



### Лични подаци руководиоца пројекта

Име : Биљана  
Презиме : Поповска-Јовичић  
Е-маил адреса: biljanapor@yahoo.com

### Општи подаци и протокол истраживања

Назив Пројекта :

Анализа фактора значајних у диференцијалној дијагнози узрочника фебрилних стања непознате етиологије

Кључне речи :

Фебрилност, Феритин, Цитокини, Фебрилно стање нејасног порекла

Сажетак

Постоји преко 200 различитих узрочника фебрилних стања непознатог порекла (*FUO*, eng. *Fever of unknown origin*). Узрочници могу бити инфективног и неинфективног порекла. Према етиологији неинфективни узрочници *FUO* се деле на малигне, реуматолошке и "друге" болести. Посебну групу чине недијагностиковани случајеви, који према досадашњим истраживањима, чине између 10-30% од укупног броја оболелих (5). Поред напретка савремене медицине, овако хетерогена група обољења представља прави изазов за клиничаре. Циљ истраживања ће бити да омогући диференцијацију најпре инфективних и неинфективних узрочника *FUO*, затим и диференцијацију осталих етиолошких група. У испитивању ће учествовати 60 болесника који ће се испитивати у Инфективној клиници Клиничког центра Крагујевац у периоду од јуна 2013. до јуна 2015. године. У истраживању ће учествовати 30 болесника који испуњавају критеријуме за нејасна фебрилна стања *Durack*-а и *Street*-а из 1991. године (2). Контроле ће обухватати 30 фебрилних пацијената који не испуњавају критеријуме за *FUO*. Циљ нашег испитивања је одређивање цитокинског профила код инфективних, малигних, реуматолошких и "других узрочника" *FUO*. С обзиром да је откривено да је



гликолизирани феритин специфичнији маркер од феритина одређивање његове серумске концентрације може бити од великог значаја у диференцијацији FUO (7). Добијеним резултатима ћемо омогућити разликовање између инфективних и неинфективних узročника, као и диференцијацију између појединих етиолошких група. Очекујемо да ће наши резултати допринети да се избегне нефокусиран приступ у постављању дијагнозе, чиме се постиже краће трајање хоспитализације, непотребно коришћење дијагностичких процедура, а омогућава правовремено започињање адекватног лечења.

### **Циљ истраживања**

Циљ истраживања је да код пацијентата који испуњавају критеријуме за FUO испитамо цитокински профил и гликолизирани феритин. Циљ нам је да унапредимо диференцијацију инфективних и неинфективних узročника FUO, затим и диференцијацију између осталих етиолошких група.

### **Актуелност истраживања**

Фебрилност непознатог порекла, FUO, су први пут дефинисали *Petersdorf* и *Besson* 1961. године као температуру која траје дуже од три недеље, у више наврата прелази 38,3°C и чији узрок остаје неоткривен након једне недеље хоспиталног испитивања (1). Напретком савремене медицине постојала је потреба за неколико модификација првобитне дефиниције. Тридесет година касније *Durack* и *Street* предлажу две измене које су и данас прихваћене као златни стандард у дефинисању FUO (2). Измене се односе на разлику између класичног FUO и фебрилних стања која су удружена са неутропенијом, вирусом хумане имунодефицијенције (*HIV*, eng. *Human immunodeficiency virus*) и нозокомијалним инфекцијама, као и на краће трајање хоспиталног испитивања, уместо седам, три дана.

Фебрилна стања непознатог порекла представљају велики изазов за клиничаре јер диференцијална дијагноза обухвата више поремећаја него било које друго медицинско стање. До сада је откривено преко 200 различитих узročника FUO којима припадају веома ретки, али и релативно чести клинички ентитети (3). Према етиолошким узročницима FUO се деле у четири велике групе обољења: инфективна, малигна, реуматолошка и „друге болести“ које укључују грануломатозне болести, температуру изазвану лековима и вештачки изазвану температуру (4). С обзиром на веома велики број узročника, пут до постављања дијагнозе обично подразумева дуг временски период и неселективно коришћење бројних дијагностичких процедура. Упркос развоју брзих лабораторијских тестова и моћних дијагностичких уређаја број недиагностикованих случајева FUO је у недавно објављеним студијама већи и креће се у распону од 10%-30% (5). Овако висок број недиагностикованих пацијентата може бити разлог фаталног исхода, посебно за оне болеснике који крију малигну болест.

Нека истраживања, последњих година, указала су на значај клиничких карактеристика и неспецифичних лабораторијских анализа у диференцирању инфективних и неинфективних узročника (*Cunha A. Burke, Stamatis P.Efstathiou* и аутори). Неколико аутора издваја феритин,



као параметар који може бити значајан у диференцијацији инфективних и неинфективних болести (5,6).

