchenko PE, Rivier J, Vale WW, et al. Production of a novel neuropeptide encoded by the calcitonin gene via tissue-specific RNA processing. *Nature* 1983;304:129-135.
239. Whang KT, Steinwald PM, White JC, Nylen ES, Snider RH, Simon GL, Goldberg RL, et al. Serum calcitonin precursors in sepsis and systemic inflammation. *J Clin Endocrinol Metab* 1998;83:3296-3301.
240. Balog A, Ocsovszki I, Mandi Y. Flow cytometric analysis of procalcitonin expression in human monocytes and granulocytes. *Immunol Lett* 2002;84:199-203.
241. Russwurm S, Stonans I, Stonane E, Wiederhold M, Lubner A, Zipfel PF, Deigner HP, et al. Procalcitonin and CGRP-1 mRNA expression in various human tissues. *Shock* 2001;16:109-112.
242. Oberhoffer M, Stonans I, Russwurm S, Stonane E, Vogelsang H, Junker U, Jager L, et al. Procalcitonin expression in human peripheral blood mononuclear cells and its modulation by lipopolysaccharides and sepsis-related cytokines in vitro. *J Lab Clin Med* 1999;134:49-55.
243. Linscheid P, Seboek D, Schaer DJ, Zulewski H, Keller U, Muller B. Expression and secretion of procalcitonin and calcitonin gene-related peptide by adherent monocytes and by macrophage-activated adipocytes. *Crit Care Med* 2004;32:1715-1721.
244. Becker KL, O'Neil WJ, Snider RH, Jr., Nylen ES, Moore CF, Jeng J, Silva OL, et al. Hypercalcitonemia in inhalation burn injury: a response of the pulmonary neuroendocrine cell? *Anat Rec* 1993;236:136-138, 172-133; discussion 138-143.
245. Nylen ES, Snider RH, Jr., Thompson KA, Rohatgi P, Becker KL. Pneumonitis-associated hyperprocalcitoninemia. *Am J Med Sci* 1996;312:12-18.
246. Meisner M, Lohs T, Huettemann E, Schmidt J, Hueller M, Reinhart K. The plasma elimination rate and urinary secretion of procalcitonin in patients with normal and impaired renal function. *Eur J Anaesthesiol* 2001;18:79-87.
247. Oberhoffer M, Karzai W, Meier-Hellmann A, Bogel D, Fassbinder J, Reinhart K. Sensitivity and specificity of various markers of inflammation for the prediction of tumor necrosis factor-alpha and interleukin-6 in patients with sepsis. *Crit Care Med* 1999;27:1814-1818.

248. Whang KT, Vath SD, Becker KL, Snider RH, Nylen ES, Muller B, Li Q, et al. Procalcitonin and proinflammatory cytokine interactions in sepsis. *Shock* 1999;12:268-273.
249. von Heimburg D, Stieghorst W, Khorram-Sefat R, Pallua N. Procalcitonin--a sepsis parameter in severe burn injuries. *Burns* 1998;24:745-750.
250. Carsin H, Assicot M, Feger F, Roy O, Pennacino I, Le Bever H, Ainaud P, et al. Evolution and significance of circulating procalcitonin levels compared with IL-6, TNF alpha and endotoxin levels early after thermal injury. *Burns* 1997;23:218-224.
251. Mimos O, Benoist JF, Edouard AR, Assicot M, Bohuon C, Samii K. Procalcitonin and C-reactive protein during the early posttraumatic systemic inflammatory response syndrome. *Intensive Care Med* 1998;24:185-188.
252. Al-Nawas B, Krammer I, Shah PM. Procalcitonin in diagnosis of severe infections. *Eur J Med Res* 1996;1:331-333.
253. Kuse ER, Langefeld I, Jaeger K, Kulpmann WR. Procalcitonin in fever of unknown origin after liver transplantation: a variable to differentiate acute rejection from infection. *Crit Care Med* 2000;28:555-559.
254. Meisner M, Tschakowsky K, Hutzler A, Schick C, Schuttler J. Postoperative plasma concentrations of procalcitonin after different types of surgery. *Intensive Care Med* 1998;24:680-684.
255. Goodwin GH, Sanders C, Johns EW. A new group of chromatin-associated proteins with a high content of acidic and basic amino acids. *Eur J Biochem* 1973;38:14-19.
256. Bianchi ME. DAMPs, PAMPs and alarmins: all we need to know about danger. *J Leukoc Biol* 2007;81:1-5.
257. Bustin M. Regulation of DNA-dependent activities by the functional motifs of the high-mobility-group chromosomal proteins. *Mol Cell Biol* 1999;19:5237-5246.
258. Paonessa G, Frank R, Cortese R. Nucleotide sequence of rat liver HMG1 cDNA. *Nucleic Acids Res* 1987;15:9077.
259. Wen L, Huang JK, Johnson BH, Reeck GR. A human placental cDNA clone that encodes nonhistone chromosomal protein HMG-1. *Nucleic Acids Res* 1989;17:1197-1214.

