

Универзитет у Крагујевцу
Факултет медицинских наука

**„ГЕНСКИ ПОЛИМОРФИЗМИ ЦИТОКИНА HIGH
MOBILITY GROUP BOX-1 КОД КРИТИЧНО
ОБОЛЕЛИХ ПАЦИЈЕНАТА СА СЕПСОМ И
ТРАУМОМ“**

Др Драган Ђорђевић

САДРЖАЈ

1. Увод	3
1.1. Дефиниције сепсе	6
1.2. Савремена дефиниција и критеријуми за сепсу	10
1.3. Дефиниција тешке трауме	11
2. Имуноско-инфламаторна каскада у сепси и трауми	12
2.1. Улога урођеног имуноског система у сепси	12
2.2. Улога урођеног имуноског система у трауми	16
2.3. Цитокини	17
2.4. Грађа и улога протеина HMGB1	19
2.5. HMGB1 цитокинска активност	24
2.6. Регулација HMGB1 цитокинске активности	26
2.7. Секреција цитокина HMGB1	28
3. Сепса и траума	31
3.1. Патофизиологија сепсе	31
3.2. Сепса и траума као имуносупресивне болести	36
4. Гени и генски полиморфизми	39
4.1. Секвенце гена	40
4.2. Полиморфизам гена	42
4.3. Типови полиморфизма	43
4.4. Генске варијације и инфламаторни одговор у сепси	45
4.5. Ген и генски полиморфизам за HMGB1	49
5. Предмет студије	52
6. Циљеви и хипотезе студије	52
7. Материјал и метод	54
8. Резултати	64
9. Дискусија	79
10. Закључци	89
11. Литература	91

1. УВОД

Имуно-инфламаторни одговор значајно доприноси морбидитету и морталитету код критично оболелих и показује висок ниво интериндивидуалне варијације. Подаци из литературе показују да постоје значајне разлике у испољавању клиничке слике и у исходу код пацијената са сличним инсултом који је активирао имунски систем (инфекција и траума). У фокусу истраживања у новије време нашле су се генске детерминанте инфламаторног одговора а посебно група гена која регулише имунски одговор на инфекцију и трауму. (1,2,3)

Сепса представља синдром системског инфламаторног одговора који је резултат инфективног процеса, са ослобађањем цитокина и хемокина, уз активацију система комплемента и коагулације. Сепса је један од највећих здравствених проблема у свету и праћена је високим морталитетом (10-50%). Према најновијим подацима, сепса се јавља код више од 750000 пацијената годишње у САД, док је процена на глобалном нивоу 19 милиона случајева, са тенденцијом даљег раста. Најчешћи узрок сепсе је пнеумонија код половине пацијената, затим следе интраабдоминалне и инфекције урогениталног тракта. Хемокултуре су позитивне код трећине пацијената, а код трећине пацијената су негативни сви узети бактеријски узорци. *Staphylococcus aureus* и *Streptococcus pneumoniae* су најчешћи Грам- позитивни изолати, док се од Грам- негативних бактерија најчешће изолују *Echerichia coli*, *Klebsiela species* и *Pseudomonas aeruginosa* (4). Према подацима из велике европске студије, Грам- негативне бактерије су изоловане код 62% пацијената са тешком сепсом код којих су позитивне хемокултуре, Грам- позитивне бактерије код 47% и гљивице код 19% (5).

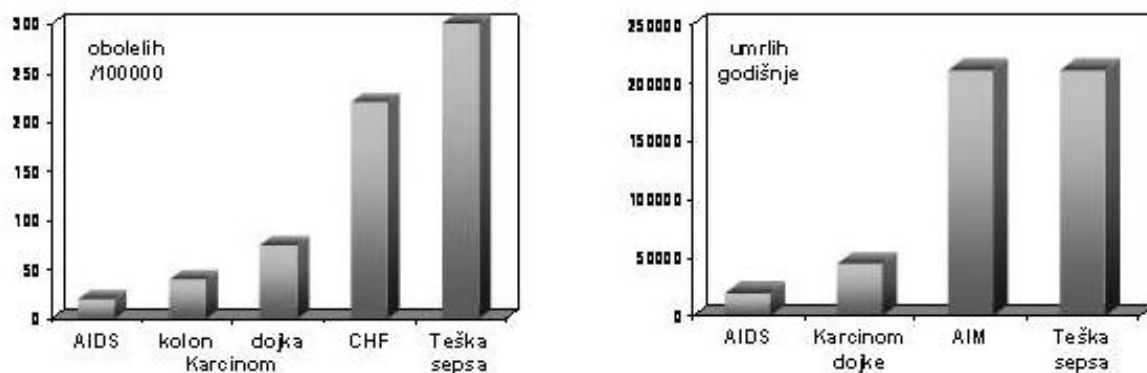
Очигледно је да се сличан или чак индентичан одговор може настати у одсуству инфекције (траума, опекотине, панкреатитис), те је уведен термин синдром системског инфламаторног одговора (енг. Systemic inflammatory response syndrome- SIRS), без обзира на узрок. Истраживање системског инфламаторног

одговора на инфекцију и трауму омогућава разумевање имунских механизма коју проузрокују сепсу и са њом повезану дисфункцију органа и често смрт (6).

Синдром SIRS-а, представља у основи, про- инфламаторни одговор домаћина на инвазију микроорганизмима и на стерилно оштећење ткива. Молекуларне компоненте овог синдрома чине цитокини, комплемент комплекс и протеини акутне фазе, док су ћелијске компоненте моноцити/макрофаге, леукоцити и ћелије ендотела. Поред класичних про- инфламаторних цитокина (TNF- α , IL-1), интезивно се проучава функција релативно нових цитокина: high mobility group box-1 (HMGB1), интерлеукин 17 (IL-17), макрофагни инхибиторни фактор миграције (MMIF), мијелоидни протеини (Mrp8, Mrp14) и други. Активација коагулације са пратећим смањењем функције антикоагулантног система и фибринолизе су универзално присутни код пацијената са SIRS-ом и сепсом. Када започне, спирала сепсе је потпуно независна од инфективног процеса који је био у основи (7).

Тешка сепса компликована синдромом мултипле органске дисфункције (енг. Multiorgan dysfunction- MODS) је главни узрок смрти у Јединицама интензивне терапије, са стопом смртности која премашује 60%. У патофизиолошкој основи MODS-а значајни су дисфункција микроциркулације, цитопатска хипоксија и ослобађање инфламаторних цитокина (8).

Инциденца сепсе у САД се повећала са 73,6 / 100 000 пацијената 1979. год. на 175,9 / 100 000 пацијената 1989. год., да би почетком овог века тај број износио 300/100 000 пацијената (што премашује инциденцу срчаних обољења - 220/100 000 пацијента). Смртност од тешке сепсе се практично изједначила са смртношћу од акутног инфаркта миокарда (око 215 000 смртних случајева годишње). Када се тешка сепса пореди са другим тешким болестима (АИДС, карцином колона и дојке, хронична срчана инсуфицијенција, акутни инфаркт миокарда) примећује се да су учесталост пацијената са сепсом и смртност највећи (заједно са акутним инфарктом миокарда) (9).



СЛИКА 1. Поређење учесталости и смртности од тешке сепсе у односу на друге болести

Исход лечења болесника са тешком сепсом није детерминисан само инфекцијом већ и интензитетом имуно-инфламаторног одговора. У току последњих 50 година интензивно лечење критично оболелих пацијената је значајно побољшано. Применом нових лекова и савременог мониторинга, лечење шока, акутне бубрежне инсуфицијенције и акутне респираторне инсуфицијенције су значајно побољшани. Упркос овом напретку, 80-тих година прошлог века, појавио се нови проблем- прогресивно оштећење функција више органа код критично оболелих и повређених пацијената. Многбројне студије су показале да главни проблем у лечењу није било основно обољење или појединачна компликација, већ прогресивна дисфункција неколико међузависних органских система (9).

Масивна инфламаторна реакција, као резултат ослобађања цитокина, чини основу за развој мултиорганске дисфункције органа –MODS. Клинички знаци ове инфламаторне реакције назване су синдромом системског инфламаторног одговора – SIRS. Дакле, SIRS и MODS представљају сличне, ако не и идентичне процесе. Оба су изазвана истим клиничким тригерима и истим инфламаторним медијаторима. SIRS је фактор ризика за развој MODS-а. Разлика између ова два појма је више у функцији временског тока: SIRS описује процес, док MODS описује исход овог процеса. MODS се јавља код 30% пацијената са сепсом (10).

Траума и оштећење ткива такође индукују инфламаторни процес, који је важан за посттрауматску регенерацију и опоравак ткива. У случају тешке трауме, прејаки SIRS може довести до додатног оштећења органа и ћелија, што доводи до развоја MODS-а. Инфламаторни одговор након тешке трауме је у вези са тежином трауме и удружен је са морталитетом и са развојем компликација (MODS, сепса) (11, 12).

Према подацима СЗО, тешка траума је одговорна за 10% укупне смртности и 16% инвалидности широм света. Број особа страдалих у саобраћајним удесима расте током година, процена је да ће ово бити пети велики узрок смртности до 2030. године.

1.1. ДЕФИНИЦИЈЕ СЕПСЕ

Године 1991. American College of Chest Physician и Society of Critical Care Medicine Consensus Conference усвојили су нове дефиниције системског инфламаторног одговора (SIRS), сепсе и тешке сепсе. Тај синдром је представљен као континуим инфламаторног процеса који почиње са SIRS-ом, наставља се сепсом, која се може компликовати тешком сепсом и септичним шоком (13).

Инфекција се дефинише као инфламаторни одговор на присуство микроорганизама или као инвазија нормално стерилног ткива пацијента од стране тих микроорганизама.

Бактеријемиа је присуство виабилних бактерија у крви.

Сепса је SIRS изазван инфективним агенсом.

Тешка сепса се дефинише као сепса удружена са дисфункцијом органа, хиперперфузијом или хипотензијом.

Пошто је очито да се сличан, или чак идентичан, клинички одговор може настати у одсуству инфекције уведен је термин *синдром системског инфламаторног одговор (SIRS)*, без обзира на узрок (СЛИКА 2).

Клиничке манифестације SIRS-а укључују најмање два или више од наведених елемената у ТАБЕЛИ 1.

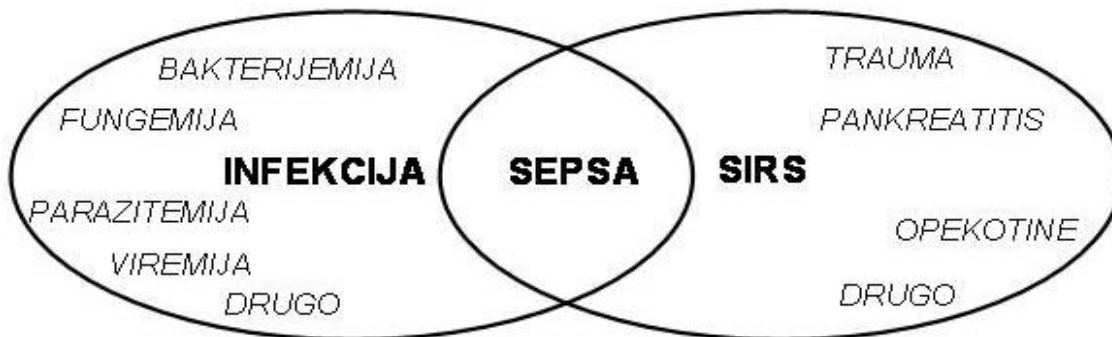
Телесна температура	> 38°C ili < 36°C
срчана фреквенца	> 90/min
тахипнеа – убрзано дисање	више од 20 удаха у минити или хипервентилација (парцијални притисак угљен диоксида у артеријској крви PaCO ₂ < 35mmHg);
број леукоцита	>12000/mm ³ ; <4000/mm ³ ; или присуство > 10% незрелих форми неутрофила

ТАБЕЛА 1 – Клиничке манифестације SIRS-а

Ове физиолошке промене треба да представљају акутну промену, у одсуству других познатих узрока за такве поремећаје, као што је неутропенија или леукопенија изазвана хемотерапијом (6).

Узроци SIRS-а су:

- а) инфективни агенси
- б) неинфективни патолошки узроци укључују: панкреатитис, опекотине, исхемија, траума ткива, хеморагични шок, оштећење ткива изазвано имунским механизмима, егзогено давање медијатора инфламаторног процеса као што су фактор некрозе тумора (TNF) и други цитокини- интерлеукини (IL-1 и IL-6).



СЛИКА 2 - Међусобни односи инфекције, сепсе и SIRS-а

Тешка сепса представља сепсу удружену са дисфункцијом органа, хипоперфузијом или хипотензијом. Хипоперфузија се може манифестовати лактацидозом, олигуријом или акутном променом менталног статуса.

Септички шок представља сепсу са хипотензијом, упркос адекватној надокнади течности, заједно са хипоперфузијом. Пацијенти који примају инотропне или вазопресорне лекове не морају бити хипотензивни док постоји доказана хипоперфузија.

Синдром мултипле органске дисфункције (MODS) представља динамични процес развоја поремећаја функције органа, који има фазну еволуцију код критично оболелих пацијената. Термин *дисфункција* означава феномен када орган није у стања да својом функцијом одржи хомеостазу. Акцент се ставља на динамични процес промене функције током времена (за разлику од инсуфицијенције која има дихотомни карактер: или је има или је нема). Дакле, MODS се дефинише као присуство измењене функције два или више система органа када се хомеостаза не може одржавати без терапијске интервенције.

Дефиниције са Консензус конференције о сепси из 1992. године су биле предмет великих расправа међу водећим светским стучњацима из ове области. Дијагностички критеријуми SIRS-а су корисни, али су превише сензитивни и неспецифични и на основу њих није се могао утврдити стадијум болести (14).

Године 2001. је одржана Consensus Conference by the Society of Critical Care Medicine/ European Society of Intensive Care Medicine/ American College of Chest Physicians/ American Thoracic Society/ Surgical Infection Society која је модификовала постојећу дефиницију сепсе (15). Према њима, сепса је инфекција са било којим дијагностичким критеријумом наведеним у ТАБЕЛИ 2. Ти критеријуми се заснивају на клиничким и лабораторијским параметрима. Не постоји појединачни параметар као ни сет параметра који су адекватно сензитивни или специфични за дијагнозу сепсе. Критеријуми за тешку сепсу су непромењени и она се дефинише као сепса са дисфункцијом органа. За утврђивање дисфункције органа препоручена је употреба SOFA скорa (16). Септични шок се дефинише као

персистентна хипотензија са систолним крвним притиском < 90 mmHg или средњи артеријски притисак < 70 mmHg или пад систолног крвног притиска > 40 mmHg, упркос адекватној надокнади волумена.

Такође, тада је предложен и систем PIRO у циљу боље процене, ефикаснијег лечења и повољнијег исхода болесника са сепсом. Класификација сепсе по том принципу, акроним је PIRO (енг. predisposition, infection, response, organ dysfunction) омогућава процену болесника на основу предиспозиције (генетска варијабилност, коморбидитет, старост, стање пре инсульта), природе и јачине инсульта (инфекција, траума), природе и јачине реакције организма на инзулт (клиничка слика, синтеза цитокина) и степена пратеће органске дисфункције која чини MODS (17).

	Критеријуми
Сепса	Документована (суспектна) инфекција са било којим од следећих клиничких или лабораторијским критеријумима
Општи параметри	Грозница, хипотермија, тахикардија, тахипнеа, промена менталног стања, периферни едеми, позитивни биланс течности, хипергликемија
Инфламаторни параметри	Леукоцитоза, леукопенија, незреле форме, повећан Ц-реактивни протеин, прокалцитонин, креатинин
Хемодинамски параметри	Артеријска хипотензија, сатурација мешане венске крви, кардијални индекс
Параметри дисфункције органа	Артеријска хипоксемија, олигурија, повећање креатинина, повећани ИНР или аПТТ, илеус, тромбоцитопенија, хипербилирубинемиа
Параметри ткивне перфузије	Хиперлактинемиа, успорено капиларно пуњење

ТАБЕЛА 2 – Критеријуми за сепсу из 2001. године

1.2. САВРЕМЕНА ДЕФИНИЦИЈА И КРИТЕРИЈУМИ ЗА СЕПСУ

Сепса се данас формално дефинише као животно угрожавајуће стање, које настаје када одговор организма на инфекцију, оштећује сопствена ткива и органе (18). Такође, у савременом схватању сепсе наглашава се постојање дисфункције органа, тако да се сепса дефинише као системски одговор организма на инфекцију са присуством различитог степена органске дисфункције (19).

Према водичу Surviving Sepsis Campaign из 2012. године (20) сепса се дефинише као присуство документоване или суспектне инфекције са системским манифестацијама, уз присуство неког/неких параметра наведених у ТАБЕЛИ 3.

Општи параметри	Грозница (>38,3°C) Хипотермија (<36°C) Срчана фреквенца (>90/мин) Тахипнеја Промењени ментални статус Значајни едеми, позитивни биланс течности (>20 мл/кг током 24 сата) Хипергликемија (>120 mg/dL или 7,7 mmol/l)
Параметри инфламације	Леукоцитоза (> 12000/mm ³) Леукопенија (< 4000/mm ³) Незреле форме (>10% незрелих форми) Ц-реактивни протеин Прокалцитонин
Хемодинамски параметри	Артеријска хипотензија (сistolни крвни притисак <90mmHg, средњи артеријски притисак <70 mmHg или пад систолног крвног притиска >40 mmHg).
Параметри органске дисфункције	Артеријска хипоксемија (PaO ₂ /FiO ₂ <300) Акутна олигурија (диуреза <0,5мл/кг/сат, током 2 сата, уз адекватну хидрацију) Пораст креатинина (>0,5 mg/dL) Абнормалност коагулације (INR>1,5 aPTT>60 sek) Илеус Тромбоцитопенија (<100x10 ¹²) Хипербилирубинемија (>4mg/dL или 70 μmol/L)
Параметри ткивне перфузије	Хиперлактинемија (>1 mmol/L) Продужено капиларно пуњење

ТАБЕЛА 3 – Дијагностички критеријуми за сепсу из 2012. год.

Тешка сепса се дефинише као сепса са органском дисфункцијом или ткивном перфузијом.

1.3. ДЕФИНИЦИЈА ТЕШКЕ ТРАУМЕ

У ширем смислу, траума представља повреду коју карактерише структурни и/или физиолошки дисбаланс настао као последица акутне изложености тела дејству ноксе (механичка, термичка, електрична, хемијска или радијациона повреда).

Политраума се дефинише као повреда два или више органа или система органа, од којих бар једна непосредно или посредно угрожава живот.

Примена скор система у трауми се користи за процену тежине повреде и предвиђање исхода лечења. Они могу бити анатомски, физиолошки или комбиновани.

Један од најчешће коришћених анатомских скор система у трауми је Скор тежине повреде (eng. Injury severity score – ISS) Бејкера из 1974. год. (21).

Бодују се повреде тела у 6 региона: глава и врат, лице, грудни кош, трбушна дупља, карлица и спољни омотач тела. Број бодова износи од 1 до 5 (1- лака, 2- умерена, 3- средње тешка, 4- тешка и 5- повреда опасна по живот), док је 6 смртна повреда.

Затим се сабирају квадрати највећих бројчаних вредности у три повређена региона тела – максимални износ појединачне повреде 25, максимални збир три доминантне повреде 75

Тешка траума се дефинише мултипла повреда са више од 16 бодова. Када је $ISS < 32$ повређени може да преживи трауму, док је код $ISS > 40$ мала вероватноћа преживљавања (22).

2. ИМУНСКО- ИНФЛАМАТОРНА КАСКАДА У СЕПСИ И ТРАУМИ

Имуноинфламаторни одговор је есенцијалан за резолуцију инzulта (инфекција, траума), али се може догодити да на неконтролисан начин проузрокује оштећење организма.

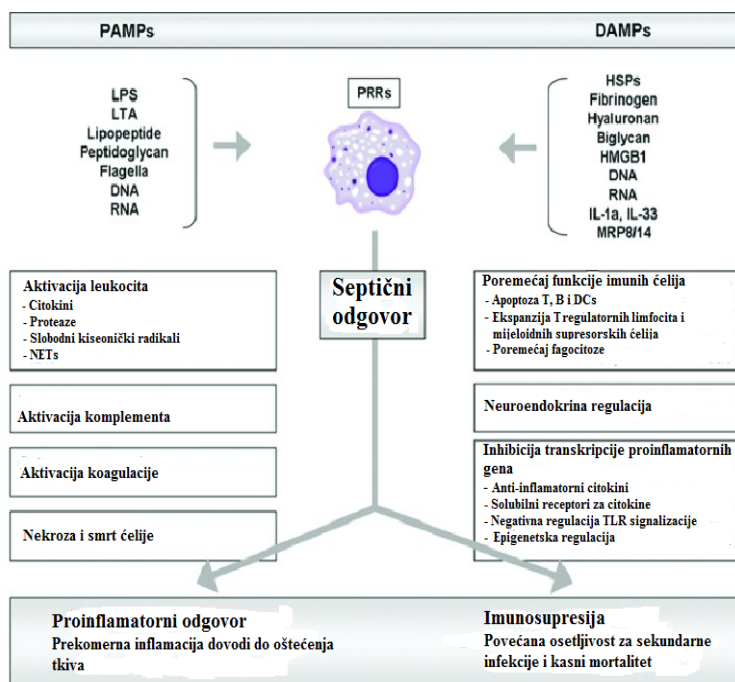
2.1. УЛОГА УРОЂЕНОГ ИМУНСКОГ СИСТЕМА У СЕПСИ

Урођени имунски систем је прва линија одбране против инвазивних микроорганизама. Реагује веома брзо и неспецифично и препознаје око 10^3 различитих микроорганизама. Његова функција је да елиминише или заустави инфекцију на месту уласка, покрене системску реакцију организма и да активира антиген- специфичан стечени имунски одговор (Т и Б лимфоцити). Састоји се од ћелија урођене имуности и солубилних молекула (комплемент, разни антимикробни пептиди) (23).

Урођени имунски одговор започиње активацијом ћелија урођене имуности- моноцити/макрофаге, дендритске ћелије, неутрофили, НК ћелије и ендотелне ћелије. Рецептори за препознавање микроорганизама (енг. Pattern-recognition receptors- PRR) су централна компонента урођене имуности, који препознају сигнале опасности (енг. danger signals) са инвазивних микроорганизама и започињу имунски одговор. PRR рецептори препознају конзервиране мотиве (делови зида ћелија или наследног материјала) који се називају молекулски обрасци (енг. Pathogen-associated molecular patterns- PAMPs). Примери ових образаца су: липополисахарид (део зида грам-негативних бактерија), пептидогликан, липопептиди, липотеихолична киселина (део зида грам-позитивних бактерија), флагелин и бактеријска ДНК (24).

PRR рецептори такође препознају ендogene сигнале опасности тзв. алармине (енг. Danger-associated molecular patterns- DAMPs) који се ослобађају током стерилног оштећења ткива (опекотине, траума, некроза ткива). Алармини су

молекули који могу изазвати локалну проинфламаторну реакцију са привлачењем ефекторских ћелија као што су фагоцити (25). Инфламаторни одговор током ових оштећења је готово истоветан оном који се јавља током инфекције, са сличним цитокинским и хемокинским профилем. Примери ових алармина, који доводе до даље амплификације проинфламаторног одговора, су протеин топлотног шока (heat shock protein - HSP), фибриноген, S100 protein, хијалуронска киселина и high-mobility group box-1 protein (HMGB1). Алармини су саставни делови свих типова ћелија и налазе се у различитим деловима ћелије, у једру као транскрипциони фактор (HMGB-1), у цитоплазми као регулатор калцијума (S100 protein), у егзозомима као шаперони- протеини надзорници (HSP) или као компонента ћелијског матрикса (хијалуронан) (26).



СЛИКА 3 – Одговор домаћина на егзогене (PAMPs) и ендogene (DAMPs) молекулске образце

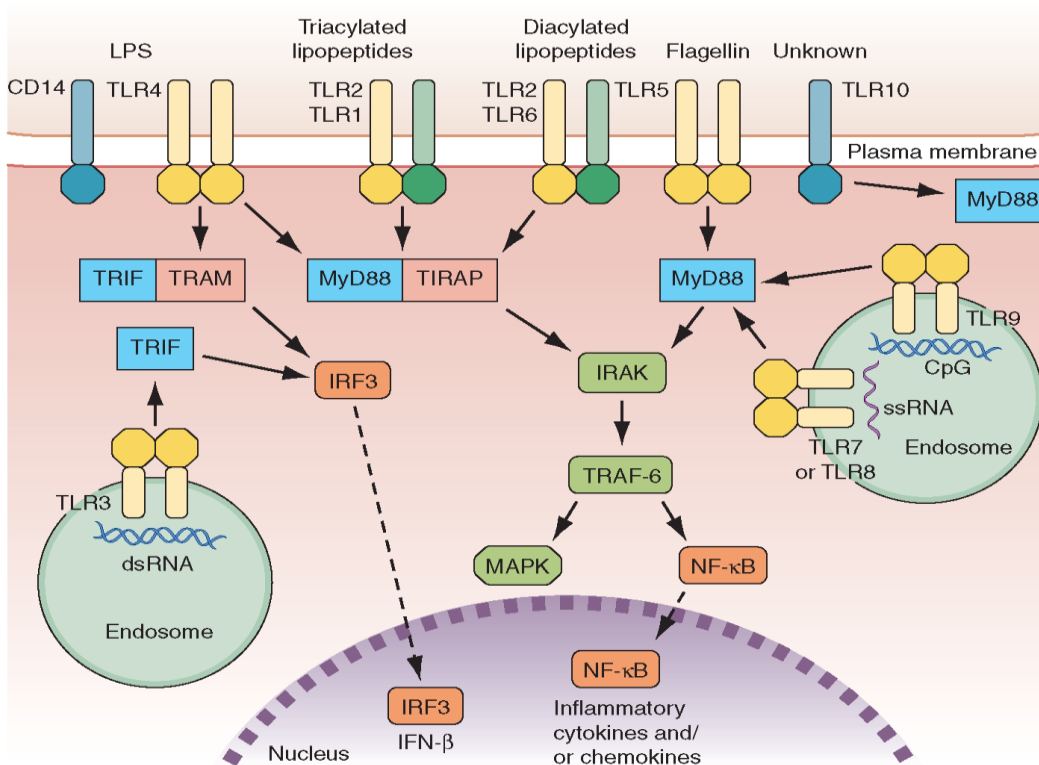
До сада су описана 4 типа PRR рецептора: рецептори слични Толу (енг. Toll like receptors-TLR), лектински рецептор (енг. C-type lectin), retinoic acid inducible gene 1-like receptors (RIG-like receptors) и nucleotide-binding oligomerization domain-like receptors (NOD like receptors). Ови рецептори су налазе у различитим деловима ћелије: на ћелијској мембрани, у цитоплазми и у ендоцитичним везикулама. Везивање лиганда за PRR рецепторе доводи до активације ћелија урођене имуности (пре свега моноцита/макрофага и дендритских ћелија), и стимулације сигналне каскаде која доводи до активације транскрипционих фактора, као што су нуклеарни фактор капа-Б (NF-κB) и интерферон регулаторни фактор (IRF). Активирани ћелије секретују инфламаторне медијаторе- фактор некрозе тумора (TNF), интерлеукине 1 и 6 (IL-1, IL-6), интерферон тип 1 (IFN), хемокине и простагландине.