Поред испитивања основних клиничких карактеристика и неспецифичних лабораторијских анализа које је у току, потребно је да допунимо наше истраживање. Откривено је да је гликолизирани феритин много специфичнији дијагностички маркер од феритина (7,8). Код здравих особа 50-80% феритина је гликолизирано, али код неких група болести тај број значајно пада због засићења механизма гликолизације (9). Због тога одређивање концентрације гликолизираног феритина може бити од великог значаја у диференцијацији узрочника FUO.

Циљ нашег испитивања је и одређивање серумских концентрација Th-1, Th-2, Th-17, код инфективних, малигних, реуматолошких и "других узрочника" FUO. Посебно значајне резултате очекујемо у групи недијагностикованих FUO пацијената.

Фактор туморске некрозе (TNF) је медијатор који је одговоран за многе компликације које настају у акутном инфламаторном одговору на грам-негативне бактерије и друге микроорганизме. TNF стимулише миграцију неутрофила и моноцита на место инфекције и индукује експресију адхезионих молекула на ендотелним ћелијама. У случају велике продукције, TNF посредује у системском инфламаторном одговору и развоју септичког шока (10).

Интерлеукин-1 (IL-1) посредује у биолошким ефектима помоћу мембранског рецептора за IL-1. Заједно са рецептором за IL-18, припада фамилији IL-1 рецептора. Сигнални путеви се одвијају путем секвенци које се налазе у цитосолу, и називају се Toll/IL-1 рецептори (TIR) (11).

Као и TNF, IL-1 посредује у настанку инфламације, индукује фебрилност и учествује у синтези протеина акутне фазе, али за разлику од TNF, не посредује у настанку септичког шока и апоптозе ћелије.

Интерлеукин-10 (IL-10) инхибира активацију макрофага и дендритских ћелија, тако што инхибира експресију костимулатора и МНС II молекула. Експерименти на *knockout* IL-10 мишевима су показали склоност ка настајању улцерозног колитиса (12).

Интерферон  $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) посредује у борби против интрацелуларних микроорганизама како у стеченом, тако и урођеном имунском одговору. IFN- $\gamma$  повећава микробицидну функцију макрофага тако што стимулише синтезу реактивних кисеоничних медијатора и тиме поспешује фагоцитозу микроорганизама. Поред тога омогућава диференцијацију наивних CD4+T лимфоцита у Th1 правцу (10).

Интерлеукин-13 (IL-13) игра важну улогу патофизиологији алергијских болести и учествује у борби против паразитарних инфекција. IL-13 стимулише развој фиброзу код постојања хроничне инфламације и има удела у настанку астме и интерстицијумских болести плућа. Проинфламаторно дејство му је омогућено индукцијом адхезионих молекула VCAM1 и хемокина (10).



Основна функција трансформишућег фактора раста  $\beta$  (TGF $\beta$ ) је инхибиција пролиферације и ефекторске функције Т лимфоцита као и активације макрофага. Игра одређену улогу у настанку карцинома, кардиоваскуларних болести, дијабетеса и Марфановог синдрома (10).

Интерлеукин-17 (IL-17) има проинфламаторно дејство тако што индукује продукцију многих цитокина, хемокина и простагландина. IL -17 је од суштинског значаја за CD4 Т лимфоците и поларизацију у Th17 правцу. Као резултат ових улога, IL -17 је повезан са многим аутоимунским болестима укључујући реуматоидни артритис, лупус, одбацивање алотранспланта, анти-гуморског имунитета и псоријазе (10).

Такође ћемо испитати и серумску концентрацију IL-33 и секретоване форме ST2 рецептора. Досадашња истраживања су показала да IL-33/ ST-2 има значаја у развоју аутоимунских болести, што ће имати велики значај у диференцијацији FУO (13, 14).

### Задаци

1. Испитати серумски ниво проинфламаторних, регулаторних и супресорних цитокина.
2. Мерити евентуалне разлике у нивоу ових цитокина код пацијената са инфективним и неинфективним узрочницима FУO.
3. Корелирати ниво цитокина са дефинитивном дијагнозом пацијената.
4. Одредити концентрацију гликолизираног феритина у периферној крви испитаника.

### Методологија

Испитаници: у студији ће учествовати 60 болесника који ће бити лечени у Инфективној клиници Клиничког Центра Крагујевац и биће подељени у две групе. Прва група ће обухватати 20 пацијената који испуњавају критеријуме за фебрилна стања непознате етиологије, према критеријума *Durack*-а и *Street*-а (2)а то су:

- Вишекратно појављивање телесне температуре преко 38,3°C, у току три недеље.
- Порекло температуре остаје неразјашњено након три посете лекару амбулантне службе, односно три дана болничког испитивања.

Другу групу, односно контроле, чиниће укупно 20 пацијената који ће због фебрилности бити хоспитализовани у Инфективну клинику, али не испуњавају критеријуме за FУO.