260. Rauvala H, Merenmies J, Pihlaskari R, Korkolainen M, Huhtala ML, Panula P. The adhesive and neurite-promoting molecule p30: analysis of the amino-terminal sequence and production of antipeptide antibodies that detect p30 at the surface of neuroblastoma cells and of brain neurons. *J Cell Biol* 1988;107:2293-2305.
261. Ferrari S, Finelli P, Rocchi M, Bianchi ME. The active gene that encodes human high mobility group 1 protein (HMG1) contains introns and maps to chromosome 13. *Genomics* 1996;35:367-371.
262. Li J, Kokkola R, Tabibzadeh S, Yang R, Ochani M, Qiang X, Harris HE, et al. Structural basis for the proinflammatory cytokine activity of high mobility group box 1. *Mol Med* 2003;9:37-45.
263. Muller S, Ronfani L, Bianchi ME. Regulated expression and subcellular localization of HMGB1, a chromatin protein with a cytokine function. *J Intern Med* 2004;255:332-343.
264. Merenmies J, Pihlaskari R, Laitinen J, Wartiovaara J, Rauvala H. 30-kDa heparin-binding protein of brain (amphoterin) involved in neurite outgrowth. Amino acid sequence and localization in the filopodia of the advancing plasma membrane. *J Biol Chem* 1991;266:16722-16729.
265. Wang H, Bloom O, Zhang M, Vishnubhakat JM, Ombrellino M, Che J, Frazier A, et al. HMG-1 as a late mediator of endotoxin lethality in mice. *Science* 1999;285:248-251.
266. Gardella S, Andrei C, Ferrera D, Lotti LV, Torrisi MR, Bianchi ME, Rubartelli A. The nuclear protein HMGB1 is secreted by monocytes via a non-classical, vesicle-mediated secretory pathway. *EMBO Rep* 2002;3:995-1001.
267. Bonaldi T, Talamo F, Scaffidi P, Ferrera D, Porto A, Bachi A, Rubartelli A, et al. Monocytic cells hyperacetylate chromatin protein HMGB1 to redirect it towards secretion. *Embo j* 2003;22:5551-5560.
268. Youn JH, Shin JS. Nucleocytoplasmic shuttling of HMGB1 is regulated by phosphorylation that redirects it toward secretion. *J Immunol* 2006;177:7889-7897.
269. Scaffidi P, Misteli T, Bianchi ME. Release of chromatin protein HMGB1 by necrotic cells triggers inflammation. *Nature* 2002;418:191-195.
270. Hori O, Brett J, Slattery T, Cao R, Zhang J, Chen JX, Nagashima M, et al. The receptor for advanced glycation end products (RAGE) is a cellular binding site