Рецептори слични Толу (Toll-like receptors- TLRs) су најважнија група PRR рецептора. До сада је описано 13 различитих типова код сисара, односно 10 функционалних рецептора код људи и 12 код мишева. Лоцирани су на површини ћелије (TLR1, TLR2, TLR4, TLR5, TLR6, TLR10) или унутар ендозома (TLR3, TLR7, TLR8, TLR9). Функционални су у облику димера (хомо- или хетеродимери) и налазе се код различитих имунских ћелија (дендритске ћелије, макрофаге, Б-лимфоцити) и неимунских ћелија (фибробласти и епителне ћелије). Примери функционалних облика су хомодимери (TLR4) или хетеродимери (TLR2/ TLR1 и TLR2/ TLR6).

Грам- позитивне бактерије (пептидогликан из ћелијског зида) препознаје TLR2, такође овај рецептор препознаје и липотеихоличну киселину, диацил- и триацил липопептиде као и зимосан (гљиве). Грам- негативне бактерије (липополисахарид одн. ендотоксин из ћелијског зида) препознаје TLR4, али је прво потребно везивање LPS за липополисахарид везујући протеин (LBP), а затим се овај комплекс LPS-LBP везује за фагоцитне ћелије преко CD14. Задатак CD14 је трансфер LPS на MD2, екстрацелуларни молекул који је удружен са TLR4, и тада долази до олигомеризације рецептора. Флагелин (протеин из флагела) препознаје TLR5. Ендозомални TLR3, TLR7 и TLR8 препознају нукленске киселине из вируса

док TLR9 препознаје ДНК (неметиловане CpG мотиве) из бактерија, вируса и паразита (27).

Везивањем лиганда за рецепторе, активирају се 4 адаптер протеина односно значајна су два пута активације: MyD88- завистан пут (myeloid differentiation primary- response protein 88) и TRIF- завистан пут (TIR domain- containing adaptor protein- inducing INF-β). Већина TLR користи MyD88 сигнални пут, осим TLR3 који користи TRIF пут. Оба сигнална пута користи TLR4.



СЛИКА 4 – Активација рецептора сличних Толу (TLR)

У патогенези сепсе, најзначајнију улогу има TLR4. Овај рецептор је важан за рану детекцију патогена и за иницијацију адекватног одговора урођеног имунског система. Експерименталне студије су показале, да у случају дефицијенције TLR функције, постоји повећана осетљивост на инфекцију. Такође, полиморфизам TLR

гена је удружен са различитом осетљивошћу на бактеријске инфекције. Са друге стране, неконтролисана TLR стимулација доводи до неадекватне инламације и до оштећења ткива и органа, што се догађа током сепсе.

Ц- реактивни протеин (CRP) је протеин акутне фазе који се ослобађа из јетре, након почетка инфламације или оштећења ткива. Током инфекције, може имати и про- инфламаторне али и анти- инфламаторне ефекте. Ниво у плазми се повећава у току 4- 6 сати после иницијалног оштећења ткива, док се повишени ниво одржава током 24- 48 сати. CRP препознаје и облаже патогене и оштећене ћелије, и на тај начин омогућава њихову елиминацију преко интеракције са ћелијама урођене имуности (макрофаге, неутрофили). Такође, CRP превенира адхезију неутрофила на ћелије ендотела, инхибира продукцију супероксида и повећава продукцију IL-1ra. Мада је IL-6 типични стимулатор индукције CRP-а, и други цитокини су значајни за његову продукцију (28).

Површински молекул CD64 (енг. Cluster of differentiation- 64) је високо афинитетни имуноглобулински Fc гама рецептор тип 1. Конститутивно је експримован на моноцитима и врло мало на мирујућим полиморфонуклеарним ћелијама. У инфекцији, експресија CD64 на овим ћелијама значајно расте и индикатор је активности урођене имуности да повећа ниво фагоцитозе. Ова експресија се повећава у првим сатима након инфекције (4-6 сати). Експресија CD64 на неутрофилима у мирујућем стању стартује са мање 1000 до 2000 места по ћелији, и расте у зависности од интензитета стимулуса (и до 10 пута). У том смислу, CD64 има пожељне карактеристике биомаркера и може се користити за разликовање бактеријске инфекције од других инфламаторних болести (29).

2.2. УЛОГА УРОЂЕНОГ ИМУНСКОГ СИСТЕМА У ТРАУМИ

Тешку трауму прати развој SIRS-а. Овај одговор се активира већ након 30 минута од дејства инзулта и последица је оштећења ткива и губитка крви. SIRS настаје ослобађањем ендогених фактора- DAMPs или алармина, из ћелија под дејством стреса (резултат трауме, исхемије- реперфузије, хемијска оштећења

ткива). Везивањем за површинске рецепторе, DAMPs директно активирају многе имунске ћелије (неутрофили, моноцити/макрофаге). Такође, они могу да активирају и комплемент систем са ослобађањем компоненти C3a и C5a. Активацијом система комплемента и имунских ћелија, продукује се и ослобађа велика количина про-инфламаторних медијатора, што доводи до развоја синдрома SIRS-a (10).

Имунски систем поседује серију контролних повратних механизма, у циљу одржања хомеостазе. SIRS прати компензаторни анти-инфламаторни одговор, који се карактерише повећаним нивом цитокина са анти-инфламаторним дејством. У зависности од баланса про- и анти-инфламаторног одговора, процес може да се смири и врати на базални ниво, или може да прогредира у перзистентну инфламацију, имуносупресију и катаболички синдром. Сва ова стања могу довести до развоја дисфункције органа.

Цитокин HMGB1 је значајан у иницијацији и пропагацији инфламаторног одговора након трауме. Показано је да ниво серумског HMGB1 повишен унутар првог сата након механичке трауме (фрактура, хеморагија) и да је повезан са дужим лечењем у Јединици интензивне терапије (30). Такође, ови пацијенти имају повешен ризик за развој сепсе и MODS-a након трауме (31).

2.3. ЦИТОКИНИ

Синхронизација имунског и инфламаторног одговора зависи од комуникације између ћелија солубилним молекулима који се називају цитокини. То је хетерогена група ниско молекуларних секретованих протеина који регулишу интензитет и трајање имуно-инфламаторног одговора. Цитокини су интерцелуларни гласници који модулирају биолошке одговоре и делују на различите типове ћелија. Имају кратко пролазно дејство и малу молекулску масу- између 8 и 30 kD. Рецептори за цитокине показују врло висок афинитет за своје лиганде (10^{-9} до 10^{-12} M), а биолошки ефекат се јавља при врло ниској заузетости рецептора (испод 5%). Цитокини су високо активни при врло малим концентрацијама (пикомоларне или мање), и као лиганди се везују за ћелијске

површинске рецепторе и производе промене у транскрипцији РНК и синтезе протеина. Они имају вишеструке ефекте на раст и диференцијацију читавог низа типова ћелија са значајним преклапањем ефеката. Интеракција се може догодити у каскадном систему у којем један цитокин индукује други, преко модулације рецептора другог цитокина и преко синергизма или антагонизма два цитокина који делују на исту ћелију (32).

Термин цитокин се примењује на растући број пептида, протеина или гликопротеина (тренутно више од 250), који служе као хемијски гласници између ћелија, који стимулишу ћелијски раст и диференцијацију, репарацију ткива и ремоделирање и регулацију имунског одговора. У урођеном имунском одговору ефекторне цитокине производе углавном моноцити, дендритске ћелије и НК ћелије, док у стеченом имунском систему већину цитокина производе активирани Т лимфоцити (33).

Специфична дејства цитокина зависе од стимулуса, типа ћелије и присуства других медијатора и рецептора (34).

Цитокини се разликују од ендокриних хормона у следећем:

1. Производе их бројни типови ћелија а не органи
2. Примарно се стварају *de novo*, у одговору на стимулус активацијом транскрипције гена као резултат ћелијске активације
3. Није доказана њихова значајна улога у одржавању хомеостазе у нормалним условима
4. Често се индукују у одговору на егзогене (не ендogene) стимулусе
5. Имају аутокрине и паракрине ефекте, а када се секретују у великим количинама могу имати и ендокрино дејство

TNF α	Промоција инфламације, индукција адхезионих молекула на ендотелу, синергистичко дејство са IL-1
IL-1 β	Индукција адхезионих молекула на ендотелу, окупљање имунских ћелија, промоција инфламације, ослобађање NO из ендотелних и глатких мишићних ћелија
IL-6	Медијатор грознице и имунског акутно-фазног одговора, диференцијација TH17 одговора, продукција ткивног фактора и активација коагулације
IL-17/IL-17A	Окупљање и моноцита и неутрофила на месту инфламације, експресија на NK ћелијама,

ТАБЕЛА 4 – Про- инфламаторни цитокини и њихова функција у инфекцији/сепси

TGF	Модулација активности цитокина преко појачавајућег или антагонизујућег ефекта, ометање пролиферације и диференцијације Т и В лимфоцита, промоција резолуције и опоравка ткива
IL-4	Не ослобађа се у сепси, супресија мацкрофагне активности, општи имуносупресивни ефекти
IL-10	Модулација про- инфламаторног одговора, промоција хуморалног одговора, блокада урођеног имунског одговора и про- инфламаторне цитокинске активности
IL-13	Промена експресије рецептора на моноцитима/макрофагама, смањена експресија CD14, смањена експресија про- инфламаторних цитокина у моноцитима/макрофагама

ТАБЕЛА 5 – Анти- инфламаторни цитокини и њихова функција у инфекцији/сепси

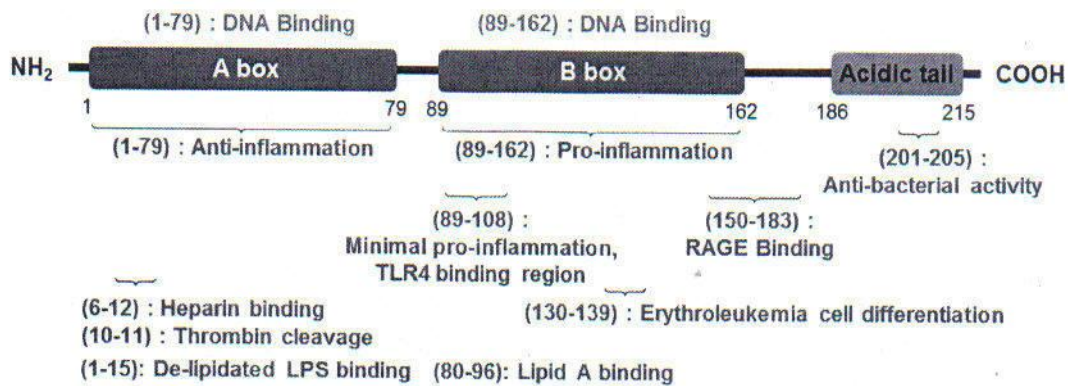
2.4. ГРАЂА И УЛОГА ПРОТЕИНА HMGB1

HMGB1 је први пут изолован из тимуса телади 1973. год. и добио је назив по његовој великој електрофоретској покретљивости у полиакрилном гелу. У студијама из 1999. год. показано је његово ослобађање из културе макрофага, 8 сати након стимулације са ендотоксином, TNF или IL-1 (35). Такође, показано је, да у екстрацелуларном простору HMGB1 активира инфламаторни одговор изазивајући грозницу, губитак телесне тежине, анорексију, дисфункцију епитела, артритис и смрт. Одложена примена антитела против HMGB1 смањује смртност изазвану ендотоксином код мишева (36).

HMGB1 је нехистонски хромозомски протеин, састоји се од 215 аминокиселина, молекулске масе око 28kD и присутан је у готово свим типовима ћелија. Високо је конзервиран током еволуције и његова структура је идентична 98% између миша и човека (37).

HMGB1 је први идентификовани члан фамилије HMGB протеина. Ова фамилија се састоји од HMGB1, -2 и -3 протеина (и од новооткривеног -4 протеина). HMGB1 се налази у готово свим типовима ћелија, док је експресија HMGB2 ограничена на лимфно ткиво и тестисе код одраслих животиња. HMGB3 се налази само у ћелијама ембриона и хематопоетским стем ћелијама. Сви чланови фамилије HMGB протеина имају сличну структуру (80% идентичности) и домен организацију, али су продукти различитих гена.

Протеин HMGB1 се састоји од два базна, спирално увијена ДНК домена – домен А (A-box) 1-79 амк, и домен Б (B-box) 89-163 амк, и од јаког киселог, Ц краја- реп (C tail), 186-215 амк. У репу се налазе низови глутаминске и аспартанске киселине. Између домена и репа су уметнути кратки низови неуталних аминокиселина (38).



СЛИКА 5 – Структура и функција HMGB1 протеина

Јединствени облик и структура HMGB1 протеина су значајни за његове вишеструке улоге у ћелији. Овај протеин се састоји од три α - хеликса спакованих у

L- конфигурацију (обухвата 75% структуре) и садржи значајан број базних и ароматичних киселина који су саставни делови HMGB1 домена. Унутар аминокиселинских резидуа, налазе се циљне резидуе, као места могуће пост-транслационе модификације, што има утицај на функцију HMGB1 протеина (39).

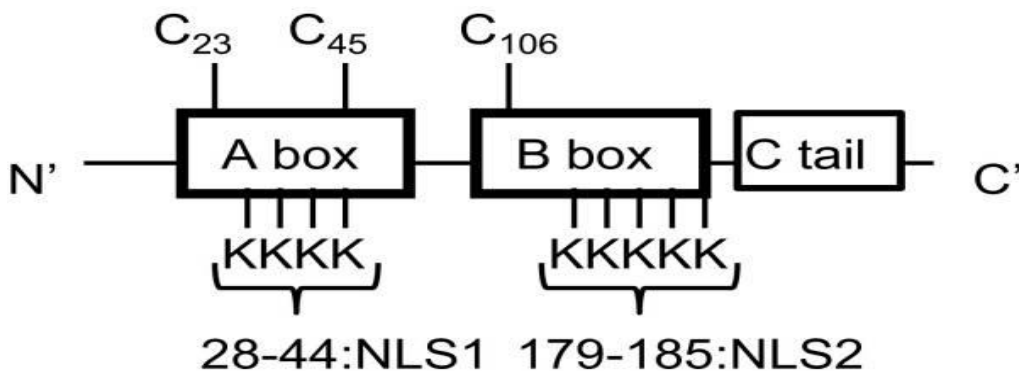
Домен А је укључен у везивање HMGB1 за оштећену ДНК и делује као специфични антагонист за HMGB1, показујући анти- инфламаторно дејство. Такође, он садржи хепарин везујући домен (6-12) и протелитичко место (10-11) за везивање тромбина. Показано је смањење про- инфламаторне активности протеолитичким дејством комплекса тромбин- тромбомодулин.

Домен Б, поред везивања за ДНК, показује и цитокинску активност, стимулишући ослобађање TNF-а и других про- инфламаторних цитокина из макрофага. Он садржи два везујућа места за TLR- (89-108) и RAGE- (105-183) рецептор, који су круцијални за активацију макрофага и ослобађање цитокина. Првих 20 резидуа у домену Б (89-108) представља минималну количину пептида за индуковање про- инфламаторног одговора.

Ц- терминални реп (C- tail) је одговоран за поправљање ДНК оштећења и увртање ДНК молекула, што омогућава везивање транскрипционих фактора. Најважнија улога репа је у одржавању структурне стабилности HMGB1.

Протеин HMGB1 садржи и два LPS везујућа места у домену А (3-15) и домену Б (80-96) који су значајни за HMGB1- LPS- TLR4 сигнални пут.

Такође, HMGB1 има две једарне секвенце (енг. Nuclear localization sequence- NLS), лоциране у домену А (амк 28-44) и домену Б (амк 179-185), са 4 конзервираних лизинских резидуа у домену А (NLS1) и 5 лизинских резидуа у домену Б (NLS2). Ове секвенце су места могуће модификације процесом ацетилације, која је одговорна за ослобађање протеина HMGB1 из једра.



СЛИКА 6 – Структурне карактеристике протеина HMGB1

Протеин HMGB1 има специфичне просторне функције (ТАБЕЛА 6).

У једру, HMGB1 одржава структуру хроматина, везујући се за ДНК на неспецифични секвенцијални начин и регулише ДНК репликацију, транскрипцију, рекомбинацију, поправку као и формацију нуклеозома.

Ослобођен из једра у ћелију (цитоплазматски HMGB1) укључен је у процесе аутофагије и активације инфламазома. Аутофагија је хомеостазни процес, присутан код свих еукариотских ћелија и укључује секвестрацију цитоплазматских компоненти у аутофагозомима. Ове структуре се спајају са лизозомима, где се њихов садржај подргава процесима деградације и рециклирања. Аутофагија је механизам за преживљавање ћелија под условима стреса, који одржава интегритет ћелије преко уклањања ћелијског дебриса и регенерације метаболичких прекурсора (40). Активни инфламазом, интрацелуларни протеински комплекс, регулише ослобађање HMGB1 из активних имунских ћелија, као одговор на различите сигнале опасности (41, 42).

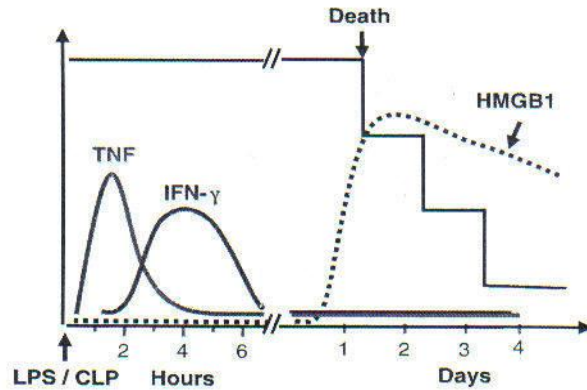
Екстрацелуларни HMGB1 учествује у низу имунских реакција и има улогу типичног сигнала опасности. Структурно- функционалне студије су показале да HMGB1 Б домен има цитокинску активност, док домен А делује као специфични HMGB1 антагонист, без још познатог објашњења. HMGB1 има 3 цистинске резидуе на позицији 23, 45 и 106, које су осетљиве на редокс- зависне модификације (редукција, оксидација). Наведене редокс- зависне, као и ацетил-

модификације директно одређују цитокинску и хемотаксичну активност HMGB1 (43). Најновије студије указују и на значај HMGB1 у цитоплазми, као сензорног молекула, који покреће урођени имунски одговор, препознавањем и везивањем вирусних нуклеинских киселина (44).

Једро	Везан за ДНК- регулација транскрипције Стабилизација хроматина Структура нуклеозома Репликација ћелије Поправка ДНК
Интрацелуларни HMGB1	Активација инфлазома Аутофагија Сензорни молекул (вируси)
Екстрацелуларни HMGB1	Везан за мембрану- раст неурита, активација тромбоцита Екстрацелуларно- проангиогенски, антибактеријски Цистеин редуковани- инфламаторни, хемокин, хемотоксија Цистеин оксидовани- неинфламаторни Цистеин, дисулфид везани- инфламаторни, цитокин Лизин хиперацетиловани- инфламаторни, цитокин

ТАБЕЛА 6 - Улоге HMGB1 у различитим ћелијским просторима

За разлику од других проинфламаторних цитокина, ране експерименталне и клиничке студије су показале да HMGB1 има одложену кинетику ослобађања (6-24 сата) у току инфламаторне каскаде у трауми и сепси и да је познат као „касни цитокин“. Код мишева, инјекција липополисахарида дата у болус дози, изазива скок циркулишућег TNF унутар 60 до 90 минута и одржава се 4 сата, док се скок IL-1 β јавља 4 до 6 сати након инјекције. Скок циркулишућег нивоа HMGB1 јавља се након 14 сати и одржава се у наредних 30 сати (45,46).



СЛИКА 7 – Рани (TNF, IFN- γ) и касни медијатор (HMGB1) у смртном исходу сепсе

Данас је познато, да се HMGB1 рано ослобађа у процесима акутног ћелијског стреса (исхемије, хипоксија) или током некрозе ћелија (47).

2.5. HMGB1 ЦИТОКИНСКА АКТИВНОСТ

Као део урођеног имунског система, HMGB1 могу активно секретовати различити типови ћелија: моноцити/макрофаге, NK ћелије, дендритске ћелије, ћелије ендотела и тромбоцити.

Моноцити/макрофаге активно секретују HMGB1 на дозно и временски зависан начин, као одговор на различите стимулусе: PAMPs (ендотоксин, ds-RNA, CpG-DNA), DAMPs (ATP) и цитокине (TNF, IFN γ). HMGB1 се не може секретовати преко класичног ендоплазматског- Голџијевог секреторног пута, јер нема лидер сигналну секвенцу. За активну секрецију је неопходна ацетилација HMGB1 молекула у једру, као и функција инфламазома у цитоплазми. Пироптоза, програмирана некротична ћелијска смрт (макрофага и дендритских ћелија) индукована каспазом-1, је значајни пут активне HMGB1 секреције преко активације инфламазома (36). У пироптози, слично као у апоптози, долази до промена у једру са кондензацијом и распадом хроматина и ДНК. Каспаза- 1 индукује настанак цитокина IL-1 β и IL-18 из њихових прекурсора (48).

Цитокин HMGB1 пасивно секретују некротичне или оштећене ћелије (исхемија/реперфузија, непенетрантна траума, излагање јетре токсичним

хемикалијама), када се ослобађа велика количина овог цитокина, док апоптоичне ћелије ослобађају знатно мању количину. Ослобођени HMGB1 на овај начин, активира урођени имунски систем као одговор на стерилно оштећење. Овај одговор је идентичан оном имунском одговору који се јавља према микроорганизмима (49).

У екстрацелуларном простору, ослобођени HMGB1 се веже за површинске рецепторе (најмање њих 10) на ћелијама- RAGE (Receptor for advanced glycation end products), Рецептори слични Толу (TLR-2, TLR-4 и TLR-9), макрофагни антиген-1 (Mac-1), syndecan-3 (CD138), тромбомодулин, CD24, TIM-3 и други. Везивањем ових лиганда за рецепторе, активирају се различити сигнални путеви у ћелијама: нуклеарни фактор (NF- κ B), интерферон регулаторни фактор- 3 (IRF-3) и фосфоинозитид 3- киназа (PI3K). Функционални одговори су активација ћелија урођене имуности, индукција про- инфламаторних цитокина и интерферона, стимулација ћелијске адхезије и миграције, инхибиција фагоцитозе, промоција ћелијске пролиферације и ангиогенезе као и индукција аутофагије (50,51).

RAGE рецептори су мултифункционални трансмембрански протеини који припадају суперфамилији имуноглобулина, и значајни су у патогенези акутних и хроничних патолошких стања као што су атеросклероза, дијабетес и канцер. Ови рецептори могу препознати различите лиганде: HMGB1, S100 protein, бета интегрине и друге. Домен Б молекула HMGB1 (амк 150-183) је значајан за везивање са RAGE рецепторима. Интеракције HMGB1-RAGE су значајне за хемотаксу и миграцију, пролиферацију и диференцијацију имунских али и канцерских ћелија. Такође, RAGE рецептори су значајни за коактивацију са другим рецепторима (TLR9, Mac-1) или за презентацију површинског HMGB1 другим рецепторима (TLR-4, CXCR4) (52).

TLR-4 је главни рецептор за покретање активације макрофага, ослобађања цитокина и оштећења ткива. Поред директног везивања за рецептор, HMGB1 може формирати хетерокомплексе са другим молекулима, као што су IL-1, CXCL 12, DNA, RNA, хистони или липополисахарид, и на тај начин остварује синергистичко дејство у односу на појединачне компоненте. Такође, HMGB1 може бити сензорни

молекула за LPS, а истовремено и трансфер молекула за везивање са CD14. На овај начин, HMGB1 покреће урођени имунски одговор, укључујући хемотаксичну активност и ослобађање про- инфламаторних цитокина, који изазивају грозницу, дисфункцију епителних баријера и акутну и хроничну инфламацију. Активација TLR-4 и интеракција са лигандом зависи од везивања са екстрацелуларним адаптер протеином MD-2. Високо афинитетно везивање HMGB1, које је слично везивању липополисахарида, за протеин MD-2, неопходно је за покретање цитокинске активности. Такође, потребно је присуство свих цистинских резидуа у молекулу HMGB1 за интеракцију са MD-2. Везивање HMGB1 за TLR4 је значајно у многим акутним и хроничним инфламаторним болестима (53).