Након постављања дефинитивне дијагнозе пацијенти ће према етиологији бити подељени у четири групе које ће чинити оболели од инфективних болести, малигних, реуматолошких и „других“ болести. Група „других болести“ не припада ни једном од три наведена клиничка ентитета (инфективна, реуматолошка, малигна) а укључује грануломатозне болести, субакутни тиреоидитис, инфламаторне болести дигестивног тракта, вештачки изазвану температуру,



температуру изазвану лековима и друга стања. Пацијенти код којих након исцрпљивања свих дијагностичких процедура није откривен узрок фебрилности, сачињаваће посебну групу неоткривених болести.

Лабораторијске анализе одређиваће се у биохемијској лабораторији КЦ Крагујевац. У циљу дијагностиковања узрока фебрилности, у зависности од добијених лабораторијских анализа и забележених клиничких манифестација, на сваког пацијента, примениће се одговарајуће дијагностичке процедуре. Оне ће обухватати: микробиолошке, серолошке, ендокринолошке, имунолошке анализе уз визуализирајуће дијагностичке процедуре (ехосонографски и радиолошки прегледи, комјутеризована томографија, магнетна резонанца).

Концентрација Th1 цитокина (IL-1, IL-1R, TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ ), Th2 цитокина (IL-13), Th17 цитокина (IL-17), регулаторних (IL-10, TGF- $\beta$ ), као и IL-33/ST-2 одређиваће се у узорцима плазме ELISA методом.

Концентрација гликолилизованог феритина ће се одређивати у узорцима плазме ELISA методом.

### **Очекивани резултати**

С обзиром да у прегледаној литератури до сада нисмо пронашли податке о испитивању гликолизованог феритина и цитокинског профила у диференцијацију FUO, очекујемо да ће ово истраживање значај у креирању новог дијагностичког приступа.

### **Значај истраживања**

Значај ове студије је у испитивању параметара који могу бити од великог значаја за дијагностиковање оболелих који испуњавају критеријуме за фебрилна стања непознатог порекла. С обзиром да диференцијална дијагноза обухвата преко 200 различитих клиничких ентитета, а број недиагностикованих случајева FUO у новијим истраживањима се креће до 30%, значај истраживања је да олакша постављање дијагнозе, скрати трајање хоспитализације и смањи обим извођења дијагностичких процедура.

### **Временски оквир**

Планирано истраживање биће спроведено у Центру за молекулску медицину и истраживања матичних ћелија, Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу. Очекивани временски оквир за реализацију пројекта је две године.

### **Литература**

(200 речи)

1. Durack DT, Street AC. Fever of unknown origin-reexamined and redefined. *Curr Clin Top Infect Dis* 1991; 11: 35-51.



2. Knockaert DC, Vanderschueren S, Blockmans D. Fever of unknown origin in adults. *J Intern Med* 2003; 253: 263-5.
3. Cunha BA. Fever of unknown origin: focused diagnostic approach based on clinical clues from the history, physical examination, and laboratory test. *Infect Dis Clin North Am* 2007; 21: 1137-87.
4. Cunha BA. Fever of unknown origin: Clinical overview of classic and current concepts. *Infect Dic Clin* 2007; 21: 867-915.
5. Efstathiou SP, Pefanis AV, Tsiakou AG, Skeva II, Tsioulos DI, Achimastos AD, Mountokalakis TD. Fever of unknown origin: Discrimination between infectious and non-infectious causes. *Eur J of Intern Med* 2010; 21: 137-143.
6. Cunha BA. Fever of unknown origin (FOU): diagnostic importance of serum ferritin levels. *Scand J Infect Dis* 2007; 39: 651-2.
7. Fardet L, Coppo P, Kettaneh A, Dehoux M, Cabane J, Lambotte O. Low glycosylated ferritin, a good marker for diagnosis of hemophagocytic syndrome. *Arthritis and Rheumatism* 2008; 58: 1521-1527.
8. Wang W, Knovich M, Coffman L, Torti F, Torti S. Serum ferritin: Past, present and future. *Biochimica et Biophysica Acta* 2010; 1800: 760-769.
9. Alkhateeb A.A, Connor J.R. The significance of ferritin in cancer: Anti-oxidation, inflammation and tumorigenesis. *Biochimica et Biophysica Acta* 2013; 1836: 245-254.
10. Abbas KA, Lichtman HA, Pillai S: *Cellular and Mollecular Immunology* 2010;6; 267-302.
11. Garlanda C, Dinarello CA, Mantovani A: The interleukin-1 family: back to the future. *Immunity* 2013; 39 (6); 1003-1018.
12. Sabat R. IL-10 family of cytokines. *Cytokine & Growth Factor Reviews* 2010; 21: 315-324.
13. Milovanovic M, Volarevic V, Radosavljevic G, Jovanovic I, Pejnovic N, Arsenijevic N, et al. IL-33/ST2 axis in inflammation and immunopathology. *Immunologic research*. 2012;52(1-2):89-99.
14. Parenica J, Malaska J, Jarkovsky J, Lipkova J, Dastyh M, Helanova K, et al. Soluble ST2 levels in patients with cardiogenic and septic shock are not predictors of mortality. *Experimental and clinical cardiology*. 2012;17(4):205-9.