- for amphoterin. Mediation of neurite outgrowth and co-expression of rage and amphoterin in the developing nervous system. *J Biol Chem* 1995;270:25752-25761.
271. Huttunen HJ, Fages C, Rauvala H. Receptor for advanced glycation end products (RAGE)-mediated neurite outgrowth and activation of NF-kappaB require the cytoplasmic domain of the receptor but different downstream signaling pathways. *J Biol Chem* 1999;274:19919-19924.
272. Schmidt AM, Stern DM. RAGE: a new target for the prevention and treatment of the vascular and inflammatory complications of diabetes. *Trends Endocrinol Metab* 2000;11:368-375.
273. Degryse B, Bonaldi T, Scaffidi P, Muller S, Resnati M, Sanvito F, Arrighoni G, et al. The high mobility group (HMG) boxes of the nuclear protein HMG1 induce chemotaxis and cytoskeleton reorganization in rat smooth muscle cells. *J Cell Biol* 2001;152:1197-1206.
274. Poltorak A, He X, Smirnova I, Liu MY, Van Huffel C, Du X, Birdwell D, et al. Defective LPS signaling in C3H/HeJ and C57BL/10ScCr mice: mutations in Tlr4 gene. *Science* 1998;282:2085-2088.
275. Taniguchi N, Kawahara K, Yone K, Hashiguchi T, Yamakuchi M, Goto M, Inoue K, et al. High mobility group box chromosomal protein 1 plays a role in the pathogenesis of rheumatoid arthritis as a novel cytokine. *Arthritis Rheum* 2003;48:971-981.
276. Andersson U, Wang H, Palmblad K, Aveberger AC, Bloom O, Erlandsson-Harris H, Janson A, et al. High mobility group 1 protein (HMG-1) stimulates proinflammatory cytokine synthesis in human monocytes. *J Exp Med* 2000;192:565-570.
277. Sappington PL, Yang R, Yang H, Tracey KJ, Delude RL, Fink MP. HMGB1 B box increases the permeability of Caco-2 enterocytic monolayers and impairs intestinal barrier function in mice. *Gastroenterology* 2002;123:790-802.
278. Fiuza C, Bustin M, Talwar S, Tropea M, Gerstenberger E, Shelhamer JH, Suffredini AF. Inflammation-promoting activity of HMGB1 on human microvascular endothelial cells. *Blood* 2003;101:2652-2660.
279. Park JS, Arcaroli J, Yum HK, Yang H, Wang H, Yang KY, Choe KH, et al. Activation of gene expression in human neutrophils by high mobility group box 1 protein. *Am J Physiol Cell Physiol* 2003;284:C870-879.

280. Abraham E, Arcaroli J, Carmody A, Wang H, Tracey KJ. HMG-1 as a mediator of acute lung inflammation. *J Immunol* 2000;165:2950-2954.
281. Yang H, Ochani M, Li J, Qiang X, Tanovic M, Harris HE, Susarla SM, et al. Reversing established sepsis with antagonists of endogenous high-mobility group box 1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004;101:296-301.
282. Chacur M, Milligan ED, Gazda LS, Armstrong C, Wang H, Tracey KJ, Maier SF, et al. A new model of sciatic inflammatory neuritis (SIN): induction of unilateral and bilateral mechanical allodynia following acute unilateral peri-sciatic immune activation in rats. *Pain* 2001;94:231-244.
283. Agnello D, Wang H, Yang H, Tracey KJ, Ghezzi P. HMGB-1, a DNA-binding protein with cytokine activity, induces brain TNF and IL-6 production, and mediates anorexia and taste aversion. *Cytokine* 2002;18:231-236.
284. Kokkola R, Sundberg E, Ulfgren AK, Palmblad K, Li J, Wang H, Ulloa L, et al. High mobility group box chromosomal protein 1: a novel proinflammatory mediator in synovitis. *Arthritis Rheum* 2002;46:2598-2603.
285. Wang H, Yang H, Tracey KJ. Extracellular role of HMGB1 in inflammation and sepsis. *J Intern Med* 2004;255:320-331.
286. Messmer D, Yang H, Telusma G, Knoll F, Li J, Messmer B, Tracey KJ, et al. High mobility group box protein 1: an endogenous signal for dendritic cell maturation and Th1 polarization. *J Immunol* 2004;173:307-313.
287. Dumitriu IE, Baruah P, Valentinis B, Voll RE, Herrmann M, Nawroth PP, Arnold B, et al. Release of high mobility group box 1 by dendritic cells controls T cell activation via the receptor for advanced glycation end products. *J Immunol* 2005;174:7506-7515.
288. Orlova VV, Choi EY, Xie C, Chavakis E, Bierhaus A, Ihanus E, Ballantyne CM, et al. A novel pathway of HMGB1-mediated inflammatory cell recruitment that requires Mac-1-integrin. *Embo j* 2007;26:1129-1139.
289. Treutiger CJ, Mullins GE, Johansson AS, Rouhiainen A, Rauvala HM, Erlandsson-Harris H, Andersson U, et al. High mobility group 1 B-box mediates activation of human endothelium. *J Intern Med* 2003;254:375-385.
290. Erlandsson Harris H, Andersson U. Mini-review: The nuclear protein HMGB1 as a proinflammatory mediator. *Eur J Immunol* 2004;34:1503-1512.