TLR 9 је интрацелуларни рецептор који је лоциран на ендозомима. HMGB1, као део комплекса ДНК, везујући се за TLR9, доводи до продукције цитокина преко MyD88- и NF- κ B сигналног пута. Такође, HMGB1 може интерреаговати са CpG-DNA и довести до појачане редистрибуције TLR9 на ендозомима, са повећаном продукцијом цитокина.

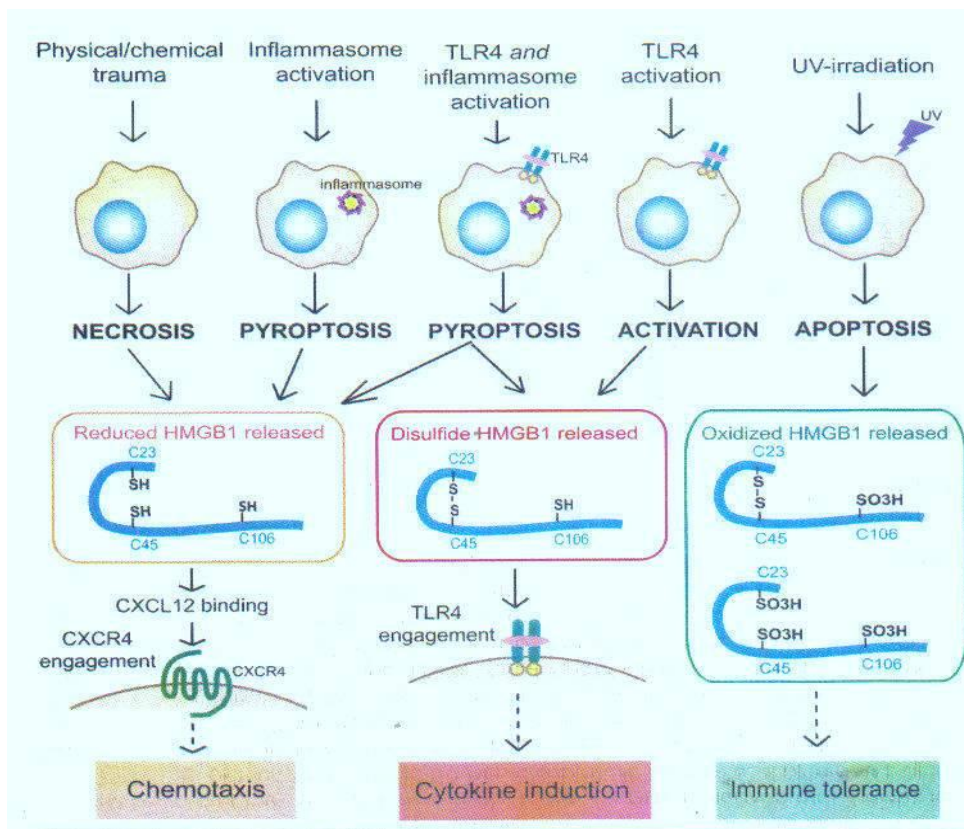
HMGB1 може реаговати и са молекулама који су негативни регулатори његове активности као што је комплекс CD24- Siglec 10. Такође, тромбомодулин, површни гликопротеин васкуларних ендотелних ћелија, може везати HMGB1 и спречити његову интеракцију са RAGE рецепторима, делујући на тај начин анти-инфламаторно. И солубилни RAGE рецептори могу учествовати у процесу инактивације и неутрализације HMGB1, са којим се симултано ослобађају у тешкој трауми.

2.6. РЕГУЛАЦИЈА HMGB1 ЦИТОКИНСКЕ АКТИВНОСТИ

Молекула HMGB1 се може значајно модификовати посттранслационом обрадом и то процесима оксидације, ацетилације, метилације и фосфорилације. Неке од ових модификација могу имати утицај на функције HMGB1 као протеина: везивање ДНК и стабилизацију, локализацију у ћелијама и регулацију транскрипције. Показано да од редокс статуса три цистеинске резидуе зависи

способност везивања HMGB1 за рецепторе као и његова биолошка активност. Ове посттранслационе модификације могу имати велики утицај на контролу про-инфламаторне активности HMGB1 током патогенесе сепсе и других инфламаторних болести (54).

Молекулу HMGB1 за своју цитокинску активност захтева да цистеинске резидуе на позицији -23 и -45 формирају дисулфидну везу-мост, док резидуа на броју -106 мора бити у тиол облику. Ово је неопходно да би се HMGB1 везао за рецептор TLR4/MD2 и остварио своју про-инфламаторну функцију и активацију нуклеарног фактора транскрипције (NF- κ B).



СЛИКА 8 – Механизми ослобађања и дејства различитих изоформи HMGB1

Такође, редокс статус HMGB1 молекула утиче на његову хемотаксичну активност, у привлачењу неутрофила и моноцита на место инфламације, и разликује

се од статуса који је неопходан за цитокинску активност. Наиме, за хемотаксу је потребно да све три цистеинске резидуе буду потпуно редуковане (тиол облици). Ова молекулска форма HMGB1 молекула има способност формирања хетерокомплекса са хемокином CXCL12 (stromal cell- derived factor 1), са којим се синергистички везује за CXCR4 рецептор. Терминална оксидација било које цистинске резидуе доводи до губитка хемотаксичне активности. Експерименталне студије су показале да су редокс статус HMGB1 молекула и његова цитокинска активност реверзибилни процеси.

Према консензусу из 2014. године (55) постоје три главне изоформе HMGB1: „дисулфидни HMGB1“, „тиол HMGB1“ и „оксидовани HMGB1“.

„Дисулфидни HMGB1“ изоформа је про- инфламаторни цитокин који активира моноците/макрофаге и друге ћелије за продукцију цитокина и додатних инфламаторних медијатора. То је главна изоформа која се накупља у екстрацелуларном простору током акутне и хроничне инфламације.

„Тиол HMGB1“ изоформа је хемокински молекул који прави комплекс са хемокином CXCL12 и привлачи инфламаторне ћелије у поља некрозе. Ово је главна форма која се ослобађа током процеса некрозе ћелија (стерилна повреда).

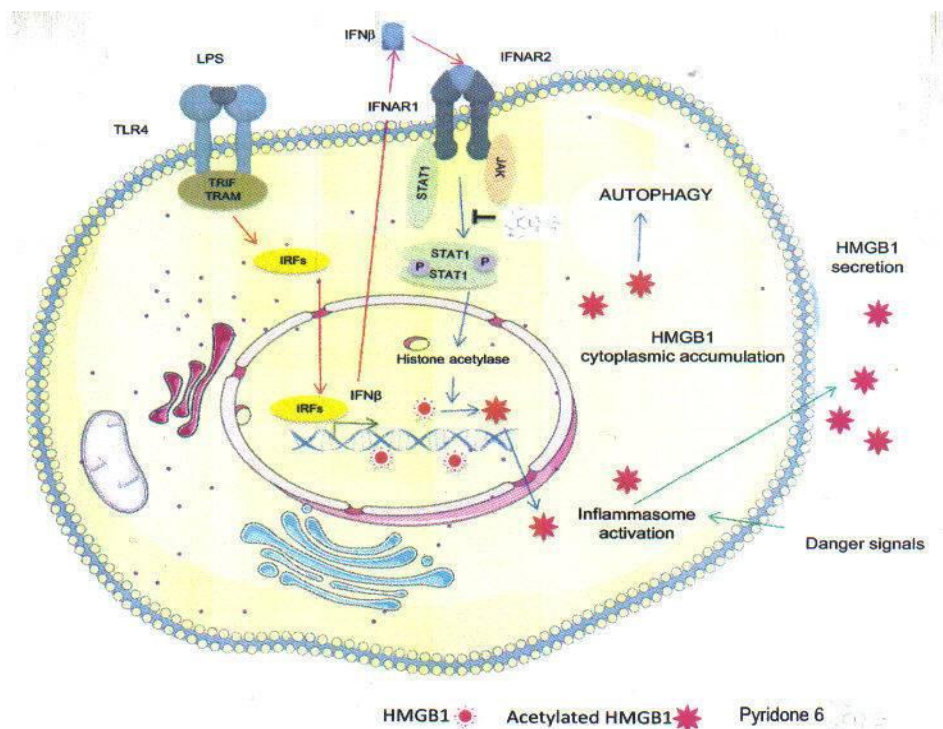
„Оксидовани HMGB1“ изоформа нема инфламаторну улогу, мада још није позната тачна улога ове изоформе.

2.7. СЕКРЕЦИЈА ЦИТОКИНА HMGB1

Секреција цитокина HMGB1 је од кључног значаја за процес инфламације. Она се одвија на неконвенционални начин, пошто нуклеарни протеин HMGB1 нема лидер пептид који ће га водити до ендоплазматског ретикулума, тако да не постоји могућност секреције процесом егзоцитозе. Ацетилација лизинских резидуа унутар два NLS места је одлучујући регулаторни механизам транспорта HMGB1 из једра у цитоплазму. Ова ацетилација се одвија уз помоћ ензима хистон ацетилтрансферазе (додаје ацетил групу на аминок групу лизина). Други механизам је фосфорилација

серина под дејством $TNF-\alpha$, која се одвија такође у NLS местима, преко класичне протеин киназе Ц (сРКС) зависне од калцијума (56).

LPS се везује за рецептор TLR4 и доводи до транскрипције гена за интерферон ($IFN-\gamma$). Ослобођени $IFN-\gamma$ се затим аутокринно везује за одговарајући интерферонски рецептор (IFNAR) и доводи до фосфорилације регулаторног протеина STAT-а преко киназе JAK. Везивање цитокина за мембрански рецептор, доводи до алостеричне промене рецептора. На овај начин, рецептор стиче погодну конформацију за фосфорилацију од стране киназе JAK. Регуларни протеини STAT (енг. Signal transducers and activators of transcription) садржи домен SH2 који препознаје фосфорилисани рецептор. Везивањем за комплекс рецептор- киназа JAK, фосфорилише се и протеин STAT, односно његови SH2 домени. Преко ових домена, протени STAT формирају хомодимере, који из цитоплазме прелазе у једро и везују се за регулаторне елементе гена који контролишу. Активирани STAT1 доводи до ацетилације HMGB1 и до његовог прелазка из једра у цитоплазму (57).



СЛИКА 9– Механизам HMGB1 секреције индуковане липополисахаридом (LPS)

Инфламазоми регулишу даљи прелазак HMGB1 из цитоплазме у екстрацелуларни простор. Инфламазоми су група цитоплазматског протеинског комплекса, који су молекулска основа за протеолитичку активност уз помоћ каспазе- 1, за секрецију интерлеукина (IL-1 β , IL-18). Састоје се од најмање 2 компоненте: про-каспазе 1 и NOD рецептора (NLR) или молекула из PYHIN фамилије (најбоље проучен је NLRP3 молекул). Инфламазом могу активирати бројни егзогени и ендогени алармини, укључујући делове бактерија, РНК вирусе, двоструку РНК, екстрацелуларни АТП, соли урата, алуминијум, силицијум и слободне масне киселине (58). Активација инфламазома преко липополисахарида (LPS) процесом аутофосфорилације, се одвија уз помоћ протеин киназе (double-stranded RNA- dependent protein kinase- PKR). Она функционише као интрацелуларни сензорни стрес молекул и за активацију инфламазома су потребна два сигнала: сигнал са рецептора PRR и сигнал стреса ћелије (59).

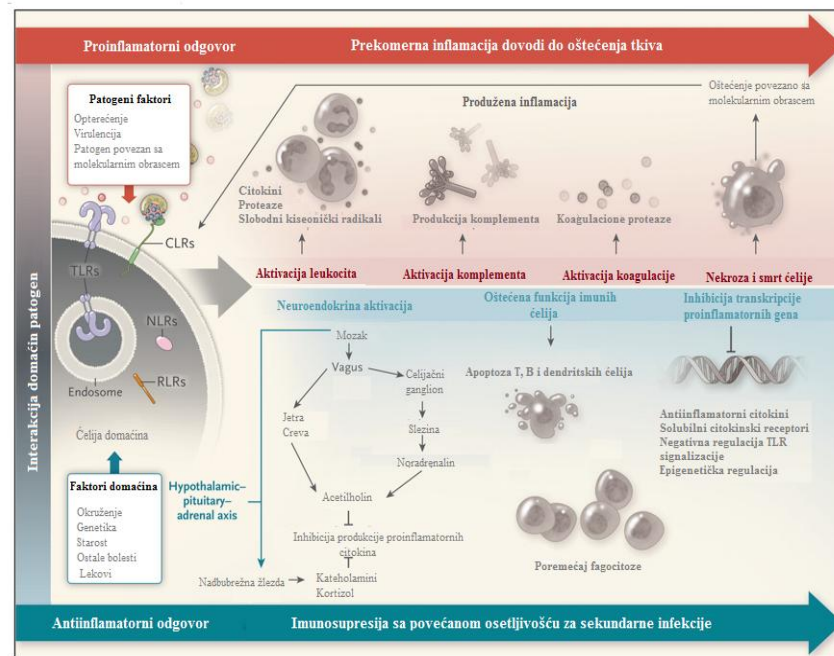
Поред класичних инфламазома, описана је и група некласичних инфламазома, који активирају каспазу-11. Ова каспаза реагује са каспазом-1, и доводи до сазревања про-цитокина IL-1 β и IL-18, под дејством нескласичних стимулуса, као што је бактерија E.coli (60,61).

3. СЕПСА И ТРАУМА

Сепса настаје системским ширењем локалног инфламаторног одговора, који је изазван одређеним патогеном, уз активацију комплемента и коагулационог система. Ризични фактори за развој тешке сепсе, су генетска предиспозиција, тренутно здравствено стање, присуство хроничних болести и правовременост терапијских интервенција. Такође, значајни су и старост, пол и расна и етичка припадност (62).

3.1. ПАТОФИЗИОЛОГИЈА СЕПСЕ

Одговор имунског система домаћина може бити и про- инфламаторни и анти- инфламаторни. Смер, јачина и трајање ове реакције су детерминисани факторима патогена и факторима домаћина.



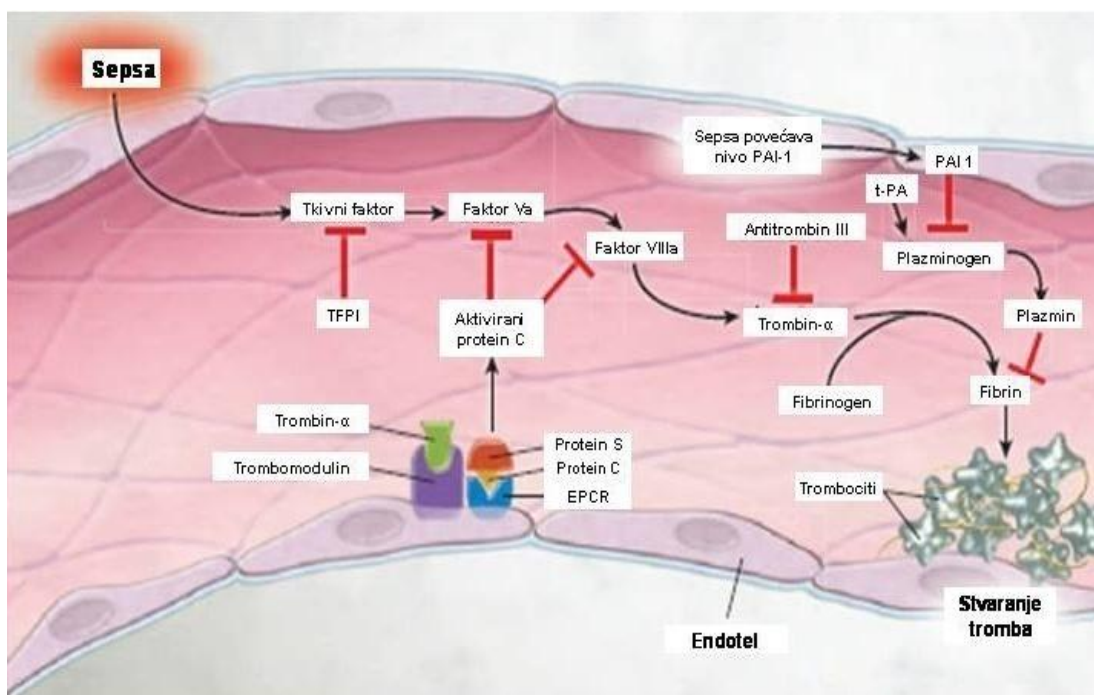
СЛИКА 10 – Одговор имунског система у тешкој сепси

Ћелије урођене имуности, моноцити/макрофаге, дендритске ћелије али и ендотелне и епителне ћелије, луче снажне про- инфламаторне цитокине, пре свега фактор некрозе тумора (TNF- α), интерлеукин-1 и -6 (IL-1). Оба ова цитокина су способна да активирају циљне ћелије и индукују даљу продукцију цитокина. Остали цитокини, значајни за развој сепсе су: IL-6, IL-8 (хемокин CXCL8), IL-12, интерферон- гама (IFN- γ), фактор стимулације гранулоцитних колонија (G-CSF) и анти-инфламаторни цитокин IL-10. Цитокин IL-17 и IL-22 су продукти Th17 лимфоцита са проинфламаторним дејством, у одговору на екстрацелуларне бактерије и гљивице (63).

Ови медијатори делују на ендотелне васкуларне ћелије и узрокују вазодилатацију (азот-моноксид), повећану васкуларну пропустљивост и окупљање неутрофила у ткивима.

Активација фактора комплемента је део инфламаторне реакције на инфекцију. У експерименталној и клиничкој сепси, детектује се повећан ниво компоненти C3a и C5a. C5a компонента је део C5, која настаје активацијом система комплемента класичним, алтернативним или лектинским путем. C5a се везује за своје рецепторе на фагоцитима (неутофилима), али и на другим немијелоидним ћелијама (ендотелне ћелије) и доводе до ослобађања цитоплазматских гранула, продукције кисеоничних радикала (ROS) и до хемотаксичног одговора.

Сепса је удружена са мултиплим променама прокоагулантних и антикоагулантних механизма. Хематолошки поремећаји у инфекцији, могу се кретати од благог прокоагулантног стања до фулминанте дисеминоване интраваскуларне коагулације (DК), која се јавља код 30% пацијената са сепсом. Сепса је прокоагулантно стање која доводи до депозиције фибрина преко 3 главна пута: генерација тромбина преко ткивног фактора (TF), дисфункција физиолошких антикоагулантних механизма и оштећено уклањање фибрина услед депресије фибринолитичког система (64).



СЛИКА 11 – Прокоагулантни механизми у сепси

Активација коагулације у сепси је један од главних механизма у развоју дисфункције органа. Она се примарно покреће преко ткивног фактора (TF). Он се експримира на површини моноклеарних и ендотелијалних ћелија, у одговору на бактерије, РAMPs или цитокине (TNF). TF активира фактор VII, затим комплекс TF/fVIIa активира фактор X и на крају, активирани фактор Xa доводи до конверзије протромбина у тромбин. Контрола прокоагулатних механизма се остварује на три начина: антитромбин (инхибитор тромбина и фактора Xa), инхибитор ткивног фактора- TFPI (инхибира комплекс TF/VIIa) и активирани протеин Ц (енгл. Activated protein C- APC). Активирани протеин Ц је значајни антикоагуланти менанизам, који се остварује преко активације фактора V и VIII, и настаје када се тромбин веже за тромбомодулин на ћелијама васкуларног ендотела. Функција овог протеина је оштећена на неколико начина у сепси. Рецептори за активирани протеина је оштећена на неколико начина у сепси. Рецептори за активирани протеина је оштећена на неколико начина у сепси. Рецептори за активирани протеина је оштећена на неколико начина у сепси. Рецептори за активирани протеина је оштећена на неколико начина у сепси. Рецептори за активирани протеина је оштећена на неколико начина у сепси. Рецептори за активирани протеина је оштећена на неколико начина у сепси.

дозама тромбина. Велике дозе тромбина доводе до оштећења ендотелних ћелија. Експерименталне и студије су показале, да ендогена примена активираниог протеина Ц, има антикоагулантне, антиинфламаторне и протективне ефекте у моделу сепсе (65,66).

Многобројне експерименталне студије су показале да сепса изазива значајне промене у микроциркулацији. Сепса доводи до редукције густине капилара и повећава хетерогеност перфузије, са присуством капилара без протока или са интермитентним протоком. Ово патолошко стање доводи до повећања дифузионе дистанце за кисеоник и до поремећене оксигенације ћелија. Ове промене чине основу оштећења ћелија и развоја дисфункције органа. Такође, у развоју ове дисфункције важне су и промене ћелијског метаболизма, нарочито дисфункција митохондрија.

Дисфункција ћелија ендотела је значајна у развоју промена у микроциркулацији. Битна је улога неколико патофизиолошких механизма: промена комуникацијских сигнала између ћелија, оштећење функције гликокаликса, активација коагулације и промене на циркулишућим ћелијама (леукоцити, еритроцити) (67).

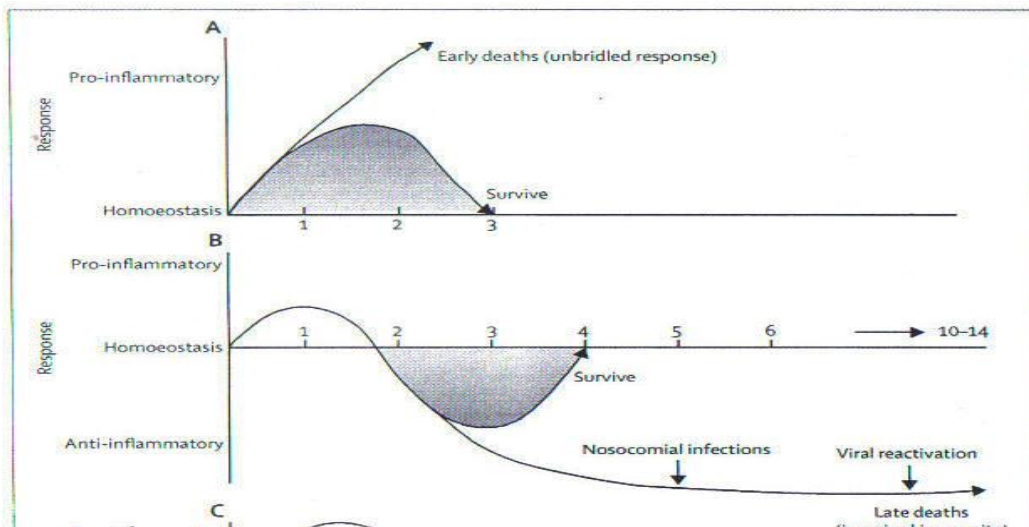
Дисфункција органа може настати и без значајних промена у макроциркулацији. Такође, уочена је очувана хистолошка грађа у многим органима и ткивима који су захваћени сепсом. Иако се у овим органима могу видети знаци инфламације (миграција инфламаторних ћелија), повећана количина течности у интерстицијуму (капиларни лик) и оштећење епитела, релативно је мали број умрлих ћелија (апоптоза или некроза). Овај број је диспропорционално мали у односу на тешку клиничку слику и биохемијске промене које прате оштећење органа. Све ово указује на функционално оштећење ћелија односно митохондрија, као главног апарата за продукцију енергије. Да би преживеле, ћелије смањују своју метаболичку активност и улазе у стање „хибернације“. Код пацијената који преживе, показан је брз опоравак функције ћелија (68).

3.2. СЕПСА И ТРАУМА КАО ИМУНОСУПРЕСИВНЕ БОЛЕСТИ

Традиционално, одговор имунског система домаћина на инфекцију и сепсу, одвија се у две фазе: иницијална хиперинфламаторна фаза и продужена имуносупресивна фаза. Данас је познато, да се оба одговора, и про- инфламаторни и анти- инфламаторни, могу одвијати рано и истовремено у сепси (69). Такође, сматра се да је иницијални одговор, код претходно здравих пацијената, ипак про-инфламаторни, и да се карактерише шоком, грозницом и хиперметаболизмом. Степен овог одговора зависи од бројних фактора: коморбидитет, нутрициони статус и број и вирулентност микроорганизама. Смрт у раној фази сепсе настаје због кардиоваскуларног колапса, метаболичких поремећаја или органске дисфункције.

Код старијих пацијената, са оштећењем имунског одговора, може изостати хиперинфламаторна фаза, те се брзо развија анти-инфламаторно стање. Ови пацијенти су склони развоју нозокомијалних инфекција или реактивирању вирусних инфекција. Смрт у овој фази настаје због органске дисфункције.

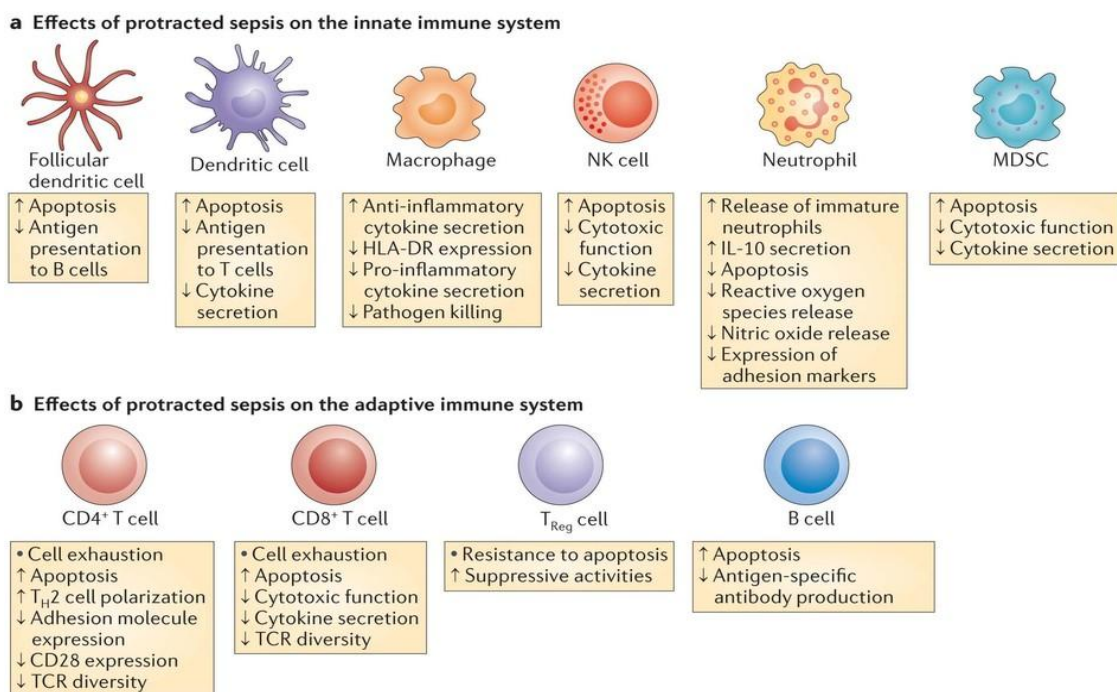
Глобално, овај одговор може бити балансиран (елиминација патогена, опоравак ткива) или небалансиран (хиперметаболизам, оштећење ткива, имунска супресија) (70).