291. Bianchi ME, Manfredi AA. High-mobility group box 1 (HMGB1) protein at the crossroads between innate and adaptive immunity. *Immunol Rev* 2007;220:35-46.
292. Palumbo R, Bianchi ME. High mobility group box 1 protein, a cue for stem cell recruitment. *Biochem Pharmacol* 2004;68:1165-1170.
293. De Mori R, Straino S, Di Carlo A, Mangoni A, Pompilio G, Palumbo R, Bianchi ME, et al. Multiple effects of high mobility group box protein 1 in skeletal muscle regeneration. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2007;27:2377-2383.
294. Sorci G, Riuzzi F, Arcuri C, Giambanco I, Donato R. Amphoterin stimulates myogenesis and counteracts the antimyogenic factors basic fibroblast growth factor and S100B via RAGE binding. *Mol Cell Biol* 2004;24:4880-4894.
295. Palumbo R, Galvez BG, Pusterla T, De Marchis F, Cossu G, Marcu KB, Bianchi ME. Cells migrating to sites of tissue damage in response to the danger signal HMGB1 require NF-kappaB activation. *J Cell Biol* 2007;179:33-40.
296. Palumbo R, Sampaolesi M, De Marchis F, Tonlorenzi R, Colombetti S, Mondino A, Cossu G, et al. Extracellular HMGB1, a signal of tissue damage, induces mesoangioblast migration and proliferation. *J Cell Biol* 2004;164:441-449.
297. Limana F, Germani A, Zacheo A, Kajstura J, Di Carlo A, Borsellino G, Leoni O, et al. Exogenous high-mobility group box 1 protein induces myocardial regeneration after infarction via enhanced cardiac C-kit+ cell proliferation and differentiation. *Circ Res* 2005;97:e73-83.
298. Pullerits R, Jonsson IM, Verdrengh M, Bokarewa M, Andersson U, Erlandsson-Harris H, Tarkowski A. High mobility group box chromosomal protein 1, a DNA binding cytokine, induces arthritis. *Arthritis Rheum* 2003;48:1693-1700.
299. Rouhiainen A, Kuja-Panula J, Wilkman E, Pakkanen J, Stenfors J, Tuominen RK, Lepantalo M, et al. Regulation of monocyte migration by amphoterin (HMGB1). *Blood* 2004;104:1174-1182.
300. Zetterstrom CK, Bergman T, Rynnel-Dagoo B, Erlandsson Harris H, Soder O, Andersson U, Boman HG. High mobility group box chromosomal protein 1 (HMGB1) is an antibacterial factor produced by the human adenoid. *Pediatr Res* 2002;52:148-154.
301. Suda K, Kitagawa Y, Ozawa S, Saikawa Y, Ueda M, Ebina M, Yamada S, et al. Anti-high-mobility group box chromosomal protein 1 antibodies improve survival of rats with sepsis. *World J Surg* 2006;30:1755-1762.

302. Sunden-Cullberg J, Norrby-Teglund A, Rouhiainen A, Rauvala H, Herman G, Tracey KJ, Lee ML, et al. Persistent elevation of high mobility group box-1 protein (HMGB1) in patients with severe sepsis and septic shock. *Crit Care Med* 2005;33:564-573.
303. Ueno H, Matsuda T, Hashimoto S, Amaya F, Kitamura Y, Tanaka M, Kobayashi A, et al. Contributions of high mobility group box protein in experimental and clinical acute lung injury. *Am J Respir Crit Care Med* 2004;170:1310-1316.
304. Ombrellino M, Wang H, Ajemian MS, Talhouk A, Scher LA, Friedman SG, Tracey KJ. Increased serum concentrations of high-mobility-group protein 1 in haemorrhagic shock. *Lancet* 1999;354:1446-1447.
305. Remick D, Manohar P, Bolgos G, Rodriguez J, Moldawer L, Wollenberg G. Blockade of tumor necrosis factor reduces lipopolysaccharide lethality, but not the lethality of cecal ligation and puncture. *Shock* 1995;4:89-95.
306. Powell LJ. C-reactive protein--a review. *Am J Med Technol* 1979;45:138-142.
307. Grigorov I, Bogojevic D, Jovanovic S, Petrovic A, Ivanovic-Matic S, Zolotarevski L, Poznanovic G, et al. Hepatoprotective effects of melatonin against pronecrotic cellular events in streptozotocin-induced diabetic rats. *J Physiol Biochem* 2014;70:441-450.
308. Braselmann H, Michna A, Hess J, Unger K. CFAssay: statistical analysis of the colony formation assay. *Radiat Oncol* 2015;10:223.
309. Ordonez CA, Puyana JC. Management of peritonitis in the critically ill patient. *Surg Clin North Am* 2006;86:1323-1349.
310. Mulier S, Penninckx F, Verwaest C, Filez L, Aerts R, Fieuws S, Lauwers P. Factors affecting mortality in generalized postoperative peritonitis: multivariate analysis in 96 patients. *World J Surg* 2003;27:379-384.
311. Pomata M, Vargiu N, Martinasco L, Licheri S, Erdas E, Zonza C, Pisano G. [Our experience in the diagnosis and treatment of diffuse peritonitis]. *G Chir* 2002;23:193-198.
312. Iqbal CW, Cullinane DC, Schiller HJ, Sawyer MD, Zietlow SP, Farley DR. Surgical management and outcomes of 165 colonoscopic perforations from a single institution. *Arch Surg* 2008;143:701-706; discussion 706-707.
313. Stumpf MJ, Vinces FY, Edwards J. Is primary anastomosis safe in the surgical management of complications of acute diverticulitis? *Am Surg* 2007;73:787-790; discussion 790-781.

314. Bulger EM, McMahon K, Jurkovich GJ. The morbidity of penetrating colon injury. *Injury* 2003;34:41-46.
315. de Jager CP, van Wijk PT, Mathoera RB, de Jongh-Leuvenink J, van der Poll T, Wever PC. Lymphocytopenia and neutrophil-lymphocyte count ratio predict bacteremia better than conventional infection markers in an emergency care unit. *Crit Care* 2010;14:R192.
316. Nakayama T, Sonoda S, Urano T, Yamada T, Okada M. Monitoring both serum amyloid protein A and C-reactive protein as inflammatory markers in infectious diseases. *Clin Chem* 1993;39:293-297.
317. Gucyetmez B, Atalan HK. C-Reactive Protein and Hemogram Parameters for the Non-Sepsis Systemic Inflammatory Response Syndrome and Sepsis: What Do They Mean? *PLoS One* 2016;11:e0148699.
318. Enguix A, Rey C, Concha A, Medina A, Coto D, Dieguez MA. Comparison of procalcitonin with C-reactive protein and serum amyloid for the early diagnosis of bacterial sepsis in critically ill neonates and children. *Intensive Care Med* 2001;27:211-215.
319. Gustot T, Felleiter P, Pickkers P, Sakr Y, Rello J, Velissaris D, Pierrakos C, et al. Impact of infection on the prognosis of critically ill cirrhotic patients: results from a large worldwide study. *Liver Int* 2014;34:1496-1503.
320. Reith HB, Mittelkotter U, Wagner R, Thiede A. Procalcitonin (PCT) in patients with abdominal sepsis. *Intensive Care Med* 2000;26 Suppl 2:S165-169.
321. Witczak A, Juralowicz P, Modzelewski B, Gawlik M. C-reactive protein as a marker of postoperative septic complications. *Pol Przegl Chir* 2012;84:93-98.
322. Berger D, Bolke E, Seidelmann M, Beger HG. Time-scale of interleukin-6, myeloid related proteins (MRP), C reactive protein (CRP), and endotoxin plasma levels during the postoperative acute phase reaction. *Shock* 1997;7:422-426.
323. Luzzani A, Polati E, Dorizzi R, Rungatscher A, Pavan R, Merlini A. Comparison of procalcitonin and C-reactive protein as markers of sepsis. *Crit Care Med* 2003;31:1737-1741.
324. Silvestre J, Pova P, Coelho L, Almeida E, Moreira P, Fernandes A, Mealha R, et al. Is C-reactive protein a good prognostic marker in septic patients? *Intensive Care Med* 2009;35:909-913.