СЛИКА 12 – Потенцијални инфламаторни одговор у сепси

Већина аутора сматра да пацијенти са сепсом имају изражену имуносупресију и да ови пацијенти умиру услед нерешених примарних инфекција или услед развоја нових болничких, секундарних инфекција, често са опортунистичким патогенима. Пост мортем студије су показале, смањену продукцију и про- и анти- инфламаторних цитокина, повећану експресију инхибиторних рецептора, експанзију регулаторних Т-лимфоцита (Tregs) и мијелоидних супресорских ћелија (MDSC) као и смањену експресију CD28 и HLA-DR активационог пута. У основи ове имуносупресије, смањен је број имунских ћелија услед апоптозе, пре свега Т-лимфоцита (CD4⁺ и CD8⁺ лимфоцити) и дендритских ћелија. Апоптоза макрофага и неутрофила није толико изражена. Такође, смањен је и број Б- лимфоцита са антиген специфичним продукујућим антителима. Повећан је број ћелија са имуносупресивним дејством, као што су Т-регулаторни лимфоцити (Tregs) и мијелоидне супресорне ћелије (MDSC). Сматра се да је оштећена функција Т- лимфоцита изазваном механизмом исцрпљености ових ћелија (T cell exhaustion) услед продужене инфекције, високог нивоа антигена као и продукције про- и анти- инфламаторних цитокина (71).

И остале имунске ћелије показују оштећену функцију (неутрофили, моноцити) у ефикасној одбрани од патогена. За разлику од лимфоцита, неутрофили имају одложену апоптозу и продужени животни век, али им је јако оштећена одбрамбена функција (смањена продукција ROS и NO као и накупљање у ткивима). Такође, неутрофили продукују велику количину имуносупресивног цитокина IL-10. Моноцити/макрофаге показују смањену експресију HLA-DR као и смањени капацитет продукције про- инфламаторних цитокина (TNF, IL1- α , IL-6, IL-12) у одговору на ендотоксин и друге TLR агонисте, што је у основи феномена „толеранције на ендотоксин“. Са друге стране, повећана је продукција цитокина са анти- инфламаторним дејством (IL-1RA, IL-10), што се објашњава концептом „моноцитног репрограмирања“ односно секрецијом потпуно новог сета цитокина са другачијим дејством (72,73)



Nature Reviews | Immunology

СЛИКА 13 – Ефекти сепсе на функцију ћелија урођене и стечене имуности

Такође, и нервни механизми могу инхибирати инфламацију (тзв. неуроинфламаторни рефлекс) (74). Наиме, сигнали из продужене мождине, преко вагусног нерва, могу активирати спленични нерв (целијачни плексус), што доводи до ослобађања норадреналина у слезини и ацетилхолина из CD4⁺ Т ћелија. Ослобођени ацетилхолин се веже за $\alpha 7$ холинергички рецептор на макрофагама и врше супресију ослобађања про- инфламаторних цитокина (75).

Релативно нова, теорија кинеских аутора (76) наглашава значај продуженог про- инфламаторног одговара, који је одговоран за развој дисфункције органа и смртност код пацијената са сепсом. Наиме, студије генске експресије циркулишућих леукоцита пацијената са траумом и опекотинама, показале су брзу и континуирану повећану експресију гена који регулишу урођени имунски систем. Истовремено, постоји смањена експресија гена који регулишу стечени имунски систем. Ови аутори наглашавају значај протрахованог, несмањеног урођеног

имунског одговора које доводи до дисфункције органа. Пацијенти који умиру имају дуже трајање и већи степен дисфункције органа него они који преживе. Инламација је значајна, иако постоји супресија стеченог имунског система и утиче на морталитет и морбидитет ових пацијената. Треба нагласити да се ова „генска олуја“ јавља само у стерилној инфламацији (траума, опекотине) и то код младих особа. Одговор домаћина може бити потпуно другачији код старијих, септичних пацијената са локализованом инфекцијом (перитонитис) која има системске манифестације након неколико дана од инвазије патогена и почетка болести.

Значајна имуносупресија се може развити и након тешке трауме. Дисбаланс између про- и анти- инфламаторног одговора удружен је са појавом нозокомијалних инфекција код пацијената са траумом. Прејаки анти-инфламаторни одговор доводи до посттрауматске имуносупресије и развоја секундарних инфекција. Ова имуносупресију карактеришу: 1. смањен капацитет ћелија урођене имуности да продукују про- инфламаторне цитокине 2. смањена способност моноцита/макрофага да презентују антигене, због смањене мембранске експресије HLA-DR 3. повећана концентрације анти- инфламаторних цитокина, као што је IL-10 (77).

Међу пацијентима са траумом, пацијенти са тешком траумом мозга, су посебно склони развоју секундарних инфекција. На значајну дисфункцију имунског система могу утицати и промене аутономног нервног система. Ови пацијенти развијају тзв. „катехолинергичку олују“ са значајном деактивацијом моноцита/макрофага (смањена експресија HLA-DR) преко ослобађања анти-инфламаторног цитокина IL- 10. Такође, и ослобођени неуромедијатори могу утицати на активност моноцита/макрофага. И на крају, треба нагласити да ови пацијенти у терапији могу добити лекове (барбитурати, мидазолам) који утичу на имунску функцију (78).

4. ГЕНИ И ГЕНСКИ ПОЛИМОРФИЗМИ

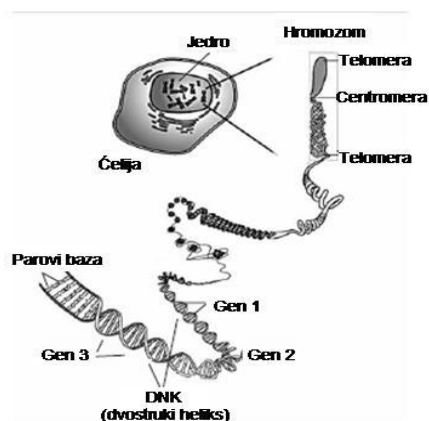
Репликација наследног материјала представља један од основних предуслова за одигравање нормалне репродукције живих система.

Хроматин је динамична структура једра коју формирају молекула ДНК, мања количина молекула РНК, хистонски и нехистонски протеини. У интерфазном једру, уочавају се две форме хроматина: инактивна- хетерохроматин и активна- еухроматин. Еухроматин се повезује са транскрипционо активним деловима молекула ДНК. Формирање комплекса између ДНК и протеина има улогу у „паковању“ великог молекула ДНК у једро и у заштити молекула ДНК од дејства нуклеаза.

Главну протеинску компоненту хроматина чине хистони, базни протеини, богати аргинином и лизином. Постоје 5 типова хистона, четири нуклеозомска (H2A, H2B, H3, H4) и хистон H1. Нуклеозомски хистони су мали протеини (102-135 амк), и формирају нуклеозоме путем својих домена за увијање хистона (енг. histone- fold domain), који се састоји од 3 α - хеликса, који су одвојени са две неструктурисане аминокиселинске петље. Хистони су поликатјони, и позитивно наелектрисање хистона је битно за интеракцију ових молекула са негативно наелектрисаним молекулом ДНК.

Нуклеозоми су перласте структуре које се састоје од октамера хистона, око којег се обавија ланац ДНК. Хистонски октамер се састоји од по два молекула сва четири нуклеозомска хистона. Око октамера хистона 1,65 пута се обавија сегмент ланца ДНК дужине 147 bp. Нуклеозоми се дефинишу и као примарна хроматинска структура. Дијаметар хроматинске нити која настаје формирањем нуклеозома износи 10 nm. Сегмент молекула ДНК између два нуклеозома назива се везана (енг. linker) ДНК, специфична је за врсту, дужине од 20 до 65 bp. Хистон H1 остварује интеракцију како са везаном ДНК, тако и са ДНК која обавија хистонски октамер (79).

Ген је регион ДНК који носи информацију за стварање РНК процесом транскрипције, која се процесом транслације преводи у полипетдини ланац. Ген такође садржи и регионе ДНК који регулишу производњу кодираног (шифрованог) производа. У структури гена, транскрибовани део садржи кодирајуће секвенце које одређују редослед аминокиселина у полипептидном ланцу.



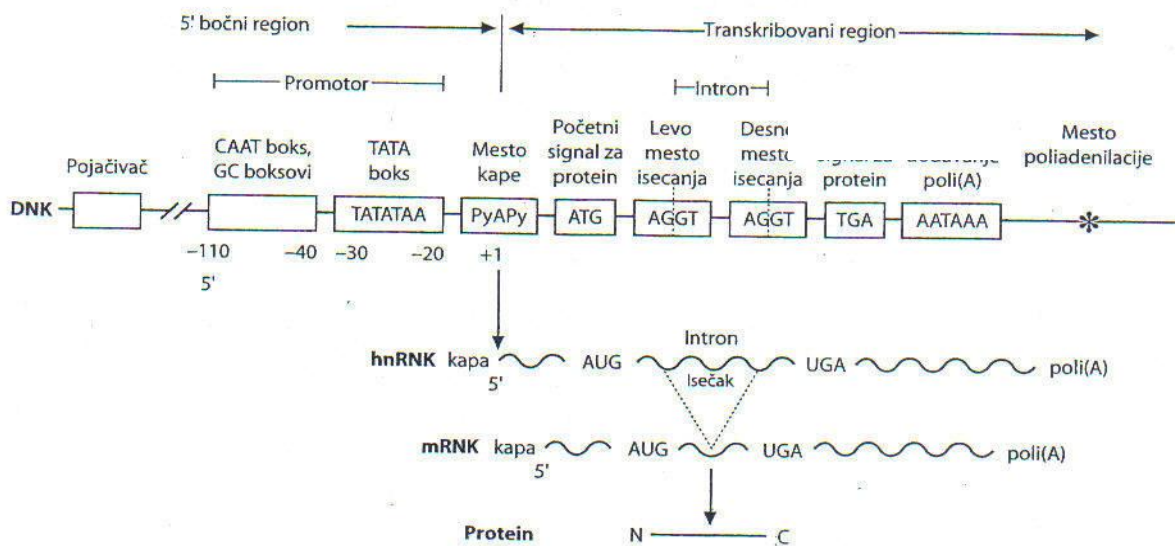
СЛИКА 15 – Ћелија, једро, хромозом, двоструки хеликс ДНК

4.1. СЕКВЕНЦЕ ГЕНА

Транслација (биосинтеза протеина) представља најкомплекснији биохемијски процес у свим живим системима. Генетичка информација преводи се током транслације са молекула информационе РНК у секвенцу аминокиселина одговарајућег протеина. Информациона РНК се читава у смеру 5' ка 3', у групама од по три базе названим кодони. Код еукариота, готова сва иРНК после транскрипције (примарни транскрипт) подлеже обради, исецању интрона, додавању 5'метил- гуанозинске капе и поли-А репа, те постаје зрела иРНК пре изласка у цитоцол. Обрада се обавља примарно у једру, али и током транспорта у

цитоплазму. Око 3% хетерогене нуклеарне РНК, низом модификација се преводи у информациону РНК.

Детаљни приказ гена дат је на СЛИЦИ 11. Ген се састоји од промотора и транскрибованог региона. Транскрибовани региони се састоје од интрона, који не носе протеин- кодирајућу секвенцу за протеине, и егзона, који су носиоци информације за синтезу протеина. База која у кодирајућем ланцу гена служи као почетна тачка оболежена је бројем +1. Тај нуклеотид коренсподира са првим нуклеотидом у РНК на 5' крају транскрипта. Следећи нуклеотиди у транскрибованом региону гена нумерисани су са +2, +3 и тако даље у смеру 3' гена. Нетранскрибоване секвенце лево од почетне тачке познате су као 5' узводни нетранслатирајући региони (енгл. 5' untranslated region- 5' UTR) гена, а нумерисане су са -1, -2 итд, почевши од првог нуклеотида, лево од почетне тачке (+1), с десна на лево. За секвенце које се налазе лево од почетне тачке каже се да су узводне, а за секвенце које се простиру удесно каже се да су низводне.



СЛИКА 16 – Приказ еукариотског гена и процеса синтезе информационе РНК и протеина

Први облик који се синтетише је хетерогена нуклеарна РНК (hnRNK), у којој се налазе и интронске и егзонске секвенце. Затим се структура hnRNK мења, додаје се капа на 5' крају (место капе), а на 3' крају се додаје поли(А) реп. Капа затвара 5' крај примарног транскрипта и смањује брзину његове деградације. Такође, она служи као место препознавања за везивање зреле информационе РНК за рибозом при иницијацији синтезе протеина. Поли(А) реп је место на коме се везује протеин, који штити иРНК од деградације. Интрони се одстрањују, а егзони се спајају (енгл. splicing), тако да настаје зрела информациона РНК (mRNK), која напушта једро и у цитоплазми управља процесом синтезе протеина (80).

4.2. ПОЛИМОРФИЗАМ ГЕНА

Под појмом полиморфизма у геному човека подразумевају се варијације у наследној основи које се нормално срећу у хуманим популацијама. Да би се одређена варијација прогласила полиморфизмом неопходно је да се одређена алелна форма јавља са фреквенцијом већом од 1%, одн. да је учесталост хетерозигота већа од 2%. Алелне форме са мањом учесталашћу представљају ретке варијанте.

Варијабилност наследне основе се означава и као нуклеотидна разноликост која се дефинише као однос броја различих база према укупном броју базних парова два генома која се пореде. Параметром хетерозиготности (p_i) може се одредити вероватноћа којом ће се нуклеотид на одређеној позицији наћи у хетерозиготној форми, поређењем два хромозома одабрана по принципу случајности у одредјеној популацији. Процењено је да је хетерозиготност у хуманом геному око 7.51×10^4 што одговара појави 7.51 различитости база на 10 кВ. Варијабилност за аутозоми се креће од 5.19-8.79 различитости база на 10 кВ. Хетерозиготност за полне хромозоме је знатно нижег степена, за X хромозом око 4.69 различитости база по 10 кВ и око 1.51 по 10 кВ за Y хромозом, у нерекомбинујућим регионима (81).

4.3. ТИПОВИ ПОЛИМОРФИЗМА

Полиморфизам може бити узрокован генетским променама, које се крећу у распону од замене само једне базе, до варијација у сегменту од чак неколико стотина база. Постоје три основна типа ДНК полиморфизма: полиморфизам појединачних нуклеотида (SNP, single nucleotide polymorphism), полиморфизам броја узастопних поновака (VNTR, various number of tandem repeats или SNTR, small number of tandem repeats) и делеционо/инсерциони полиморфизам.

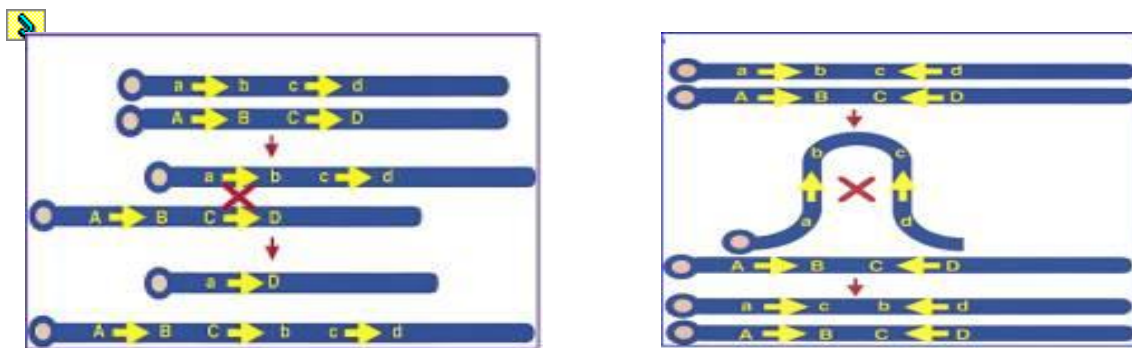
Полиморфизам појединачних нуклеотида (SNP) најчешћи је извор генетичких варијација у хуманом геному и обухвата око 90% свих ДНК полиморфизама. Настаје услед супституције једне нуклеотидне базе другом. Транзиције су супституције базом истог типа (пуринске базе: A>G или G>A, пиримидинске базе: C >T или T>Ц), док су трансверзије замене базом другог типа (пурин у пиримидин или обрнуто) (82).

Најчешћи облик транзиције настаје услед модификације ДНК метилацијом цитозина, нарочито када је смештен на 5` крају непосредно уз гуанин (динуклеотид 5`-CG-3`). Деаминацијом 5-метилцитозина у тимидин долази до супституције у CG у TG. Са повећањем учесталости CG дублета, повећава се и број врућих места („hotspot”) за мутације у хуманом геному и тиме, нуклеотидна разноврсност.

Нуклеотидне супституције у протеин кодирајућим регионима, могу се такође класификовати и као синонимне и несинонимне, према њиховом утицају на крајњи протеински производ. Супституција је синонимна када мутацијом нуклеотидне базе не долази до замене аминокиселине (“silent” мутација), а несинонимна када услед промене у кодирајућем делу једна аминокиселина бива замењена другом („missense” мутација) или настане стоп-кодон и превремен прекид транскрипције (“nonsense” мутација).

Остали типови генетичког полиморфизма резултат су мутација типа инсерција и делеција дела ДНК, укључујући и микросателитне понављајуће секвенце (VNTR, variable number of tandem repeated DNA sequences). Ове мутације

могу бити типа делеција база (када је број захваћених база мањи од три) са променом оквира читања („frameshift“ мутације), делеција кодона и инсерција (када је број захваћених база већи од три), делеција и дупликација гена услед неравномерног crossing over-а између хомологих хромозома као и инсерције поновака. На схеми испод приказана је интерхромозомска рекомбинација са делецијом једног и дупликацијом другог хромозома и инверзија са рекомбинованим инвертујућим сегментима присутних унутар једног хромозома.



СЛИКА 17 - Структурне аберације као узрок полиморфизма

Важно је истаћи да мутације не треба повезивати искључиво са настанком болести. Мутације такође доводе до формирања нових алелних облика гена, који су извор нормалне генетичке и фенотипске варијабилности. Сматра се да код човека сваки зигот има просечно 100 база различитих у односу на наследну основу родитеља. Ове промене се не морају испољити у фенотипу, јер се најчешће налазе у некодирајућим регионима.

Под појмом генског или ДНК полиморфизма подразумевају се разлике у наследном материјалу у општој популацији, тј. у популацији здравих људи. Процењује се да је у геному човека сваки 1000. нуклеотид полиморфан, односно да се разликује између две особе или између два локуса. У оквиру гена за протеине, разлике се срећу код једног од 2500 нуклеотида. У односу на то, сматра се да је сваки човек хетерозигот у око 20% својих генских локуса. Најполиморфнији генски

локус у геному човека је HLA локус. Крвне групе АБО система су илустративан пример генетичког-алелског и фенотипског полиморфизма широко присутног у људским популацијама.

ДНК полиморфизми су варијације наследне основе које се срећу у популацији здравих људи. Данас се широко проучава улога ДНК полиморфизама као маркера евентуале генске предиспозиције за појаву и прогресију одређених болести. То се пре свега односи на полигенске поремећаје, који настају у садејству између већег броја гена и фактора средине. У студијама асоцијације се испитује повезаност одређених генских варијанти тј. генских полиморфизама, са појавом болести, и упоређује са подацима у здравој популацији.

4.4. ГЕНСКЕ ВАРИЈАЦИЈЕ И ИНФЛАМАТОРНИ ОДГОВОР У СЕПСИ

Једну од првих, кључних студија која је указивала на то да постоји веза између генетских варијација и сепсе спровео је Sorensen et al. (83). Он је показао да се ризик од смрти од инфекције повећава 5 пута ако је биолошки родитељ умро од исте инфекције. Неколико година касније Westendorp је у свом истраживању показао да постоји наследни повећан ризик од смртог исхода код менингококцемије, а који се огледа у функционалним генским полиморфизмима који су повезани са или смањеном продукцијом TNF-а или повећаном продукцијом IL-10 (84). У његовој студији, највећи ризик од смртог исхода био је у фамилијама које су имале оба генска полиморфизма.

Дакле, постало је потпуно прихватљиво становиште да генске варијације могу играти важну улогу у детерминисању која ће особа развити инфекцију и/или колико ће она бити тешка. Ако гени играју кључну улогу у ризику од смртог исхода током инфекције, онда је врло вероватно да је та веза комплексна, а не једнозначна као на пример карактеристике смањеног лучења TNF-а или повећаног лучења IL-10 које би директно биле повезане са лошим исходом. Мало је вероватно да би ове две карактеристике биле преношене са генерације на генерацију а да при

томе представљају значајну претњу преживљавању, много је вероватније да би нестале (85).

Различите студије су идентификовале полиморфизме унутар гена који утичу на продукцију медијатора важних за патофизиологију инфламације и сепсе. *In vitro* студије су показале да генски полиморфизми доводе до различитог нивоа експресије гена што резултује различитим нивоима синтезе и ослобађања цитокина. Међутим, клинички ефекат хиперсекреторних и хипосекреторних тенденција може да се мења у различитим клиничким стањима. Стога су клиничке студије које корелирају фреквенце полиморфизама генотипа са клинички важним исходом неопходне да би се интерпретирао *in vivo* утицај ових генских разлика.

Проучавање генских варијација може помоћи у лечењу сепсе на различите начине. Као маркери, генотипови би могли помоћи при доношењу клиничких одлука, и коначно, могли би бити корисни у идентификацији адекватних кандидата за фенотипски и, можда, генотипски специфичну терапијску интервенцију. Један од начина разликовања медијатора и маркера је коришћење модерне верзије Коховог постулата: медијатор је детектабилан у свим случајевима обољења; примена медијатора репродукује карактеристике обољења; и фармаколошка блокада медијатора превенира развој обољења. TNF, на пример, испуњава ову тријадну критеријума на анималним моделима ендотоксемије. Међутим, TNF није детектабилан, бар не у плазми, код свих пацијената са сепсом и третмана анти-TNF антителима не обезбеђује конзистентну протекцију, односно преживљавање код анималног модела сепсе. Данас се зна да је други протеин, high mobility group box-1 (HMGB1), присутан у циркулацији животиња и пацијената са сепсом. Примена егзогеног HMGB1 код животиња индукује леталитет и неке карактеристике септичког шока, а антитела на HMGB1 побољшавају преживљавање код анималног модела сепсе. Стога се, на основу ових преклиничких и прелиминарних клиничких испитивања, може сматрати да HMGB1 испуњава све критеријуме кључног медијатора у патофизиологији сепсе.

Генски полиморфизми не могу функционисати као маркери активности обољења, јер они егзистирају независно од обољења, али могу бити повезани са ризиком од развијања сепсе или настанка тешких последица чак иако се не може установити каузални однос. На овај начин, гени такође, могу бити маркери ризика.

Иако се пацијенти роде са себи специфичним геномом, време селекције пацијената је веома важно за генске студије асоцијације. Селекција пацијената прерано у току процеса болести (на пример сви пацијенти са SIRS-ом, пре него пацијенти са тешком сепсом) вероватно ће у истраживање увести пацијенте код којих је мања вероватноћа настанка болести. Тако се изврши дилуција пула пацијената са потенцијално лошим исходом и тако се смањује моћ истраживања да детектује разлике у фреквенцама алела или генотипова. Ако се селекција пацијената изврши прекасно, може доћи до тога да пацијенти умру од обољења пре него што се изврше анализе, што опет доводи до дилуције пула пацијената са лошим исходом па тако редукују прогностичку моћ студије.

Када се проучава однос између добро очуваних полиморфизама (на пример TNF-308 G/A) и честих стања (на пример тешка сепса), мора се размишљати о томе да ли одређени полиморфизми имају двоструку улогу (СЛИКА 18). На пример, TNF-308 A алел, који индукује повећану синтезу и ослобађање TNF-а, могао би бити повезан са протекцијом од инфекције. Али, истовремено, код пацијената са овим полиморфизмом код којих се ипак развије инфекција, повећана синтеза и ослобађање TNF-а може погоршати исход. На овај начин, одређени полиморфизми могу имати лоше последице у одређеним ситуацијама а корисне ефекте у другим околностима. Другим речима, ако је, на пример, генотип који резултује повећаном секрецијом TNF-а повезан са протекцијом од леталних инфекција (менингококцемија) то би било наследно преношење предности. Ако, са друге стране иста карактеристика (повећана секреција TNF-а) повећава ризик од оштећења органа код не-леталних инфекција (развијање тешке сепсе) то би била негативна наслеђена карактеристика.