325. Ventetuolo CE, Levy MM. Biomarkers: diagnosis and risk assessment in sepsis. *Clin Chest Med* 2008;29:591-603, vii.
326. Uzzan B, Cohen R, Nicolas P, Cucherat M, Perret GY. Procalcitonin as a diagnostic test for sepsis in critically ill adults and after surgery or trauma: a systematic review and meta-analysis. *Crit Care Med* 2006;34:1996-2003.
327. Xiao Z, Wilson C, Robertson HL, Roberts DJ, Ball CG, Jenne CN, Kirkpatrick AW. Inflammatory mediators in intra-abdominal sepsis or injury - a scoping review. *Crit Care* 2015;19:373.
328. Barbic J, Ivic D, Alkhamis T, Drenjancevic D, Ivic J, Harsanji-Drenjancevic I, Turina I, et al. Kinetics of changes in serum concentrations of procalcitonin, interleukin-6, and C- reactive protein after elective abdominal surgery. Can it be used to detect postoperative complications? *Coll Antropol* 2013;37:195-201.
329. Baykut D, Schulte-Herbruggen J, Krian A. The value of procalcitonin as an infection marker in cardiac surgery. *Eur J Med Res* 2000;5:530-536.
330. Novotny AR, Emmanuel K, Hueser N, Knebel C, Kriner M, Ulm K, Bartels H, et al. Procalcitonin ratio indicates successful surgical treatment of abdominal sepsis. *Surgery* 2009;145:20-26.
331. Jung B, Molinari N, Nasri M, Hajjej Z, Chanques G, Jean-Pierre H, Panaro F, et al. Procalcitonin biomarker kinetics fails to predict treatment response in perioperative abdominal infection with septic shock. *Crit Care* 2013;17:R255.
332. Yang SK, Xiao L, Zhang H, Xu XX, Song PA, Liu FY, Sun L. Significance of serum procalcitonin as biomarker for detection of bacterial peritonitis: a systematic review and meta-analysis. *BMC Infect Dis* 2014;14:452.
333. Arnon S, Litmanovitz I, Regev RH, Bauer S, Shainkin-Kestenbaum R, Dolfon T. Serum amyloid A: an early and accurate marker of neonatal early-onset sepsis. *J Perinatol* 2007;27:297-302.
334. Yuan H, Huang J, Lv B, Yan W, Hu G, Wang J, Shen B. Diagnosis value of the serum amyloid A test in neonatal sepsis: a meta-analysis. *Biomed Res Int* 2013;2013:520294.
335. Cicarelli LM, Perroni AG, Zugaib M, de Albuquerque PB, Campa A. Maternal and cord blood levels of serum amyloid A, C-reactive protein, tumor necrosis factor-alpha, interleukin-1beta, and interleukin-8 during and after delivery. *Mediators Inflamm* 2005;2005:96-100.

336. Gabay C, Kushner I. Acute-phase proteins and other systemic responses to inflammation. *N Engl J Med* 1999;340:448-454.
337. Cicarelli DD, Vieira JE, Bensenor FE. Comparison of C-reactive protein and serum amyloid a protein in septic shock patients. *Mediators Inflamm* 2008;2008:631414.
338. Ucar B, Yildiz B, Aksit MA, Yasar C, Colak O, Akbay Y, Colak E. Serum amyloid A, procalcitonin, tumor necrosis factor-alpha, and interleukin-1beta levels in neonatal late-onset sepsis. *Mediators Inflamm* 2008;2008:737141.
339. Li W, Zhu S, Li J, D'Amore J, D'Angelo J, Yang H, Wang P, et al. Serum Amyloid A Stimulates PKR Expression and HMGB1 Release Possibly through TLR4/RAGE Receptors. *Mol Med* 2015;21:515-525.
340. Gaini S, Koldkjaer OG, Moller HJ, Pedersen C, Pedersen SS. A comparison of high-mobility group-box 1 protein, lipopolysaccharide-binding protein and procalcitonin in severe community-acquired infections and bacteraemia: a prospective study. *Crit Care* 2007;11:R76.
341. Singh A, Feng Y, Mahato N, Li J, Wu C, Gong J. Role of high-mobility group box 1 in patients with acute obstructive suppurative cholangitis-induced sepsis. *J Inflamm Res* 2015;8:71-77.
342. Kohno T, Anzai T, Shimizu H, Kaneko H, Sugano Y, Yamada S, Yoshikawa T, et al. Impact of serum high-mobility group box 1 protein elevation on oxygenation impairment after thoracic aortic aneurysm repair. *Heart Vessels* 2011;26:306-312.
343. Karlsson S, Pettila V, Tenhunen J, Laru-Sompa R, Hynninen M, Ruokonen E. HMGB1 as a predictor of organ dysfunction and outcome in patients with severe sepsis. *Intensive Care Med* 2008;34:1046-1053.
344. van Zoelen MA, Laterre PF, van Veen SQ, van Till JW, Wittebole X, Bresser P, Tanck MW, et al. Systemic and local high mobility group box 1 concentrations during severe infection. *Crit Care Med* 2007;35:2799-2804.
345. Gibot S, Massin F, Cravoisy A, Barraud D, Nace L, Levy B, Bollaert PE. High-mobility group box 1 protein plasma concentrations during septic shock. *Intensive Care Med* 2007;33:1347-1353.

SPISAK SKRAĆENICA

APACHE skor	procena akutnog i hroničnog fiziološkog stanja (<i>engl.</i> Acute Physiology And Chronic Health Evaluation)
APOA-1	apolipoprotein A1
ASA skor	Americko drustvo anesteziologa skor
CDS	hirurgija radi kontrole ostećenja (<i>engl.</i> control damage surgery)
CT	kompjuterizovana tomografija (<i>engl.</i> computerized tomography)
CLR	receptor sličan lektinu-C tipa (<i>engl.</i> C-type lecitin receptors)
CLP	cekalna ligatura i punkcija
CRP	C-reaktivni protein
CXCR2	hemokinzi receptor 2
DIK	diseminovana intravaskularna koagulopatija
HMGB-1	High mobility group box protein 1
HDL	lipoprotein visoke gustine (<i>engl.</i> high density lipoprotein)
HMG	High mobility group protein
IL	interleukin
IFN- γ	interferon gama
IRA	urođeni aktivator imunskog odgovora (<i>engl.</i> innate response activator)
ICAM-1	intracelularni adhezioni molekul
iNOS	inducibilna azot-oksidi sintetaza
JIL	jedinica intezivnog lećenja
LPS	lipopolisaharid
LFA-1	leukocit funkcijski pridružen antigen