Težina infekcije	Inflamatorni odgovor			
	Rani			Kasni
Letalna	↑	↑	↕	↓
Umerena	↑	↕	↓	↓
Blaga	↕	↓	↓	↓

↑	Fenotip sa intenzivnim inflamatornim odgovorom
↕	Fenotip sa umerenim inflamatornim odgovorom
↓	Fenotip sa slabim inflamatornim odgovorom

СЛИКА 18 - Однос различитих фенотипова, инфламаторног одговора и тежине инфекције

Конкретно, ако је особа програмирана да агресивно одговори на рану инфекцију (појачано лучење TNF-a) то би јој могло смањити шансе да развије тешку инфекцију зато што се бактерије униште довољно рано. Међутим, ако се код те исте особе ипак развије инфекција, агресивни имунски систем би довео до великог оштећења органа и њихове последичне дисфункције. Супротно стање (ниска продукција TNF-a) могла би особу заштитити од претераног имунског одговора на не-леталне инфекције, али би се повећао ризик те особе од развоја леталних секундарних инфекција. Ако би се ова два ризика избалансирала у датој популацији тако да је једнака вероватноћа да ће они који производе више TNF-a умрети од умерених инфекција с једне стране, као да ће они који производе мало TNF-a умрети од тешких инфекција с друге стране, то значи да ниједна од ове две

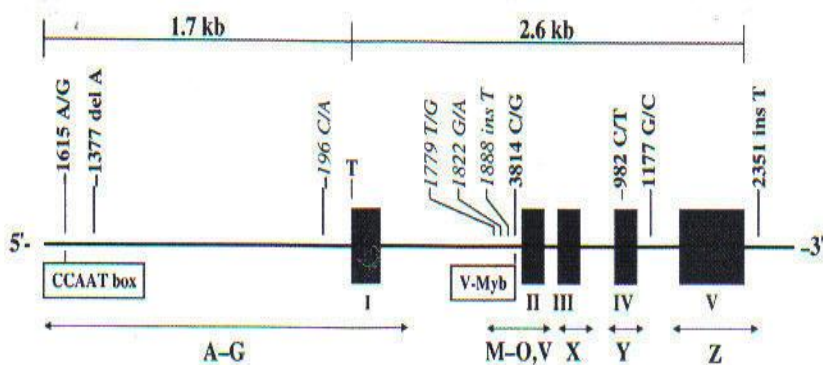
карактеристике неби била супериорна. Према томе, одабир правог времена увођења пацијената у истраживања улоге генских полиморфизама у сепси, постаје озбиљно питање. Подгрупе пацијената са различитим формама сепсе могу имати различите исходе у зависности од етиологије сепсе у тој групи упркос сличном генотипу (86).

Баланс између про- и анти-инфламаторних цитокина је једна од главних детерминанти тока и исхода сепсе и трауме. Због тога је неопходно проучавати што више гена који кодирају различите компоненте имунског одговора.

4.5. ГЕН И ГЕНСКИ ПОЛИМОРФИЗАМ ЗА ЦИТОКИН HMGB1

Цитокин HMGB1 се сматра типичним проинфламаторним цитокином који по својим ефектима адекватно репрезентује дејства про- инфламаторних цитокина.

Ген за цитокин HMGB1 је лоциран на дугом краку хромозома 13, са транскрипционим регионом који садржи око 6000 базних парова (bp). Састоји се од промотора, величине 1700 bp и 5 егзона, укупне дужине од 2600 bp.



СЛИКА 19 – Шематски приказ HMGB1 генског локуса

Kornbilt et al. су спровели студију утврђивања генског полиморфизма за протеин HMGB1 у популацији здравих добровољних даваоца крви (103 испитаника) у Данској. Запажене су 10 генетске варијације, од којих 6 су имале

фреквенцију већу од 1%, те су означене као полиморфизми. Остале 4 генетске варијације, идентификоване су само једном код 4 различита испитаника, те су означене као мутације. Ови полиморфизми и мутације могу бити дистрибуирани у целој генској секвенци, мада се примарно налазе у некодирајућим регионима (87).

Полиморфизам на позицији -1615 A/G (rs1412125) налази се у делу промотора, који се назива ССААТ box. Пошто је јако удаљен од почетног места транскрипције, тешко је да може имати неки промотивни утицај. Међутим, ова локација је потенцијално место везивања за хумани Cut homeodomain protein, који је познат као репресор транскрипције (88).

Полиморфизам на позицији 3814 C/G (rs2249825) односно G алел је везујуће место за v-Myb, са консенсус мотивом PyAAC(G/T)G за комплементарни ланац. v-Myb је форма прото- онкогена c-Myb, који је значајан као cis- и trans- активирајући фактор, који је неопходан за правилан развој многих хематопоеетских ћелијских линија. Потенцијално место везивања v-Myb може бити снажни појачивач HMGB1 експресије (89).

Полиморфизам на позицији 982 C/T (rs1060348) у егзону 4, означен је нема базна супституција (silent), без утицаја на рам читања (reading frame) или низ аминокиселина у крајњем протеину.

До сада су објављене две велике студије о повезаности генског полиморфизма за HMGB1 и исхода болести код пацијената са системским инфламаторним одговором и траумом.

Kornbilt et al. (90) су урадили прво истраживање о повезаности полиморфизма HMGB1 са исходом болести код пацијената са системским инфламаторним одговором (SIRS). Групу испитаника су чинила 239 пацијената са SIRS-ом, од којих су њих 63. имали знаке SIRS-а без инфекције, док је 176 пацијената имало сепсу различите тежине.

Zeng et al. (91) су урадили истраживање о повезаности три најчешћа генска полиморфизма за HMGB1 са ризиком од развоја сепсе и мултипле органске дисфункције код пацијената са тешком траумом у северно-западном делу Кине.

Такође, објављене су и две студије о полиморфизму HMGB1 које нису директно везане за сепсу и трауму, али су везане за инфекцију и то код пацијената са хроничном хепатитис Б вирусном инфекцијом (92) и код пацијената са алогеном трансплантацијом костне сржи (93).

Недавно су објављене и две студије полиморфизма гена за протеин HMGB1, прва о повезаности овог полиморфизма и хипертензије (94), и друга о повезаности овог полиморфизма и развоја оралног сквамозног ћелијског карцинома и оралног лихен плануса (95).

5. ПРЕДМЕТ СТУДИЈЕ

У студији ће се утврдити учесталост полиморфизма гена за цитокин HMGB1 и врсте инсулта који активира имунски одговор код критично оболелих пацијената са синдромом системског инфламаторног одговора инфективне или неинфективне етиологије. Анализираће се њихова повезаност са врстом проузроковача инфекције (Грам позитивне, Грам негативне, мешовите бактерије и стерилне хемокултуре) као и са исходом (преживео/умро). Такође, пратиће се лабораторијске вредности интерлеукина (IL) - 6, Ц-реактивног протеина (CRP) и експресије CD64 рецептора на неутрофилима, и њихова повезаност са предикцијом mortalитета код пацијената са сепсом и траумом.

6. ЦИЉЕВИ И ХИПОТЕЗЕ СТУДИЈЕ

А- Главни циљеви ове студије су:

1. Утврђивање учесталости полиморфизма гена за HMGB1 на позицијама rs2249825 [Ц/Г], rs4540927 [Г/А], rs19299606 [Ц/Т], rs17074615 [А/Ц], rs1412125 [Т/Ц], rs1060348 [Ц/Т], rs1045411 [Г/А], rs3742305 [Г/Ц] код критично оболелих пацијената са SIRS-ом
2. Утврђивање повезаности појединих алелских облика гена за HMGB1 са исходом болести
3. Утврђивање повезаности појединих алелских облика гена за HMGB1 са бактеријским узрочником инфекције
4. Предикција mortalитета дневним праћењем вредности интерлеукина (IL) - 6, Ц-реактивног протеина (CRP) и експресије CD64 рецептора на неутрофилима код пацијената са сепсом и траумом

Б- Радне хипотезе испитивања:

1. Постоји повезаност између учесталости алела гена за HMGB1 и врсте инсульта који је довео до SIRS-а код критично оболелих пацијената са бактеријским узрочником инфекције
2. Постоји повезаност између учесталости алела гена за HMGB1 и врсте инсульта који је довео до SIRS-а код критично оболелих пацијената са исходом
3. Постоји предикција морталитета дневним праћењем вредности интерлеукина (IL) - 6, Ц-реактивног протеина (CRP) и експресије CD64 рецептора на неутрофилима, код пацијената са сепсом и траумом

7. МАТЕРИЈАЛ И МЕТОД

А. ВРСТА СТУДИЈЕ

Клиничка опсервациона проспективна студија пресека.

Извођење ове студије је одобрено одлуком Етичког одбора ВМА од 21.06.2012.

Б. ПОПУЛАЦИЈА КОЈА СЕ ИСТРАЖУЈЕ

У студију је укључено 119 критично оболелих хирушких пацијента са SIRS-ом различите етиологије (сепса, траума) лечених у Јединици хирушке интензивне терапије, Клинике за анестезиологију и интензивну терапију ВМА Београд. Било је 75 (63%) мушкараца и 44 (37%) жена, са просечном старошћу од 56,53 година.

Пацијенти су били подељени у две групе: група СЕПСА и група ТРАУМА.

Групу СЕПСА чинило је 79 пацијента који испуњавају критеријуме за тешку сепсу, са доказаном интраабдоминалном инфекцијом – перитонитис, укупно 62 пацијента, (подгрупа перитонитис) или са тешким акутним панкреатитисом, укупно 17 пацијената (подгрупа панкреатитис).

Групу ТРАУМА чинило је 40 пацијента са тешком траумом, према критеријуму за дефиницију тешке трауме. Према развоју сепсе, испитаници су подељени у две подгрупе: тешка траума, укупно 21 пацијент (подгрупа траума) и тешка траума са развојем секундарне сепсе (подгрупа траума и сепса).

В. УЗОРКОВАЊЕ

Испитаници су издвојени методом пригодног узорковања од популације критично оболелих пацијената са знацима SIRS-а, током лечења у Јединици хирушке интензивне терапије ВМА Београд, и по добијању писменог пристанка за укључење у студију од стране пацијента/члана породице.

Општи критеријуми за укључивање пацијената у студију: старост преко 18 година, испуњени клинички и лабораторијски критеријуми за SIRS, пријем у Јединицу хирушке интензивне терапије.

Општи критеријуми за искључивање из студије: тешка леукоопенија ($< 1,000 \text{ mm}^3$), раније тешке болести јетре и бубрега, хематолошке или имунолошке болести

По укључивању у студију, урађено је скоровање пацијената (APACHE 2, SOFA скор и ISS скор за групу ТРАУМА) и узет је узорак крви за генске анализе, као и узорци крви за хемокултуру и биохемијске лабораторијске анализе. За одређивање серумског нивоа биомаркера сепсе (IL-6, CRP, CD64 expresion), узорци крви су узети првог, другог и трећег дана по укључивању у студију. Квантитативно мерење IL-6 и CRP је рађено из узорка серума, док је CD64 assay мерен из узорка пуне крви са антикоагулантом EDTA.

Регистровано је основно обољење које је довело до SIRS-а инфективне или неинфективне етиологије: сепса (перитонитис, панкреатитис) и тешка траума. Према томе, пацијенти су подељени у 2 групе: група СЕПСА (перитонитис, панкреатитис) и група ТРАУМА (траума са и без секундарне сепсе). Исход лечења пацијента (преживео/умро) је праћен до завршетка болничког лечења (хоспитални морталитет). Стопа хоспиталног морталитета је била 47,05% , од укупно 119 пацијената, који су укључени у студију, њих 56 је умрло.

Критеријуми за синдром системског инфламаторног одговор- SIRS из 1992. године, наведени су у ТАБЕЛИ 1 (14)

Критеријуми за сепсу из 2012. године, наведени су у ТАБЕЛИ 3 (15). Критеријуми обухватају документовану или суспектну инфекцију уз присуство неких од наведених параметра.

КРИТЕРИЈУМИ за тешку трауму – према Скору тежине повреда (eng. Injury severity score – ISS) Бејкера и сар (19).

Укупан број пацијената	119
Просечна старост (године)	56.53
Пол, број (%)	
мушки	75 (63,0 %)
женски	44 (37,0 %)
Разлог за пријем у ЈИТ (број, %)	
Тешка траума (ISS скор 27.2 ± 6.2)	40 (33.62 %)
Траума без сепсе	21 (17,65%)
Секундарна сепса након трауме	19 (16.0 %)
Тешка сепса (SOFA скор $7,86 \pm 2,47$) због	79 (66.38%)
перитонитиса	62 (52.1%)
панкреатитиса	17 (14.28 %)
Хемокултуре, (број, %)	
Грам-позитивне	16 (13.4%)
Грам-негативне	5 (4.20%)
Мешане	53 (44.5%)
Стерилне	45 (37,8%)
Хоспитални морталитет, (број, %)	56/119 (47.05%)

ТАБЕЛА 7 - Демографске карактеристике пацијената

ПОСТУПАК ГЕНОТИПИЗАЦИЈЕ

Изолација ДНК, провера чистоће и одређивање концентрације ДНК

Узрак крви за анализу узет је у првих 24 сата по укључивању пацијента у студију и после добијања писменог пристанка пацијента/члана породице. Узорци крви пацијената чувани су у епруветама са EDTA као антикоагулансом. Из узорака периферне крви пацијената са SIRS-ом изолована је геномска ДНК коришћењем кита за изолацију ДНК из крви Gene JET Genomic DNA Purification Kit (Fermentas, Germany), по упутствима произвођача. Квалитет полазног материјала је ограничавајући фактор за успешност генетских анализа, услед чега се мора проверити квалитет и концентрација изоловане геномске ДНК.

Квалитет геномске ДНК је провераван на 2% агарози бојеној етидијум-бромидом. ДНК је негативно наелектрисан молекул захваљујући остацима фосфорних група, а у пољу једносмерне струје ДНК нанесена на агарозни гел мигрира ка позитивно наелектрисаној електроди, аноди. Етидијум-бромид се као ДНК интеркалирајући агенс умеће у молекул ДНК, што омогућава визуелизацију одвијала трака ДНК која је мигрирала на гелу. Електрофореза се у 0.5 TBE пуферу при струји од 40 mA и напону од 80 V у трајању од 20 мин. Интактност и квалитет геномске ДНК је анализирана под UV светлошћу трансилуминатора (Pharmacia LKB, Sveden), где се очувана геномска ДНК уочава у виду једне јасне траке, док се деградирана ДНК може уочити присуством већег броја трака или у виду размаза (енгл. smear). Из свих узорака је изолована квалитетна геномска ДНК.

Концентрација и чистоћа ДНК у узорку је одређена мерењем апсорбанце на таласној дужини од 260 nm, коришћењем Гене Куант спектрофотометра (Pharmacia LKB, Sveden). Концентрација ДНК је рачуната коришћењем формуле:

$$c[\mu\text{g} / \mu\text{l}] = \frac{A_{260} \times R \times F \times OP}{1000}$$

где је:

A260 - апсорбанца узорка на 260 nm

R-разблажење (100 пута)

F- фактор конверзије за дволанчану ДНК (F=50)

OP- оптички пут светлости (дебљина зида кивете, 1 cm)

Чистоћа изоловане ДНК је процењена односом апсорбанци (R) мерених на 260 nm (на таласној дужини на којој геномска ДНК показује максималну апсорбанцу) и 280 nm (на којој апсорбују протеини). У свим узорцима, однос апсорбанци је био $R \geq 1.6$, што указује на висок степен чистоће изоловане ДНК, која није контаминирана протеинима.

Одређивање полиморфизама алелском дискриминацијом Real-Time PCR методом

Ланчана реакција полимеризације (енгл. Polymerase Chain Reaction, PCR) је метода којом се у *in vitro* условима било који фрагмент ДНК може амплификовати тј. копирати велики број пута, до неколико милијарди пута. Мастер мих је смеша у којој се одвија PCR реакција и садржи пуфер са јонима Mg^{+2} , кофакторима неопходним за активност полимеразе, затим еквимоларне концентрације дезоксирибонуклеотида, dNTPs (dATP, dGTP, dCTP, dTTP), градивних јединица будућег ланца ДНК, као и Taq полимеразу, термостабилну ДНК полимеразу која може да преживи високе температуре неопходне за денатурацију ДНК. Денатурацијом применом високе температуре ($95^{\circ}C$) се раздвајају 2 ланца изолованог дволанчаног молекула ДНК. Taq полимераза, као и остале ДНК полимеразе, не могу да започну синтезу комплементарног ланца без присуства прајмера, почетница. Прајмери представљају кратке једноланчане олигонуклеотидне секвенце (око 20 нуклеотида), синтетисане тако да буду комплементарне крајевима жељеног фрагмента који хоћемо да амплификујемо и који су међусобно супротно оријентисани. Прајмери, узводни (енгл. Forward, F) и

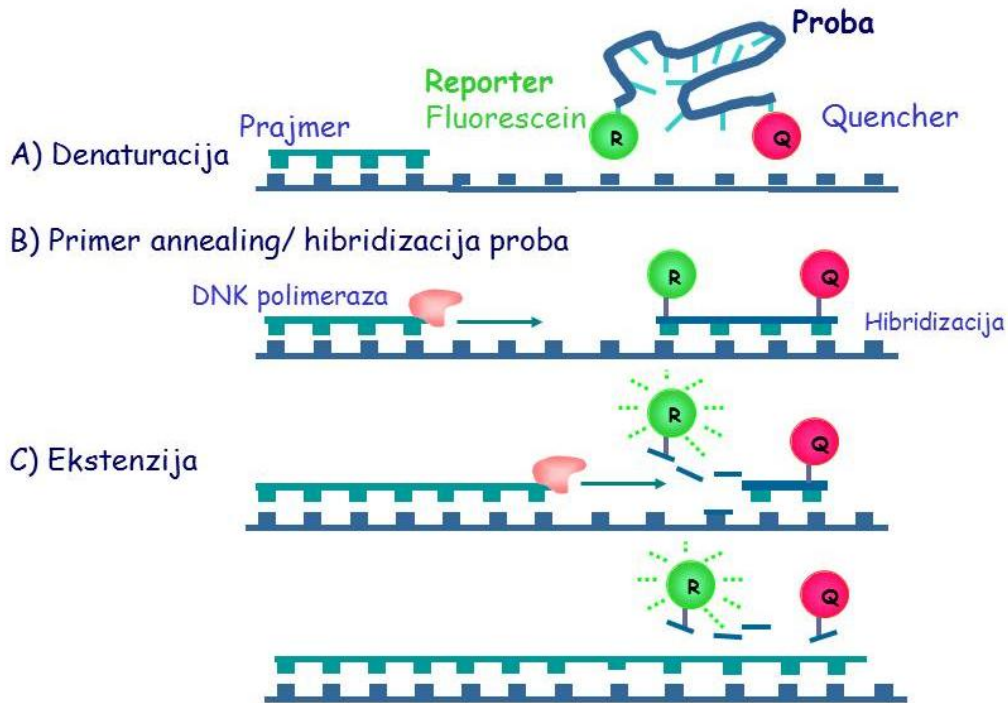
низводни (енгл. Reverse, R) прајмер, одређују и ограничавају коју секвенцу умножавамо кроз узастопно понављајуће циклусе репликације.

Ланчана реакција полимеразе у реалном времену (енгл. Real-Time Polymerase Chain Reaction, Real-Time PCR) је савремена метода која се заснива на класичној PCR методи и омогућава детекцију ДНК и квантификацију генске експресије на брз, специфичан, сензитиван и репродуцибилан начин. Као и код класичне PCR реакције и током амплификације PCR продуката Real-time PCR методом можемо разликовати 3 фазе: експоненцијалну фазу - током које се у сваком циклусу количина ДНК, односно број амплификата експоненцијално увећава; линеарну фазу – током које се амплификација успорава, троше се компоненте реакционе смеше; плато реакције – потрошене су компоненте, реакција се зауставља, нема амплификације, док је деградација продуката све већа. За разлику од класичне PCR методе која анализира продукте након платоа реакције, Real-time PCR методом детекција PCR амплификације врши се у експоненцијалној фази, у којој се амплификација најбрже дешава, што омогућава високу специфичност и сензитивност ове методе.

Систем се заснива на детекцији и квантификацији флуоресцентног сигнала, који је директно пропорционалан количини PCR продукта у реакцији. Присуство алелских форми, односно полиморфизама нуклеотидне секвенце (енгл. Single Nucleotide Polymorphisms, SNPs) у HMGB1 гену су одређивани алелском дискриминацијом на Real-Time PCR 7300 апарату (Applied Biosystems, Foster city, CA, USA). Анализирани су следећи полиморфизми HMGB1 гена: rs2249825 [C/G], rs4540927 [G/A], rs19299606 [C/T], rs17074615 [A/C], rs1412125 [T/C], rs1060348 [C/T], rs1045411 [G/A], rs3742305 [G/C].

Коришћени су комерцијално доступни есеји са одговарајућим пробама, TaqMan SNPs Genotyping Assay (Applied Biosystems, Foster city, CA, USA) у концентрацији 40x и 2x Universal TaqMan MasterMix (Applied Biosystems, Foster city, CA, USA). Комерцијални TaqMan есеји за алелску дискриминацију садрже пар прајмера који се налазе узводно и низводно од места потенцијалне промене,

односно од циљне секвенце геномске ДНК која садржи СНП од интереса, као и две пробе за обе алелске форме, пробу за wild-type алел, изворни алел који је чешћи у популацији, као и пробу за мутирани алел. ТаqМан пробе су олигонуклеотиди обележени флуоресцентном репортер бојом на 5' крају и бојом пригушивача (енгл. quencher) на 3' крају. На основу комплементарности пробе хибридују са специфичном секвенцом која обухвата место на којем може доћи до нуклеотидне промене, односно полиморфизма. Две пробе међусобно разликују у само једном нуклеотиду који је комплементаран вилд тупе, односно мутираном алелу и обележене су различитим флуоресцентним бојама VIC и FAM.



СЛИКА 20 - Одређивање полиморфизама алелском дискриминацијом Real-Time PCR методом

Када је побуђена светлошћу, флуоресцентна репортер боја се ексцитује и емитује флуоресценцију, коју пригушивач апсорбује када се налазе на малој удаљености (долази до трансфера флуоресцентне резонанантне енергије). Када је

проба интактна близина боје репортера и боје пригушивача спречава емитовање флуоресценције, што је приказано на СЛИЦИ 20.

Након хибридизације прајмера и комплементарног спаривања пробе са циљном секвенцом, Таq полимераза катализује полимеризацију нуклеотида везивањем за 5' крај прајмера и елонгацију, чиме се умножава, амплификује циљна секвенца за коју је везана ТаqMan проба. Када додје до ТаqMan пробе, својом 5' егзонуклеазном активношћу Таq полимераза исеца 5' крај пробе на ком се налази боја репортер. Тиме долази до раздвајања репортерске боје и пригушивача, чиме долази до емитовања флуоресценције.

Са сваким циклусом се флуоресцентна репортерска боја којом је проба била обележена ослобађа у раствор и сигнал флуоресценце се повећава. Интензитет флуоресцирања одговара количини амплификата у реакцији. Акумулација PCR продуката се прати детекцијом пораста нивоа флуоресценције коју емитује боја репортер, пропорционална је броју циклуса и може се пратити у реалном времену, на основу чега је метода и добила име. Код хомозиготног генотипа детектује се само једна флуоресцентна боја у узорку, специфична за вилд тупе или мутирани алел, док се у случају хетерозигота региструју обе флуоресцентне боје.

Након изолације ДНК, у реакциону смешу за Real-Time PCR се додаје 5 μ L ДНК, универзални мастер микс (12.5 μ L по узорку), ТаqMan проба (0.625 μ L по узорку), а водом се допуни запремина до 25 μ L реакционе смеше. Паралелно са реакцијом је рађена и негативна контрола контаминације реагенса, која је садржила све компоненте реакционе смеше осим геномске ДНК и означена је као NTC (Non Template Control). За анализу алелске дискриминације ТаqMan есејима су коришћени универзални услови PCR реакције, препоручени од произвођача, 40 циклуса реакције и температура елонгације од 60°C. Алел специфичне флуоресцентне криве су детектоване и анализиране коришћењем 7500 System SDS softvera (Applied Biosystems, Foster City, California, USA).

Г. ВАРИЈАБЛЕ КОЈЕ СУ СЕ МЕРИЛЕ У СТУДИЈИ

1. Независне варијабле (узроци)

а) генски полиморфизам односно учесталост појединих генских алела за цитокин HMGB1 код критично оболелих пацијената са SIRS-ом – номинална квалитативна варијабла

б) демографске карактеристике пацијената- пол (мушки/женски)– дихотомна квалитативна варијабла и старост – номинална квантитативна варијабла

ц) лабораторијске вредности интерлеукина (IL) - 6, Ц-реактивног протеина (CRP) и експресије CD64 рецептора на неутрофилима- номинална квантитативна варијабла

2. Зависне варијабле (исходи)

а) врста бактеријског узрочника из налаза хемокултуре (Грам позитивне бактерије, Грам негативне бактерије, мешана бактеријска флора и стерилне хемокултуре) – номинална квалитативна варијабла

б) исход лечења (преживео/ умро) односно хоспитални морталитет – дихотомна квалитативна варијабла

Д. СНАГА СТУДИЈЕ И ВЕЛИЧИНА УЗОРКА

Основна подела болесника у овој студији биће направљена у односу на инсулт који је довео до SIRS-а код критично оболелих пацијената на две групе (сепса, траума) односно 4 подгрупе (сепса - перитонитис, сепса- панкреатитис, траума, траума са секундарном сепсом). Радна хипотеза је да постоји повезаност између учесталости алела гена за HMGB1 и врсте инсулта који је довео до SIRS-а са врстом бактеријског проузроковача инфекције и исходом код критично оболелих пацијената. Снага студије треба да буде минимално 80%, а вероватноћа грешке првог типа ($\alpha = 0,05$). Значајност разлика у учесталости полиморфизма гена

утврђиваће се применом χ^2 -теста. Полазећи од претпоставке да ће очекивана учесталост појаве полиморфизма гена бити 30%, произилази да је потребан број испитаника минимално 112. Процена је извршена на основу података неколико генетских студија повезаности које су објављене у водећим међународним часописима и које обрађују сличну тему. Анализа је извршена уз помоћ комерцијално доступног програма GPower 3.1.

Ђ. СТАТИСТИЧКА ОБРАДА ПОДАТАКА

Комплетна статистичка анализа података ће бити извршена је помоћу комерцијалног статистичког софтвера SPSS Statistics 17. Већина варијабли биће представљена у виду фреквенција појединих обележја (категија) а статистичка значајност разлика провериће се применом χ^2 -теста. У случају континуираних варијабли, подаци ће бити приказани као средња вредност \pm стандардна девијација (СД) а статистичка значајност између група биће процењивана применом t-теста. За процену јачине повезаности ризик фактора и клинички значајних исхода (преживљавање, врста бактеријског проузроковача инфекције) као зависних варијабли, биће коришћена бинарна логистичка регресија. Јачина повезаности појединачних ризик фактора и горе поменутих исхода биће приказана у виду *odds* односа и њихових 95%-них граница поверења. Статистички значајна разлика процењиваће се на минималном нивоу $p < 0,05$.

Receiver operator curves је детерминисана да одреди cut-off вредност за оптималну сезитивност и специфичност нивоа биомаркера за педикцију исхода. Прогностичка тачност биомаркера је изражена као поље испод ROC криве (AUC) и 95% интервал поверења (CI). AUC дефинише вероватноћу за коректну дискриминацију између преживелих и умрлих (survivors vs non-survivors).

8. РЕЗУЛТАТИ

Истраживањем је било обухваћено 119 критично оболелих хируршких пацијената са клиничком сликом системског инфламаторног одговора (SIRS). У ово истраживање је укључено 75 (63.0%) мушкараца и 44 (37.0%) жене (према методологији наведеној у поглављу МЕТОДЕ И ИСПИТАНИЦИ). Просечна старост пацијената је износила 56,53 година. Од 40 пацијената са тешком траумом, код 19 се развила секундарна сепса (група ТРАУМА). Осталих 79 пацијената имало је тешку сепсу (група СЕПСА). Већина пацијената са сепсом, као основну болест је имала перитонитис (n=62), а остали су као основно обољење имали тешки некротизирајући панкреатитис (n=17). Стопа хоспиталног морталитета је била 47.05% (56 од 119 пацијената је умрло).

На ТАБЕЛИ 1 приказана је дистрибуција полиморфизама гена за HMGB1 на позицијама rs2249825 [C/T], rs4540927 [G/A], rs19299606 [C/T], rs17074615 [A/C], rs1412125 [T/C], rs1060348 [C/T], rs1045411 [G/A], rs3742305 [G/C] у групи критично оболелих пацијената са SIRS-ом.

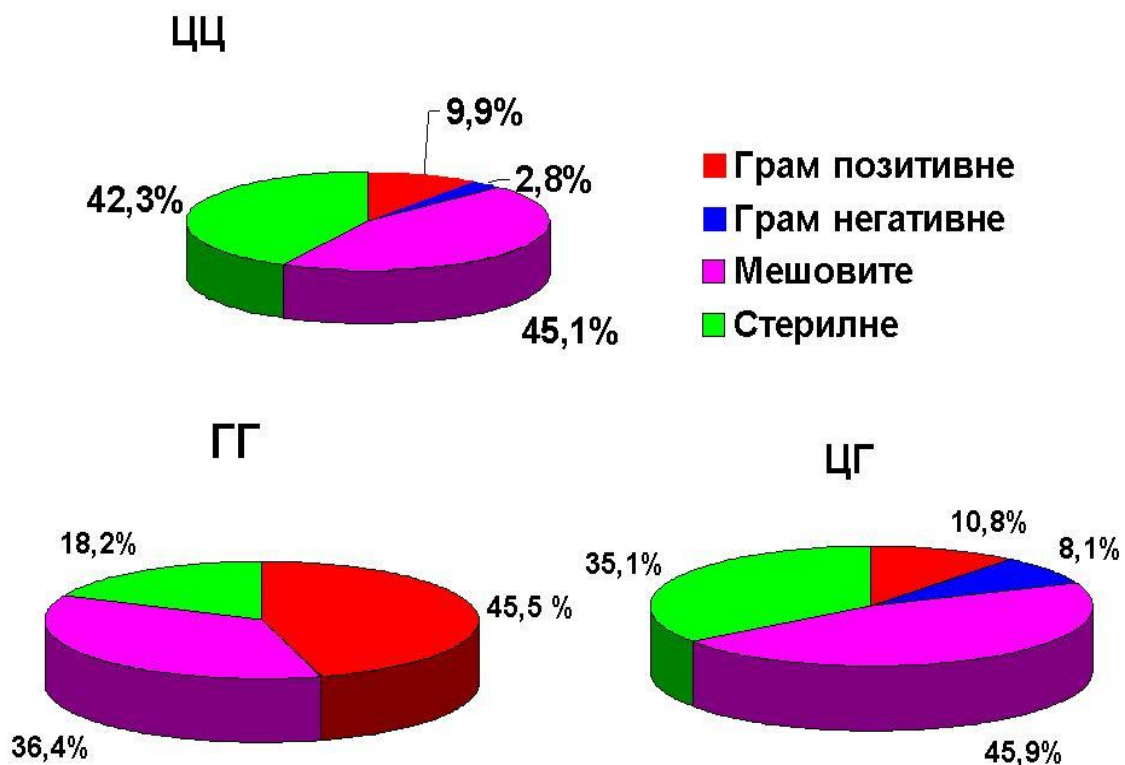
полиморфизам гена за HMGB1	ГЕНОТИП		
	CC	CG	GG
rs2249825 [C/G]	71 (59.7%)	37 (31.1%)	11 (9.2%)
	AA	GA	GG
rs4540927 [G/A]	0 (0%)	0 (0%)	119 (100%)
	CC	CT	TT
rs19299606 [C/T]	119 (100%)	0 (0%)	0 (0%)
	AA	AC	CC
rs17074615 [A/C]	119 (100%)	0 (0%)	0 (0%)
	CC	TC	TT
rs1412125 [T/C]	31 (26.1%)	55 (46.2%)	33 (27.7%)
	CC	CT	TT
rs1060348 [C/T]	113 (95.0%)	6 (5.0%)	0 (0%)
	AA	GA	GG
rs1045411 [G/A]	9 (7.6%)	37 (31.1%)	73 (61.3%)
	CC	GC	GG
rs3742305 [G/C]	9 (7.6%)	40 (33.6%)	70 (58.8%)

ТАБЕЛА 8 - Дистрибуција полиморфизама гена за цитокин HMGB1 на позицијама rs2249825 [C/T], rs4540927 [G/A], rs19299606 [C/T], rs17074615 [A/C], rs1412125 [T/C], rs1060348 [C/T], rs1045411 [G/A], rs3742305 [G/C] у групи критично оболелих пацијената са SIRS-om

8.1. Полиморфизам гена за HMGB1 на позицији rs2249825 [C/G]

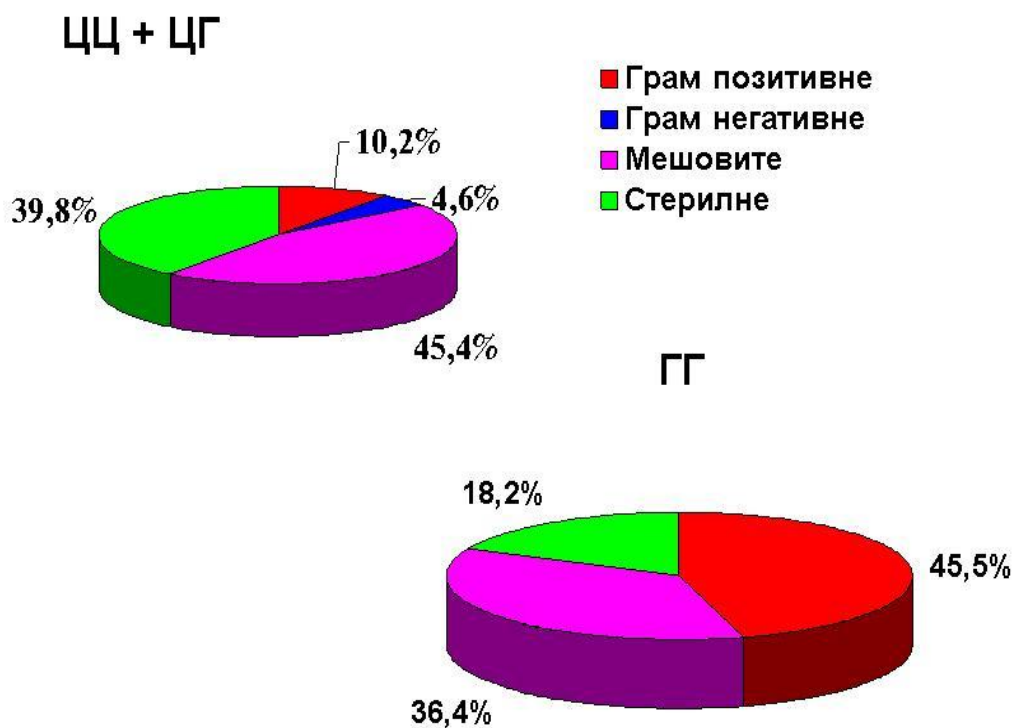
Дистрибуција три HMGB1 генотипа (CC, CG, GG) на позицији rs2249825 [C/G] је у овом истраживању била статистички значајно повезана са врстом бактеријског проузроковача (Грам-позитивне бактерије, Грам-негативне бактерије, мешовита инфекција); Pearson $\chi^2 = 13.130$; $p < 0.05$.

Код пацијената са Грам-позитивном сепсом најчешћи је био GG генотип, док је код пацијената са мешовитом инфекцијом најчешћи био CG генотип. Код пацијената са CC генотипом доминирале су стерилне хемокултуре (ГРАФИКОН 1).



ГРАФИКОН 1 - Асоцијација HMGB1 на позицији rs2249825 [C/G] са врстом бактеријског проузроковача

Поређење GG генотипа са комбинацијом CC и CG показало је да постоји статистички високо значајна повезаност са врстом бактеријског проузроковача (Pearson $\chi^2 = 11.163$; $p < 0.01$), при чему је код пацијената са GG генотипом Грам-позитивна сепса била убедљиво најчешћа, а код пацијената са C алелом у било ком од генотипова доминирала је мешовита инфекција (ГРАФИКОН 2).



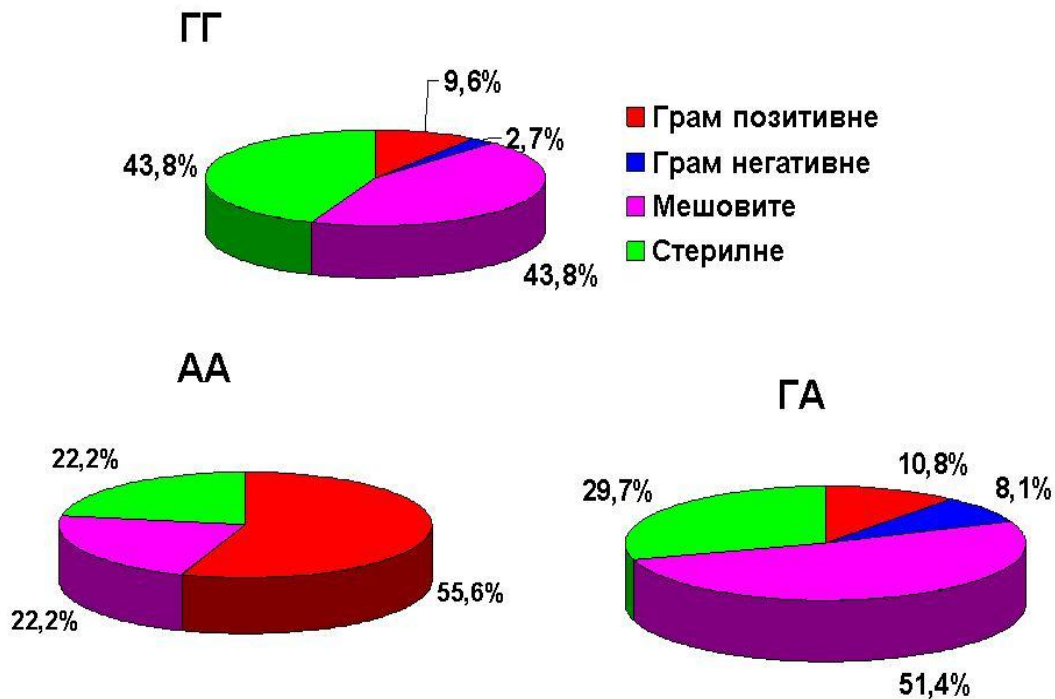
ГРАФИКОН 2 - Асоцијација NMGB1 на позицији rs2249825 [C/G] генотипа GG и комбинације CC + CG генотипа са врстом бактеријског проузроковача

Није нађена статистички сигнификантна асоцијација између било ког од генотипова са основним обољењем које је довело до сепсе (перитонитис, панкреатитис). Такође, није било статистички значајне асоцијације између било ког од три генотипа са исходом.

8.2. Полиморфизам гена за HMGB1 на позицији rs1045411 [G/A]

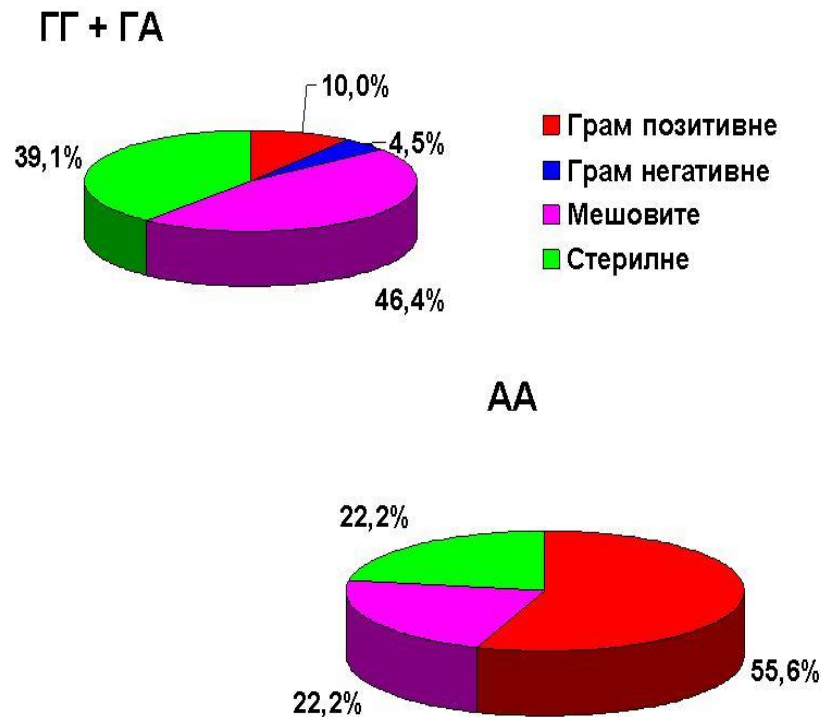
Дистрибуција три HMGB1 генотипа (AA, GA, GG) на позицији rs1045411 [G/A] је у овом истраживању била статистички високо значајно повезана са врстом бактеријског проузроковача (Грам-позитивне бактерије, Грам-негативне бактерије, мешовита инфекција); Pearson $\chi^2 = 18.280$; $p < 0.01$.

Код пацијената са Грам-позитивном сепсом најчешћи је био AA генотип, док је код пацијената са мешовитом инфекцијом најчешћи био GA генотип. Код пацијената са GG генотипом доминирале су подједнако мешовите и стерилне хемокултуре (ГРАФИКОН 3).



ГРАФИКОН 3 - Асоцијација HMGB1 на позицији rs1045411 [G/A] са врстом бактеријског проузроковача

Поређење AA генотипа са комбинацијом GG и GA показало је да постоји статистички високо значајна повезаност са врстом бактеријског проузроковача (Pearson $\chi^2 = 14.965$; $p < 0.01$), при чему је код пацијената са AA генотипом Грам позитивна сепса била убедљиво најчешћа, а код пацијената са G алелом у било ком од генотипова доминирала је мешовита инфекција (ГРАФИКОН 4).



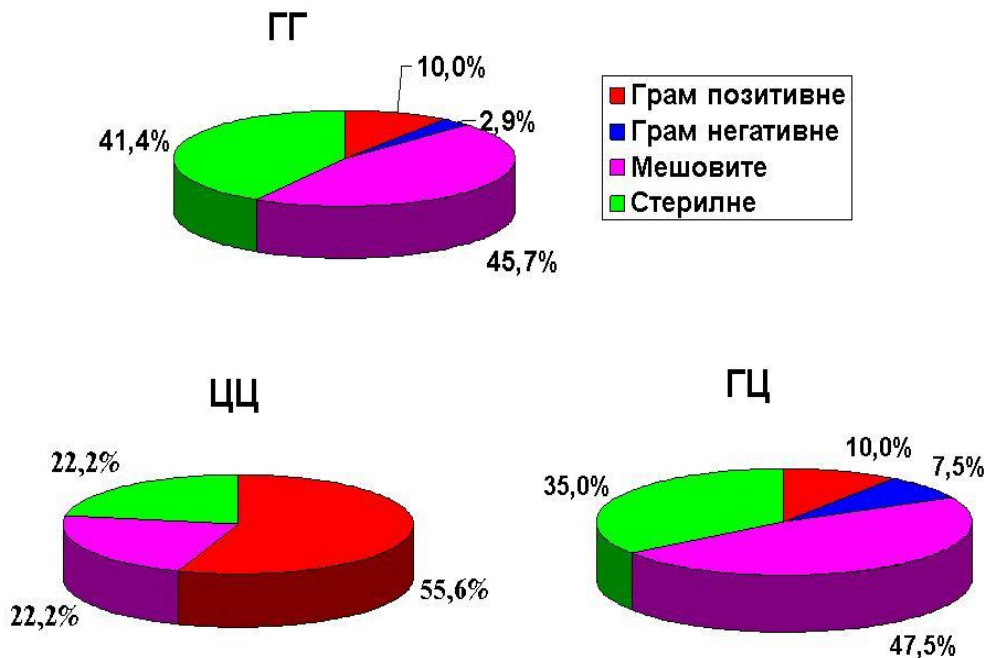
ГРАФИКОН 4 – Асоцијација NMGB1 на позицији rs1045411 [G/A] генотипа AA и комбинације GG + GA генотипа са врстом бактеријског проузроковача

Није нађена статистички сигнификантна асоцијација између било ког од генотипова са основним обољењем које је довело до сепсе (перитонитис, панкреатитис). Такође, није било статистички значајне асоцијације између било ког од три генотипа са исходом.

8.3. Полиморфизам гена за HMGB1 на позицији rs3742305 [G/C]

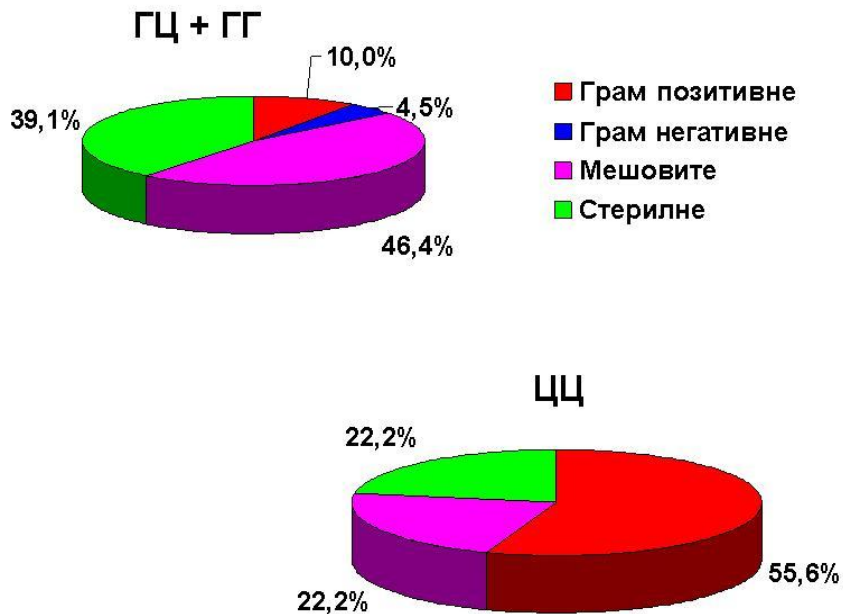
Дистрибуција 3 ХМГБ1 генотипа (CC, GC, GG) на позицији rs3742305 [G/C] је у овом истраживању била статистички високо значајно повезана са врстом бактеријског проузроковача (Грам-позитивне бактерије, Грам-негативне бактерије, мешовита инфекција); Pearson $\chi^2 = 16.567$; $p < 0.01$.

Код пацијената са Грам-позитивном сепсом најчешћи је био CC генотип, док је код пацијената са мешовитом инфекцијом најчешћи био GC генотип. Код пацијената са GG генотипом доминирале су мешовите па затим стерилне хемокултуре (ГРАФИКОН 5).



ГРАФИКОН 5 - Асоцијација HMGB1 на позицији rs3742305 [G/C] са врстом бактеријског проузроковача

Поређење СС генотипа са комбинацијом СГ и GG показало је да постоји статистички високо значајна повезаност са врстом бактеријског проузроковача (Pearson $\chi^2 = 14.965$; $p < 0.01$), при чему је код пацијената са СС генотипом Грам-позитивна сепса била убедљиво најчешћа, а код пацијената са G алелом у било ко мод генотипова доминирала је мешовита инфекција (ГРАФИКОН 6).



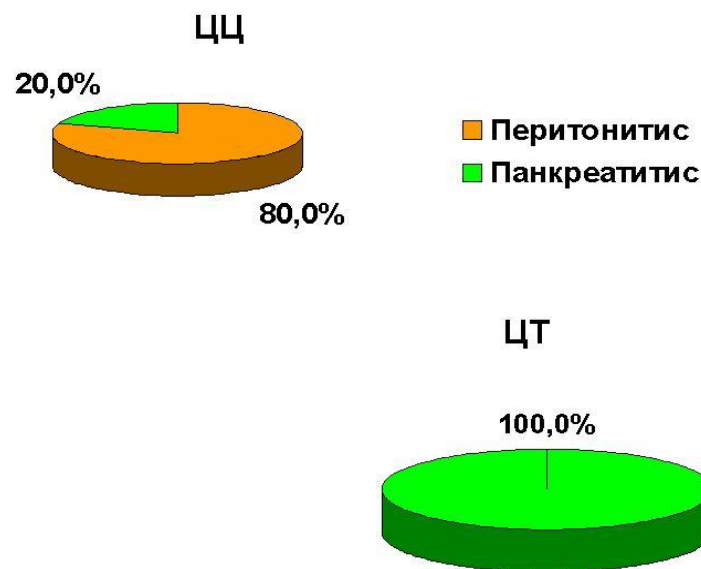
ГРАФИКОН 6 - Асоцијација НМGB1 на позицији rs3742305 [G/C] генотипа СС генотипа и комбинације GG + GC генотипа са врстом бактеријског проузроковача

Није нађена статистички сигнификантна асоцијација између било ког од генотипова са основним обољењем које је довело до сепсе (перитонитис, панкреатитис). Такође, није било статистички значајне асоцијације између било ког од три генотипа са исходом.

8.4. Полиморфизам гена за ХМБГ1 на позицији rs1060348 [C/T]

Дистрибуција три генотипа НМГВ1 (СС, СТ, ТТ) на позицији rs1060348 [C/T] је у овом истраживању била статистички високо значајно повезана са основним обољењем које је довело до сепсе (перитонитис, панкреатитис); Pearson $\chi^2 = 10.131$; $p < 0.01$.

Код пацијената са перитонитисом који је довео до сепсе најчешћи је био СС генотип, док су сви пацијенти са панкреатитисом који се компликовао сепсом имали СТ генотип (ГРАФИКОН 7).



Графикон 7 – Асоцијација НМГВ1 на позицији rs1060348 [C/T] са основним обољењем које је довело до сепсе (перитонитис, панкреатитис)

Није нађена статистички сигнификантна асоцијација између било ког од генотипова са бактеријским проузроковачем. Такође, није било статистички значајне асоцијације између било ког од генотипова са исходом.

8.5. Полиморфизам гена за HMGB1 на позицији rs1412125 [T/C]

Дистрибуција три HMGB1 генотипа (CC, CT, TT) на позицији rs1412125 [T/C] показала је у овом истраживању да нема статистички сигнификантне асоцијације између било ког од генотипова са бактеријским проузроковачем или основним обољењем које је довело до сепсе. Такође, није било статистички значајне асоцијације између било ког од генотипова са исходом.

8.6. Полиморфизам гена за HMGB1 на позицији rs17074615 [A/C]

У нашем истраживању дистрибуција три HMGB1 генотипа (AA, AC, CC) на позицији rs17074615 [A/C] показала је да су сви пацијенти имали AA генотип.

8.7. Полиморфизам гена за HMGB1 на позицији rs19299606 [C/T]

У нашем истраживању дистрибуција три HMGB1 генотипа (CC, CT, TT) на позицији rs19299606 [C/T] показала је да су сви пацијенти имали CC генотип.