LIF	leukemija inhibitorni factor
LBP	lipopolisaharid vezujući protein
MODS	multiorganska disfunkcija
MIP-1	makrofagni inflamatorni protein
MIF	faktor inhibicije migracije makrofaga
MAKP	mitogen aktivirana protein kinaza
MAC-1	makrofagni antigen 1
NLR	receptori slični NOD-u (<i>engl.</i> NOD-like receptors)
OP	otvoren trbuh (<i>engl.</i> open abdomen)
NO	azot oksid
PAM	molekulski obrazac patogena (<i>engl.</i> pathogen-associated molecular patterns)
PAF	faktor aktivacije trombocita (<i>engl.</i> Platelet-activating factor)
PMN	polimorfonukleari
PAI	plazminogen aktivatora inhibitor
PCT	prokalcitonin
RL RAGE	RAGE receptor (<i>engl.</i> Receptor for advanced glycation endproducts)
RIG	citozomni receptori slični RIG-u (<i>engl.</i> RIG-like receptors)
SAA	serum amiloid A
SIRS	sindrom sistemskog inflamatornog odgovora
TGF- β	faktor transformacije rasta beta (<i>engl.</i> Transforming growth factor-beta)
TLR	receptori sličan Toll-u (<i>engl.</i> Toll-like receptors)
TNF	faktor nekroze tumora (<i>engl.</i> tumor necrosis factor)

VAC

lečenje rana negativnim pritiskom (*engl.* vacuum assisted closure)

BIOGRAFIJA

Ljiljana Milić je rođena u Sremskoj Mitrovici 26.5.1969. godine. Stomatološki fakultet Univerziteta u Beogradu je upisala i pohađala od 1987 do 1989. godine. Potom je upisala Medicinski fakultet Univerziteta u Beogradu, 1989. Diplomirala 20.1.1994. sa prosečnom ocenom 9,45. Specijalističke studije iz Opšte hirurgije je upisala 1994. godine, a završila 2000. godine. Magistarske studije iz Urgentne hirurgije je upisala 1994. a završila 2010. godine.

Od 1994. do 1995. godine lekarski staž je završila na Medicinskom fakultetu Univerziteta u Beogradu. Od 1995. godine radi na Klinici za urgentnu hirurgiju, Urgentnog centra Kliničkog centra Srbije. Od 2010. godine je šef jedinice za endoskopsku hirurgiju HIR II do 2013. godine, kada postaje šef Intezivne nege Hirurgije IV gde i sada radi. Od 2014. godine radi kao klinički asistent na Medicinskom fakultetu Univerziteta u Beogradu za užu naučnu oblast hirurgija sa anesteziologijom (Opšta hirurgija-Urgentna hirurgija).

Član je Srpskog lekarskog društva (SLD), Hirurške sekcije Srpskog lekarskog društva i sekcije za Urgentnu medicinu Srpskog lekarskog društva.

Učesnik je mnogobrojnih međunarodnih kongresa, simpozijuma, seminara i kurseva

PRILOZI

Prilog 1.

Izjava o autorstvu

Potpisani-a Milić Ljiljana

broj upisa _____

Izjavljujem

da je doktorska disertacija pod naslovom

Prognostički značaj proteina HMGB1 u difuznom sekundarnom peritonitisu

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

U Beogradu,

24.05.2016.

Potpis doktoranta



Prilog 2.

Izjava o istovetnosti štampane i elektronske verzije doktorskog rada

Ime i prezime autora: Milić Ljiljana

Broj upisa _____

Studijski program: medicina

Naslov rada: Prognošički značaj proteina HMGB1 u difuznom sekundarnom peritonitisu

Mentor: Prof. sci. med. Predrag Peško

Komentor: Dr Ilijana Grigorov, naučni savetnik

Potpisani _____

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

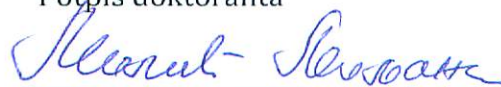
Dozvoljavam da se objave moji lični podaci vezani za dobijanje akademskog zvanja doktora nauka, kao što su ime i prezime, godina i mesto rođenja i datum odbrane rada.

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

U Beogradu,

24.04.2016.

Potpis doktoranta



Prilog 3.

Izjava o korišćenju

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

Prognostički značaj proteina HMGB1 u difuznom sekundarnom peritonitisu

koja je moje autorsko delo.

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

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

1. Autorstvo

2. Autorstvo - nekomercijalno

3. Autorstvo - nekomercijalno - bez prerade

4. Autorstvo - nekomercijalno - deliti pod istim uslovima

5. Autorstvo - bez prerade

6. Autorstvo - deliti pod istim uslovima

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

U Beogradu

24.04.2016.

Potpis doktoranta