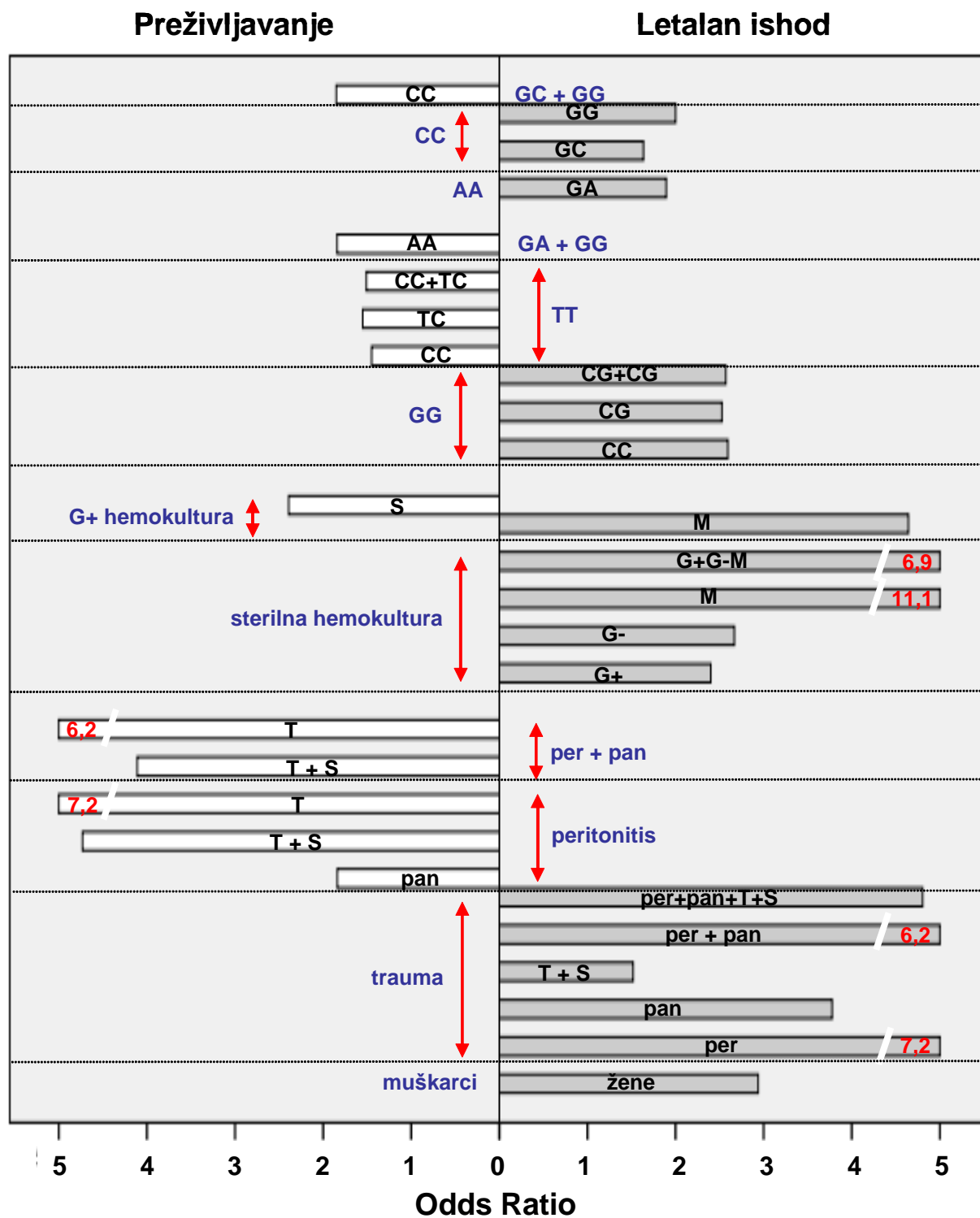
8.8. Полиморфизам гена за ХМБГ1 на позицији rs4540927 [G/A]

У нашем истраживању дистрибуција три HMGB1 генотипа (AA, GA, GG) на позицији rs4540927 [G/A] показала је да су сви пацијенти имали GG генотип.

8.9. Јачина асоцијације између полиморфизама и исхода, основног обољења и бактеријског проузроковача

Јачина асоцијације између полиморфизма гена за HMGB1 са једне стране, и исхода, основног обољења и бактеријског проузроковача са друге стране, изражена је као однос шанси (odds ratio – OR), а утврђена је методом бинарне логистичке регресије.

На ГРАФИКОНУ 8 је показана јачина асоцијације различитих полиморфизама гена за HMGB1, бактеријског проузроковача, основног обољења и пола у односу на исход.



ГРАФИКОН 8 -Јачина асоцијације различитих полиморфизама гена за HMGB1, бактеријског проузроковача, основног обољења и пола у односу на исход

8.10. ПРЕДВИЂАЊЕ МОРТАЛИТЕТА

На Табели 9 приказане су просечне вредности IL-6, CD64 index и Ц-реактивног протеина (CRP) у прва 3 дана.

На Табели 10 и Графиконима (9-12) приказане су вредности IL-6, CD64 и Ц-реактивног протеина (CRP) у прва три дана у односу на исход (преживели, умрли).

Параметар	Дан 1	Дан 2	Дан 3	p
IL-6 (pg/ml)	595,74±278,08	212,30±128,17	151,98±115,84	Z= -2,595; p<0,01 (day 1 vs day 2)
CD64 index	4,54±3,25	4,47±2,77	3,99±2,25	Z= -1.965; p<0,05 (day 2 vs day 3)
CRP (mg/L)	120,82±55,83	143,43±71,55	125,04±57,76	n.s.

ТАБЕЛА 9 - Просечне вредности IL-6, CD64 и Ц-реактивног протеина (CRP) у прва 3 дана

Параметар mean±SD	Дан 1		Дан 2		Дан 3	
	преживели	умрли	преживели	умрли	преживели	умрли
IL-6 (pg/mL)	400.55 ±216.39	764.00 ±478.80	153.68 ±98.15	268.47 ±101.78	96.27 ±64.68	197.85 ±106.47
CD64 индекс	3.49 ±2.23	5.64 ±3.82*	3.10 ±1.01	5.54 ±3.25*	3.01 ±1.23	4.75 ±2.63
CRP (mg/L)	157.96 ±83.32	143.37 ±86.69	141.91 ±69.84	160.47 ±88.46	151.42 ±46.39	131.40 ±72.42

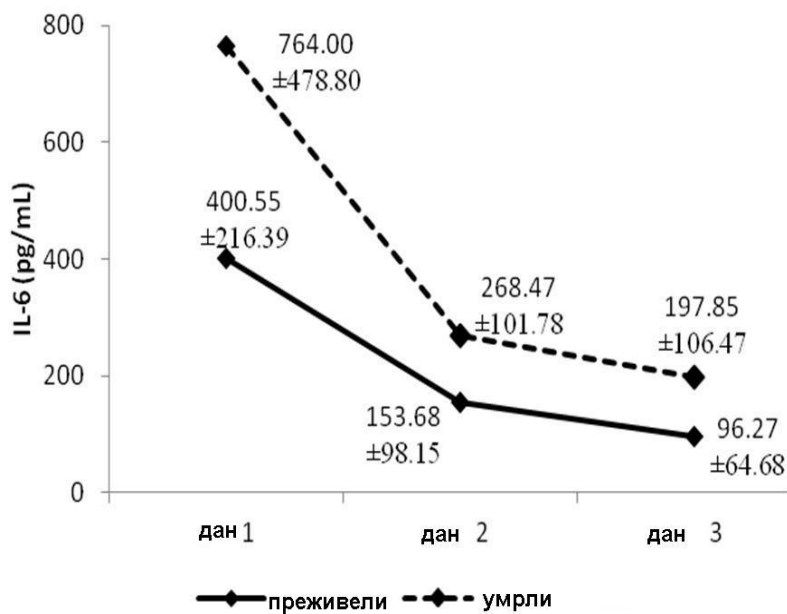
*преживели у односу на умрле, $p<0.05$

Табела 10 - Профил IL-6, CD64 и CRP од дана 1 до дана 3 према исходу

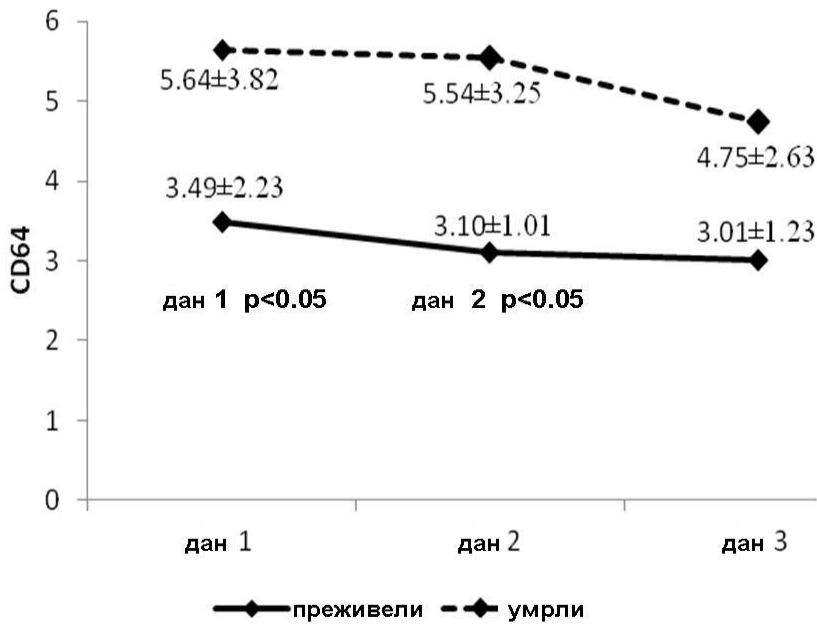
Најбољи у предиктивном смислу се показао CD64 индекс. Овај параметар је био 1.6 пута виши првог дана и 1.78 пута виши другог дана код умрлих ($p<0.05$). Вредност AUC/ROC за CD64 индекс првог дана у смислу предикције исхода била

је 0.727 (Графикон 12). При cut-off вредности од 2.80 сензитивност је била 75%, специфичност 65%, а OR 2.40 (95% CI 0.60 - 9.67). Пацијенти са нивоом CD64 индекса првог дана вишим од 2.80 имали су 2.4 пута већу вероватноћу смртог исхода.

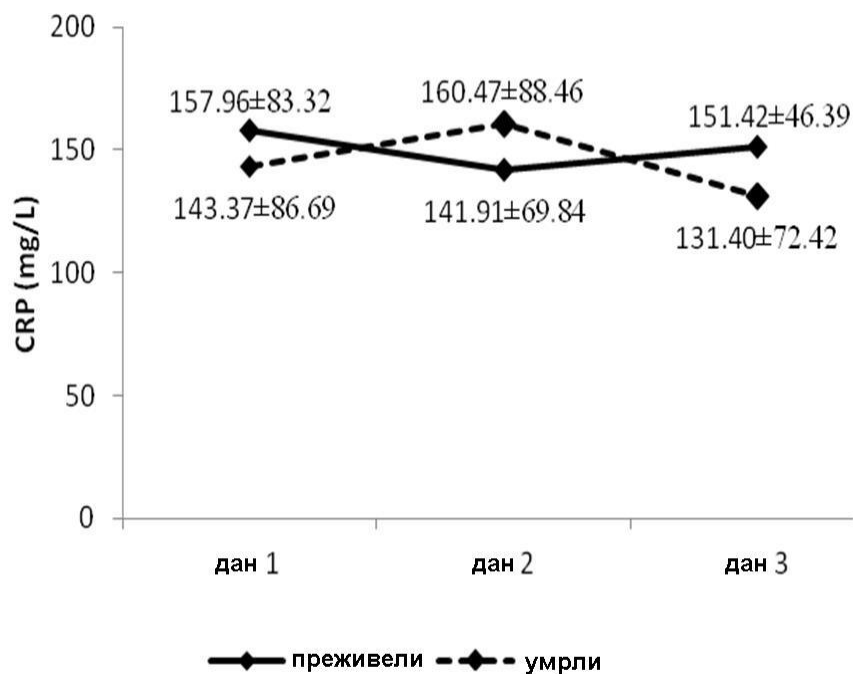
Вредности AUC/ROC за IL-6 и CRP су биле $< 0,55$, па се ови биомаркери нису показали као добри предиктори исхода.



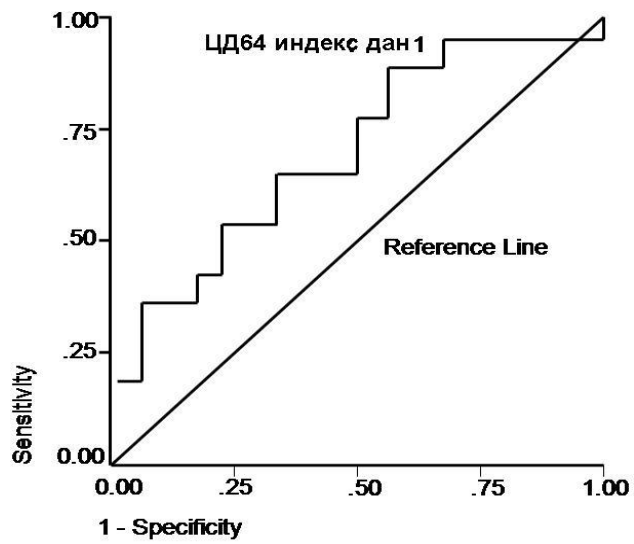
ГРАФИКОН 9 - Вредности IL-6 у прва три дана у односу на исход (преживели, умрли)



ГРАФИКОН 10 - Вредности CD64 индекса у прва три дана у односу на исход (преживели, умрли)



ГРАФИКОН 11 - Вредности CRP у прва три дана у односу на исход (преживели, умрли)



ГРАФИКОН 12 - ROC крива сензитивности и специфичности CD64 као предиктора исхода

9. ДИСКУСИЈА

Упркос модерним терапијским мерама, сепса компликована синдромом мултипле органске дисфункције – MODS-ом је водећи узрок смрти у хирушким јединицама интензивне терапије. Ако се развије септички шок са дисфункцијом органа, морталитет се креће од 30 до 70%. Одговор на примењене терапијске мере, морбидитет и морталитет пацијената са сепсом и траумом су делом генски детерминисани. Теоријски, уколико би се генетским испитивањем утврдило који од пацијената има повећан ризик за развој тешке сепсе, то би омогућило правовремено прилагођавање начина лечења. Већина савремених истраживања у свету, која се баве овом проблематиком су усмерена на испитивање полиморфизма и експресије гена који су укључени у различите фазе имунског одговора код пацијената са сепсом и траумом. Тежина клиничке слике и исход лечења ових пацијената, зависе од интензитета, дужине трајања и међусобног односа про- инфламаторног и анти-инфламаторног одговора.

Протеин HMGB1 има значајну улогу у великом броју ћелијских процеса, укључујући организацију хроматина, регулацију транскрипције и поправку оштећења у молекулу ДНК. Ван ћелије, HMGB1 делује као про- инфламаторни цитокин, има важну улогу у урођеној и стеченој имуности, те учествује у патогенези различитих болести, од трауме, сепсе, аутоимунских болести до развоја канцера и метастаза (96). Све ове одлике су поставиле протеин HMGB1 у центар великог броја базичних и клиничких студија. Већи број студија је показао генски полиморфизми овог протеина могу имати утицај у инфламацији, имунотолеранцији и туморској имуности (3).

Примарни циљ ове студије је утврђивање учесталости полиморфизма гена за HMGB1 на позицијама rs2249825 [C/G], rs4540927 [G/A], rs19299606 [C/T], rs17074615 [A/C], rs1412125 [T/C], rs1060348 [C/T], rs1045411 [G/A], rs3742305 [G/C] код критично оболелих пацијената са SIRS-ом, као и повезаност појединих

алелских облика гена за HMGB1 са исходом болести и са бактеријским узрочником инфекције. Такође, испитана је значајност цитокина и биомаркера, интерлеукина-6, Ц- реактивног протеина и експресије CD64 на неутрофилима, и утицај на исход лечења критично оболелих пацијената са сепсом.

Ова студија је показала да су значајна 5 полиморфизма гена за цитокин HMGB1 и то rs2249825 [C/G], rs1412125 [T/C], rs1060348 [C/T], rs1045411 [G/A] и rs3742305 [G/C] у популацији пацијената са SIRS-ом (сепса, траума) у хирушкој Јединици интензивне терапије. Учесталости појединих алела су наведене у ТАБЕЛИ. Три полиморфизма гена за HMGB1 и то rs4540927 [G/A], rs19299606 [C/T] и rs17074615 [A/C] су потпуно идентична (100%) у наведеној популацији пацијената. Од наведених 5 полиморфизма, њих 4 су значајни и у студији Kornblita et al. у популацији пацијената са SIRS-ом у Данској (90). Расподела дистрибуција појединих алела је врло слична (доминантан алел је идентичан), док је полиморфизам rs1060348 [C/T] са алелима CC (95%), CT (5%) и TT (0%) потпуно идентичан у обе студије. Ово запажање говори у прилог чињеници да је ген за HMGB1 високо конзервиран и да су његове генетске варијације минималне (за разлику од других цитокина), чак и међу различитим етичким групама. Такође, и у генетској студији асоцијације Zeng et al., која је спроведена у Кини на популацији пацијената са тешком траумом, наводи се значајност већ наведених три полиморфизма и то rs1412125, rs2249825 и rs1045411 (91).

Наша студија није показала статистички значајну асоцијацију између било ког од наведених 5 полиморфизма гена за цитокин HMGB1 са исходом болести. Иако није било статистичке значајности, учесталост појединих алела је већа у групи преживелих или групи умрлих. Тако, код полиморфизма rs2249825, преживеле особе имају CC генотип (који је и најчешти 59,7%) у односу на генотипове GG и GC. Код полиморфизма rs1045411, преживеле особе имају AA генотип (који је најређи 7,6%) у односу на GA и GG генотипове. Код полиморфизма rs1060348, значајна су два генотипа CC и TC код особа које су

преживеле. И на крају код полиморфизма rs3742305, преживеле особе су имале GG генотип (који је најчешћи 58,8%), у односу на CC и CG генотипове.

У студији Kornblita et al. је проучавана веза између генског полиморфизма за цитокин HMGB1 и исхода болести (90). Студија је изведена као четворогодишње истраживање и укључила је 239 пацијената из ЈИТ-а, пратећи клинички исход и ниво HMGB1 у плазми. Нађена је удруженост између полиморфизма гена rs1060348 [C/T] односно (982 C>T) и ране смртности због инфекције ($p=0,04$). Пацијенти са СТ генотипом (чија је учесталост ређа, 5%) имају већу вероватноћу да умру у односу на пацијенте са CC генотипом (учесталост чешћа, 95%). Такође, ови пацијенти имају већи број критеријума за SIRS, мањи PaO₂/FiO₂ индекс као и нижи серумски ниво HMGB1 ($p=0,01$). Наведени полиморфизам је смештен у кодирајућем региону овог гена на егзону 4. Исти аутори у ранијој студији о полиморфизму гена за HMGB1, овај полиморфизам означају као нему базну супституцију (silent), без утицаја на оквир читања (reading frame) или низ аминокиселина у крајњем протеину. Такође, постоји повезаност генотипова rs41369348 односно (-1377delAA/-) и (-1377delA/-) са повећаним дугорочним морталитетом, који је независан од старости пацијената и од броја испуњених критеријума за SIRS ($p=0,01$). И на крају, није нађена разлика у серумском нивоу HMGB1 између пацијената са SIRS-ом и сепсом ($p=0,08$) и као и између оних који су преживели и умрли ($p=0,13$).

Студија кинеских аутора Zeng et al је проучила везу између полиморфизма за ген HMGB1 и клиничког исхода (развој сепсе и MODS-а) код пацијената са тешком траумом (91). Полиморфизам rs2249825 (C/G) или +3814 (C/G) и то варијанте са G алелом (C/G, C/C), је удружен са повећаном LPS- индукованом продукцијом HMGB1. Такође, ови пацијенти имају повећани ризик за развој сепсе и већи MODS скор. Иако је овај полиморфизам лоциран у некодирајућем интрону 1, он може утицати на везујуће место ν -Myb, који је снажни појачивач експресије цитокина HMGB1, што може бити разлог повећане продукције HMGB1 у леукоцитима из периферне крви.

Студија данских аутора Kornbilt et al. је анализирала однос између полиморфизма за ген HMGB1 и исхода болести код пацијената са хематолошким малигним болестима након алогене хематопоетске трансплантације ћелија (93). Нађено је да је полиморфизам на позицији rs41369348 или -1377delA удружен са повећан ризиком од релапса болести (hazard ratio 2,11 , p=0,02). Иста група аутора је нагласила значај овог полиморфизма на преживљавање пацијента са SIRS-ом у раније наведеној студији (90). Такође, полиморфизам на позицији +3814 C/G (rs2249825) је удружен са бољим преживљавањем (HR 0,13 , p=0,04) и смањеном вероватноћом релапса болести (p=0,03). Исти аутори наводе објашњење могућег утицаја генског полиморфизма на експресију гена. Полиморфизми лоцирани у регулаторним регионима могу мењати структуру везујућег места за транскрипционе факторе, и на тај начин утичу на афинитет апарата за транскрипцију. Полиморфизми лоцирани у егзонима или на граници егзона и интрона, могу мењати структуру и функцију протеина, индукујући промене аминокиселина, стоп кодона или промену спајања и стабилности информационе РНК.

Студија кинеских аутора Deng et al. је анализирала однос између полиморфизма за ген HMGB1 и исхода болести код пацијената са хроничном хепатитис Б вирусном инфекцијом (92). Студија је анализирала само један генски полиморфизам на позицији +1176 G/C (на интрону 4 гена за HMGB1 протеин) и закључила да пацијенти са G/G алелом имају већу вероватноћу за развој тежег, прогресивног статуса хепатитис Б инфекције (хронични хепатитис, цироза јетре и тежак облик хепатитис Б инфекције). Полиморфизми који су лоцирани у овом региону могу утицати на обраду примарног транскрипта (splicing) и на стабилност информационе РНК. Deng et al. указали да полиморфизам 1176 G/C у интрону 4, у региону границе између интрона и егзона, садржи секвенце које су карактеристичне за енхансере и могу утицати на експресију HMGB1. Са друге стране, на потенцијалну регулисаност експресије гена преко промена стабилности информационе РНК и транслације, указује постојање и других конзервираних региона 3' нетранслатирајућих региона (3'UTR) (97). У оквиру 3'UTR HMGB1 гена

постоји потенцијално везујуће место за протеин репресор транскрипције-transcriptional repressor cut homeodomain protein, ССААТ displacement protein. Гени p53 и p73a имају улогу у транскрипционој регулацији HMGB1 гена, делујући преко транскрипционог фактора, који се везује за ове елементе- ССААТ-binding transcription factor 2 (CFT2) (98). Док p53 смањује активност промотора HMGB1 гена, p73a га активира (99). Овај полиморфизам може да има утицај на активност HMGB1 промотора. Додатно, полиморфизам HMGB1 на позицији 2262 G/A, лоциран у 3' UTR може мењати везивање микро РНК и на тај начин мењати стабилност информационе РНК (95).

Када је питању удруженост између бактеријског проузруковача сепсе и исхода болести, јасно је да пацијенти са позитвним хемокултурама имају већу смртност у односу на оне са стерилним хемокултурама. У наше истраживање је укључено 119 пацијената са SIRS-ом, њих 74 (62,2%) су имали позитивне на хемокултуре, док су оне биле негативне код 45 пацијената (37,8%). Ови подаци се слажу са подацима из велике европске студије о узрочницима инфекције код пацијената са сепсом (5). У студији Zeng et al. која је проучавала генске полиморфизме цитокина HMGB1 у групи пацијента са траумом, најчешћи бактеријски узрочници су Грам- негативне бактерије (23%), затим Грам- позитивне (16%), и на крају мешовите (7,2%) и гљивице (3,8%) (91). У нашем истраживању (група пацијената са SIRS-ом), била је другачија структура пацијената (у групи СЕПСА је било дупло више пацијената него у групи ТРАУМА), тако да је било највише пацијената са мешовитом бактеријском флором, што се објашњава дужим лечењем пацијената са перитонитисом и панкреатитисом, као и већом могућношћу за развој секундарних инфекција. Највећу смртност су имали пацијенти са мешовитим бактеријама (OR-11,4 p=0,000) у односу на пацијенте са стерилним хемокултурама, затим следе пацијенти са Грам- негативним бактеријама (OR-2,67 p=0,320) и на крају пацијенти са Грам- позитивним бактеријама (OR-2,40 p=0,169). Према подацима из литературе, сама врста изоловане бактерије не утиче директно

на исход лечења болесника са сепсом, значајнија је тежина клиничке слике (100). Развој секундарних нозокомијалних инфекција прати повећана смртност (101).

Пацијенти из групе СЕПСА (перитонитис, панкреатитис) имали су већу смртност у поређењу са групом ТРАУМА (OR-6,24 $p=0,002$). То је сасвим очекивано, јер су пацијенти из групе СЕПСЕ имали тежак облик болести (тешка сепса, септички шок), високи SOFA ($7,86\pm 2,47$) и APACHE II ($22,09\pm 4,44$) скор. Такође, ови пацијенти су били старије животне доби. Према подацима из литературе, постоји директна веза између година и тежине сепсе, тако да је она најчешћа код старијих пацијената (просечна старост 60-65 год) и код новорођене деце (102).

У групи СЕПСА пацијенти са перитонитисом су имали већу смртност у односу на пацијенте са траумом (OR-7,21 $p=0,001$), док смртност пацијената са панкреатитисом, иако је била већа у односу на трауму, није достигла статистичку значајност (OR-3,78 $p=0,072$). Према подацима из литературе, смртност пацијената са тешким акутним панкреатитисом износи 10- 24% (103).

У групи ТРАУМА, пацијенти са траумом и сепсом су имали већу смртност у односу на пацијенте са „чистом“ траумом, али без статистичке значајности (OR-1,52 $p=0,584$).

И на крају, у нашем истраживању жене су имале већу смртност у односу на мушкарце у групи пацијената са SIRS-ом (OR-2,94 $p=0,006$). Број жена је био већи у групи СЕПСА, док је број мушкараца био већи у групи ТРАУМА. Чини се да жене имају мању склоност за развој сепсе, али није јасно да ли је та разлика веће преваленце коморбидитета код мушкараца или могуће заштите жена од инфламаторних промена у сепси (104).

У нашем истраживању дистрибуција генотипа на позицијима rs2249825 [C/G], rs1045411 [G/A] и rs3742305 [G/C] су биле статистички значајно повезане са врстом бактеријског проузроковача.

У литератури нема истраживања које је проучавало асоцијацију између генског полиморфизма за цитокин HMGB1 и бактеријског узрочника инфекције

(Грам-позитивне, Грам-негативне и мешовите инфекције), изолованих из хемокултура.

Такође, ретке су и студије које су проучавале повезаност генских полиморфизма за поједине цитокине и бактеријске узрочнике инфекције. У студији Šurbatović et al. наведена је асоцијација генских полиморфизма за цитокине IL-10 на позицији 1082(A/G) као и за CD14 на позицији 159(C/T) и бактеријских узрочника инфекције, изолованих из хемокултура (105). Наводе се и студије које су проучавале повезаност генских полиморфизма за рецепторе TLR-2 и TLR-4 и ризика за развој Грам- негативне сепсе (3). У студији Garred et al. (106) која је проучавала асоцијацију генских полиморфизма рецептора Лектина који везује манозу (енгл. mannose- binding lectin- MBL) и исхода, наводи се повезаност између алелних варијанти mb12 гена са смањеном продукцијом и нижим серумским нивом MBL и позитивних хемокултура (за Грам- позитивне и за грам- негативне бактерије, али не и за гљиве). Када је у питању цитокин HMGB1, тешко је само серумским нивом објаснити утицај овог цитокина на склоност ка развоју одређеног типа бактеријских инфекција. Према подацима из студије Unterwaldera et al. ниво HMGB1 не корелира са тежином болести (користећи APACHE II и SOFA скор) и серумским нивом про- (TNF-, IL-6) и анти- инфламаторних (IL-10) и прокалцитонина пацијената са сепсом и имуносупресијом (107). Такође, у студији Karlsson et al. је показано да се серумски ниво HMGB1 не разликује код преживелих и умрлих пацијената са тешком сепсом, као и да ниво HMGB1 не може бити предиктор тежине болести и морталитета (108). У студији Eskici et al. серумски ниво HMGB1 је већи код пацијената са сепсом и дисеминованом интраваскуларном коагулацијом у односу на сепсу, али без статистичке значајности (109).

У нашем истраживању, у групи пацијената СЕПСА анализирана је дистрибуција полиморфизма гена за HMGB1. Дистрибуција три генотипа HMGB1 (CC, CT, TT) на позицији rs1060348 [C/T] је у овом истраживању била статистички високо значајно повезана са основним обољењем које је довело до сепсе

(перитонитис, панкреатитис). У литератури нема истраживања које је проучавало асоцијацију између генског полиморфизма за цитокин HMGB1 и основног обољења које је довело до сепсе.

Иако било који генетски фактор, који утиче на експресију регулаторних цитокина-хемокина, може потенцијално мењати инфламаторни одговор на оштећење панкреаса, постоји мали број студија који се баве овим проблемом (110). Студија Zhaoh et al. негира важност генетских фактора у подложности пацијента за развој тешког акутног панкреатитиса (111). У студији Šurbatović et al. наведена је асоцијација генских полиморфизма за цитокин IL-10 на позицији 1082(A/G) са основним обољењем које је довело до сепсе (панкреатитис, перитонитис) (105). Мета- анализа Lin et al. је показала позитивну асоцијацију између серумског нивоа HMGB1 и прогресије акутног панкреатитиса (112). У експерименталној студији Tang et al. наводи се могућа двострука улога HMGB1 у акутном панкреатитису, и то заштитна (интрацелуларна блокада ослобођене ДНК и хистона) и патолошка (екстрацелуларни HMGB1) (113).

Биомаркери су параметри који се могу објективно мерити и анализирати као показатељи нормалних биолошких процеса, патолошких процеса или фармаколошког одговора на терапијске интервенције. Идеални биомаркер карактеришу висока сензитивност, специфичност и предиктивна вредност.

У нашој студији, IL-6 се није показао као реалан предиктор морталитета, али је било разлике у дневним трендовима овог про- инфламаторног цитокина. Показан је тренд пада између првог и другог дана са статистички значајном разликом. Пад вредности IL-6 је још израженија другог дана код умрлих пацијената. У студији Miguel- Bayarri et al. (114) је показан сличан тренд пада IL-6 трећег и седмог дана, док је вредност IL-6 трећег дана значајна као зависна варијабла са OR-2,6 и AUC/ROC од 0,86. Pettila et al. (115) у свом истраживању наводе тренд пораста IL-6 код умрлих пацијената са сепсом, док тренд опада код преживелих особа. У тој студији, вредност IL-6 другог дана показује добру дискримативну снагу у предикцији хоспиталног морталитета са AUC (95%) од 0,79. Студије које су

прочавале појединачне вредности IL-6 наводе контрадикторне резултате. У закључку, чини се да IL-6 нема велики значај као предиктивни фактор за морталитет код пацијената са сепсом.

Када је у питању CRP, у нашем истраживању постоја је разлика између дневних трендова серумског нивоа између преживелих и умрлих, али без статистичке значајности. CRP није значајан предиктор исхода болести. Miguel-Bayarri et al. (114) наводе висок CRP код преживелих у првом дану, нижи у трећем дану и статистички нижем у седмом дану. Pettila et al. (115) су нашли вишу вредност CRP код преживелих у првом дану и умрлих у другом дану, али без статистичке значајности, док је предиктивна вредност према исходу ниска са AUC (95% CI) 0,35 и 0,53. Dervan et al. (116) наводе да CRP није добар предиктор исхода у првом дану, али има значајну јачину у предикцији морталитета у трећем дану са AUC 0,72. И велика студија из Португалије је нашла да је вредност CRP у трећем дану корисна у идентификацији ван- болничких инфекција и сепсе са лошим исходом. (117). Резултати многих студија наводе недостатак корелације CRP и исхода, и његову лошу предиктивну вредност у вези са морталитетом.

Површински молекул CD64 (енг. Cluster of differentiation- 64) је високо афинитетни имуноглобулински Fc гама рецептор тип 1. Он је маркер активације неутрофила или системског акутног инфламаторног одговора, у току 4-6 сати може порастати и 10 пута (118). Неутрофилни CD64 index је дизајниран тако, да је нормална инактивациона вредност $< 1,00$ док је код особа са документованом инфекцијом или сепсом $> 1,50$. У нашој студији, CD64 index се показао као најбољи предиктор исхода међу испитиваним биомаркерима сепсе, и да његова вредност првог дана има добру дискриминативну снагу у предикцији болничког морталитета. На cut-off вредности од 2,80, сензитивност износи 75%, а специфичност 65%.

Неколико студија, фокусираних на експресију CD64 на неутрофилима и исход критично оболелих пацијената, слажу се са нашим резултатима. Hsu et al. (119) су нашли да је CD64 експресија сигнификатно већа код умрлих, у односу на

преживеле и да AUC износи 0,70. Song et al. (120) наводе сличне резултате код пацијената са ДИК-ом, код којих је преживљавање у 28. дану, снажно повезано са експресијом CD64, док AUC износи 0,81.

У студији Cid et al. наведени су супротни резултати (121). Они су нашли да је CD64 index био већи у групи преживелих него у групи умрлих, док AUC износи 0,71 на cut-off вредности од 1,5 са сензитивношћу од 85% и ниском специфичношћу од 33%. Ови резултати се објашњавају инактивацијом неутрофила са смањењом фагоцитном активношћу, током компензаторног анти- инфламаторног одговора (CARS). Клинички, многи пацијенти са сепсом, показују знаке перзистентне инфламације и оштећења органа изазваних цитокинима, док су истовремено осетљиви за развој секундарних инфекција, те је уведен нови термин – комплексни имунски дисфункционални синдром (енгл. Complex immune dysfunction syndrome- CIDS) (122).

Сигурно је да постоји повећана потреба за разумевање молекулске основе акутне инфламације, која треба да доведе до идентификације потенцијалних маркера који ће омогућити праву и адекватну антиинфламаторну терапију. У том контексту, генетске студије асоцијације су веома значајне. Последњих година постоји тренд проучавања не само појединачних полиморфизма на одређеном генском локусу (candidate gene polymorphism), већ и више везаних полиморфизма у делу- блоку одређеног гена (haplotype tagging SNP). Данас се интензивно проучава дејство ових полиморфизма, не само на настанак одређеног протеина, већ и на целокупни процес експресије гена, укључујући и сложене процесе генске регулације на различитим нивоима.

10. ЗАКЉУЧЦИ

- Код испитаника у овом истраживању учесталост алелских облика гена за HMGB1 на позицији rs2249825 (C/G) била је статистички значајно повезана са врстом бактериског проуроковача. Код пацијената са Грам-позитивном сепсом најчешће је био GG генотип, док је код пацијената са мешовитом инфекцијом најчешћи био CG генотип
- Код испитаника у овом истраживању учесталост алелских облика гена за HMGB1 на позицији rs1045411 (G/A) била је статистички високо значајно повезана са врстом бактериског проуроковача. Код пацијената са Грам-позитивном сепсом најчешће је био AA генотип, док је код пацијената са мешовитом инфекцијом најчешћи био GA генотип
- Код испитаника у овом истраживању учесталост алелских облика гена за HMGB1 на позицији rs3742305 (G/C) била је статистички високо значајно повезана са врстом бактериског проуроковача. Код пацијената са Грам-позитивном сепсом најчешће је био CC генотип, док је код пацијената са мешовитом инфекцијом најчешћи био GC генотип
- Код испитаника у овом истраживању учесталост алелских облика гена за HMGB1 на позицији rs1060348 (C/T) била је статистички високо значајно повезана са основним обољењем које је довело до сепсе. Код пацијената са перитонитисом који је довео до сепсе најчешћи је био CC генотип, док су сви пацијенти са панкреатитисом који се компликовао сепсом имали CT генотип
- Код испитаника у овом истраживању учесталост алелских облика гена за HMGB1 на позицији rs1412125 (T/C) није била статистички

значајно повезана са врстом бактериског проуроковача, основним обољењем које је довело до сепсе и са исходом

- Код испитаника у овом истраживању учесталост дистрибуција алелских облика гена за HMGB1 на позицији rs17074615 (A/C) показала је да су сви пацијенти имали AA генотип
- Код испитаника у овом истраживању учесталост дистрибуција алелских облика гена за HMGB1 на позицији rs19299606 (C/T) показала је да су сви пацијенти имали CC генотип
- Код испитаника у овом истраживању учесталост дистрибуција алелских облика гена за HMGB1 на позицији rs4540927 (G/A) показала је да су сви пацијенти имали GG генотип
- Код испитаника у овом истраживању CD64 index је показао добру дискриминациону снагу у предикцији болничког морталитета, за разлику од IL-6 и CRP

ЛИТЕРАТУРА:

1. Lin MT, Albertson TE. Genomic polymorphisms in sepsis. *Crit Care Med* 2004; 32:569-79
2. Tumanger H, Jamil KF. Contribution of genes polymorphism to susceptibility and outcome of sepsis. *The Egyptian Journal of Medical Human Genetics* 2010; 11: 97-103
3. Dhas BB, Ashimi H, Bhat BV. Sepsis genomics: stepping forward toward sepsis prevention? *International Journal of Advanced Medical Research* 2014; 1(1): 8-15
4. Angus DC, van der Poll T. Severe sepsis and septic shock. *N Engl J Med* 2013; 369(9): 840- 51
5. Vincent JL, Rello J, Marshall J et al. EPIC II Group of Investigators: International study of the prevalence and outcomes of infection in intensive care units. *JAMA* 2009; 302: 2323-9
6. Balk RA. Systemic inflammatory response syndrome (SIRS). *Virulence* 2014; 5(1): 20-6
7. de Jong HK, van der Poll T, Wiersinga WJ. The systemic pro- inflammatory response in sepsis. *J Innate Immun* 2010; 2(5): 422-30
8. Singh S, Evans TW. Organ dysfunction during sepsis. *Intensive Care Med* 2006; 32: 349-60
9. Mayr FB, Yende S, Angus D. Epidemiology of severe sepsis. *Virulence* 2014; 5(1): 4-11
10. Surbatovic M, Veljovic M, Jevdjic J, Popovic N, Djordjevic D, Radakovic S. Immunoinflammatory response in critically ill patients: severe sepsis and/or trauma. *Mediators of Inflammation* 2013; 2013: article ID 362793, 11 pages
11. Pape HC, Tsukamoto T, Kobbe P, Tarkin S, Katsoulis S, Peityman. Assessment of the clinical course with inflammatory parameters. *Injury* 2007; 38(12): 1358-64

12. Lord JM, Midwinter MJ, Cnen YF, Beli A, Brochi K, Kovacs EJ et al. The systemic immune response to trauma: an overview of pathophysiology and treatment. *Lancet* 2014; 384: 1455-65
13. ACCP/SCCM Consensus Conference. Definitions for sepsis and organ failure and guidelines for use of innovative therapies in sepsis. *Crit Care Med* 1992; 20(6):864-74
14. Abraham E, Matthay MA, Dinarello CA, Vincent JL, Cohen J, Opal SM et al.: Consensus conference definitions for sepsis, septic shock, acute lung injury and acute respiratory distress syndrome: Time for a reevaluation. *Crit Care Med* 2000; 28(1): 232-5
15. Levy MM, Fink MP, Marshall JC, Abraham E, Angus D, Cook D, Cohen J, Opal SM, Vincent JL, Ramsay G. 2001 SCCM/ESICM/ACCP/ATS/SIS International Sepsis Definitions Conference. *Crit Care Med* 2003; 31:1250-56
16. Vincent JL, de Mandonca A, Cantraine F, Moreno R, Takala J, Suter PM et al. Use of the SOFA score to assess the incidence of organ dysfunction/failure in intensive care units: results of multicenter, prospective study. Working group on „sepsis-related problems“ of the European Society of Intensive Care Medicine. *Crit Care Med* 1998; 26: 1793-800
17. Opal SM. Concept of PIRO as a new conceptual framework to understand sepsis. *Pediatr Crit Care Med* 2005; 6(Suppl.): S55-S60
18. Caura CJ. „Merinoff symposium 2010: sepsis“- speaking with one voice. *Mol Med* 2011; 17: 2-3
19. Vincet JL, Opal SM, Marshall JC, Tracey KJ. Sepsis definition: time for change. *Lancet* 2013; 381: 774-5
20. Dellinger RP, Levy MM, Rhodes A et al. "Surviving Sepsis Campaign“: International Guidelines for Management of Severe Sepsis and Septic Shock: 2012. *Crit Care Med* 2013; 41(2): 580-637
21. Baker SP, O'Neill B. Injury severity score: an update. *J Trauma* 1976; 16(11): 882-885
22. Đukić V. Skor sistemi u traumi In: Popović N, editor. *Anestezija u trauma*. Beograd: Wind press; 2010. p. 69-84 (Serbian)

23. Kumar S, Ingle H, Prasad DV, Kumar H. Recognition of bacterial infection by innate immune sensors. *Clinical Reviews in Microbiology* 2013; 39(3): 229-46
24. Wiersinga WJ, Leopold SJ, Cranendonk DR, van der Poll T. Host innate immune responses to sepsis. *Virulence* 2014; 5(1): 36-44
25. Klune JR, Dhupar R, Cardinal J, Billiard TR, Tsung A. HMGB 1: Endogenous Danger Signaling. *Mol Med* 2008; 14(7-8): 476-84
26. Hirsinger S, Simmen HP, Werner C, Wanner GA, Rittirsch D. Danger signals activating the immune response after trauma. *Mediators of Inflammation* 2012; 2012: article ID 315941, 10 pages
27. Kawai T, Akira S. The role of pattern- recognition receptors in innate immunity: update on Toll- like receptors. *Nat Immunol* 2010; 11: 373-84
28. Reinhart K, Bauer M, Riedemann NC, Hartog CH. New approaches to sepsis: molecular diagnostics and biomarkers. *Clin Microbiol Rev* 2012; 25(4): 609-34
29. Samraj RS, Zingarelli B, Wong HR. Role of biomarkers in sepsis care. *Shock* 2013; 40(5): 358-65
30. Peltz ED, Moore EE, Eckels PC, Damle SS, Tsuruta Y, Jonson JL et al. HMGB1 is markedly elevated within 6 hours of mechanical trauma in humans. *Shock* 2009; 32: 17-22
31. Wang XW, Karki A, Zhao XJ, Xiang XY, Lu ZQ. High plasma levels of high mobility group box 1 is associated with the risk of sepsis in severe blunt chest trauma patients. *Journal of Cardiothoracic Surgery* 2014; 9: 133
32. Pugin J. How tissue injury alarms the immune system and causes a systemic inflammatory response syndrome. *Annals of Intensive Care* 2012; 2(27): 1-6
33. Abbas AK, Lichtman AH, Pillai S. Properties and overview of immune response In: Abbas AK, editor. *Cellular and Molecular Immunology* 7th ed. Philadelphia USA: Elsevier Saunders; 2012. p. 1-17
34. Burkovskiy I, Sardinha J, Zhou J, Lehmann C. Cytokine release in sepsis. *Advances in bioscience and biotechnology* 2013; 4: 860-5

35. Harris HE, Andersson U, Pisetsky DS. HMGB: a multifunctional alarmin driving autoimmune and inflammatory disease. *Nat Rev Rheumatol* 2012; 8: 195- 202
36. Fink MP. Bench- to- bedside review: High- mobility group box 1 and critical illness. *Critical Care* 2007; 11: 229
37. Klune JR, Dhupar R, Cardinal J, Billiar TR, Tsung A. HMGB1- endogenous danger signaling. *Mol Med* 2008; 14(7-8): 476-84
38. Lee SA, Kwak MS, Kim S, Shin JS. The role of high mobility group box 1 in innate immunity. *Yonsei Med J* 2014; 55(5): 1165-76
39. Hoppe G, Talcott KE, Bhattacharya SK, Crabb JW, sears JE. Molecular basis for the redox control of nuclear transport of the structural chromatin protein HMGB1. *Exp Cell Res* 2006; 312: 3526-38
40. Choi AMK, Ryter SW, Levine B. Autophagy in human health and disease. *N Eng J Med* 2013; 368: 651-62
41. Lu B, Wang H, Andersson U, Tracey KJ. Regulation of HMGB1 release by inflammasomes. *Protein Cell* 2013; 4(3): 163-7
42. Lu B, Nakamura T, Inouye K, Li J, Tang Y, Lundback P et al. Novel role of PKR in inflammasome activation and HMGB1 release. *Nature* 2012; 488: 670-4
43. Andersson U, Antonie DJ, Tracey KJ. The functions of HMGB1 depend on molecular localization and post- translational modification. *J Intern Med* 2014; 276: 420-24
44. Yanai H, Taniguchi T. Nucleic acid sensing and beyond: virtues and vices of HMGB1. *J Intern Med* 2014; 276: 444-53
45. Wang H, Bloom O, Zhang M, Vishnubhakat JM, Ombrelino M, Che J et al. HMG-1 as a late mediator of endotoxin lethality in mice. *Science* 1999; 285: 248-51
46. Wang H, Yang H, Czura CJ, Sama AE, Tracey KJ. HMGB1 as a late mediator of lethal systemic inflammation. *Am J Res Crit Care Med* 2001; 164: 1768-73
47. Tsung A, Klune JR, Zhang X et al. HMGB1 release induced by liver ischemia involves Toll- like receptor 4 dependent reactive oxygen species production and calcium- mediated signaling. *J Exp Med* 2007; 204: 2913-23

48. Magna M, Pisetsky DS. The role of HMGB1 in the pathogenesis of inflammatory and autoimmune diseases. *Mol Med* 2014; 20: 138-46
49. Tsung A, Tohme S, Biliar TR. High mobility group box-1 in sterile inflammation. *Journal of Internal medicine* 2014; 276; 425-43
50. Wang H, Ward MF, Sama AE. Targeting HMGB1 in the treatment of sepsis. *Expert Opin Ther Targets* 2014; 18(3): 257-68
51. Kang R, Zhang Q, Zeh III HJ et al. HMGB1 in cancer: good, bad or both. *Clin Cancer Res* 2013; 19: 4046-57
52. Huang L, Yao Y, Sheng Z. Novel insights for high mobility group box 1 protein-mediated cellular immune response in sepsis: a systemic review. *World J Emerg Med* 2012; 3(3): 165-71
53. Yang H, Antoine DJ, Andersson U, Tracey KJ. The many faces of HMGB1: molecular, structure- functional activity in inflammation, apoptosis and chemotaxis. *Journal of Leukocyte Biology* 2013; 93: 1-9
54. Bae JS. Role of high mobility group box 1 in inflammatory disease: focus on sepsis. *Arch Pharm Res* 2012; 35(9): 1511-23
55. Antonie DJ, Harris HE, Andersson U, Tracey KJ, Bianchi M. A systemic nomenclature for the redox states of high mobility group box (HMGB) proteins. *Mol Med* 2014; 20: 135-7
56. Oh YJ et al. HMGB1 is phosphorylated by classical protein kinase C and is secreted by a calcium-dependent mechanism. *J Immunol* 2009; 182(9): 5800-9
57. Lu B, Antoine DJ, Kwan K, Lundback P, Wahamaa H, Schierbeck H. JAK/STAT1 signaling promotes HMGB1 hyperacetylation and nuclear translocation. *Proc Natl Acad Sci USA* 2014; 111: 3068-73
58. Kim JJ, Jo EK. NLRP3 Inflammasome and host protection against bacterial infection. *J Korean Med Sci* 2013; 28: 1415-23
59. Lu B, Nakamura T, Inouye K, Li J, Tang Y, Lundback P et al. Novel role of PKR in inflammasome activation and HMGB1 release. *Nature* 2012; 488: 670-4

60. Hagar JA, Powell DA, Aechoui Y et al. Cytoplasmic LPS activates caspase-11: implication in TLR- independent endotoxic shock. *Science* 2013; 341: 1250-3
61. Kayagaki N, Wong MT, Stove IB et al. Noncanonical inflammasome activation by intracellular LPS independent of TLR4. *Science* 2013; 341: 1246-9
62. Mayr FB, Yende S, Linde-Zwirrble W et al. Infection rate and organ dysfunction risk as explanations for racial differences in severe sepsis. *JAMA* 2010; 303: 2495-503
63. Stearns-Kurosawa DJ, Osuchowski MF, Valentine C, Kurosawa S, Remick DG. The pathogenesis of sepsis. *Annu Rev Pathol* 2011; 6: 19-48
64. King EG, Bauya GJ, Mella JR, Remick D. Pathophysiologic mechanisms in sepsis shock. *Laboratory Investigation* 2014; 94: 4-12
65. Meyiani F, Delabranche X, Asfar P, Toti F. Bench-to-bedside review: circulating microparticles- a new player in sepsis? *Crit Care* 2010; 14: 236
66. Danese S, Vetrano S, Zhang L, Poplis VA, Castellino F. The protein C pathway in tissue inflammation and injury: pathogenic role and therapeutic implications. *Blood* 2010; 115: 1121-30
67. Backer DD, Cortes DO, Donadello K, Vincet JL. Pathophysiology of microcirculatory dysfunction and the pathogenesis of septic shock. *Virulence* 2014; 5(1): 73-9
68. Singer M. The role of mitochondrial dysfunction in sepsis- induced multi- failure. *Virulence* 2014; 5(1): 66-72
69. Van der Poll T, van Zoelen MAD, Wiersinga WJ. Regulation of pro- and anti-inflammatory host responses. *Contrib Microbiol* 2011; 17: 125-36
70. Hotchkiss RS, Monneret G, Payen D. Immunosuppression in sepsis: a novel understanding of the disorder and a new therapeutic approach. *Lancet Infect Dis* 2013; 13: 260-68
71. Chen X, Yin Y, Zhang J. Sepsis and immune response. *World J Emerg Med* 2011; 2(2): 88-92
72. Boomer et al. Immunosuppression in patients who die of sepsis and multiple organ failure. *JAMA* 2011; 306: 2594- 605

73. Hotchkiss RS, Monneret G, Payen D. Sepsis- induced immunosuppression: from cellular dysfunction to immunotherapy. *Nature Reviews Immunology* 2013; 13: 862-74
74. Andersson U, Tracey KJ. Reflex principles of immunological homeostasis. *Annu Rev Immunol* 2012; 30: 313-35
75. Rosas- Ballina M, Olofsson PS, Ochani M et al. Acetylcholine- synthesizing T cells relay neural signals in a vagus nerve circuit. *Science* 2011; 334: 98-101
76. Xiao W, Mindrinos MN, Seok J, Cuschieri J, Cuenca AG, Gao H et al. A genomic storm in critically injured humans. *J Exp Med* 2011; 208: 2581-90
77. Asehnoune K, Roquilly A, Abraham E. Innate immune dysfunction in trauma patients. *Anesthesiology* 2012; 117: 411-6
78. Lukaszewicz AC, Faivre V, Villa F, Payen D. Anti- inflammatory profile of circulating immune cells after surgery for seizure. *Minevra Anesthesiol* 2010; 76: 477-84
79. Brajušković G. Regulacija ekspresije gena kod eukariota In: Brajušković G editor. *Molekularna Biologija 2. Savremena administracija Beograd*; 2012: 155-202
80. Lieberman M, Marks AD, Smith C. Ekspresija gena i sinteza proteina In: Marksove osnove medicinske biohemije 1th ed. *Data status, Beograd, Srbija* 2008: 129-215
81. International Human Genome Sequencing Consortium (IHGSC): Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature* 2001; 409: 860-921
82. Chakravarthi A. single nucleotide polymorphisms...to a future of genetic medicine. *Nature* 2001; 409: 822-3
83. Sorensen TI, Nielsen GG, Andersen PK, Teasdale TW. Genetic and environmental influences on premature death in adult adoptees. *N Engl J Med* 1988; 318: 727-32
84. Westendorp RG, Langermans JA, de Bel CE. Release of tumor necrosis factor: an innate host characteristic that may contribute to the outcome of meningococcal disease. *J Infect Dis* 1995; 171: 1057-60
85. Kellum JA, Angus DC. Genetic variation and risk of sepsis. *Minerva Anesthesiol* 2003; 69: 245-53

86. Sutherland AM, Walley KR. Bench-to-bedside review: association of genetic variation with sepsis. *Crit Care* 2009; 13: 210-9
87. Kornbilt B, Munthe-Fog L, Petersen L, et al. The genetic variation of the human HMGB1 gene. *Tissue Antigens* 2007; 70: 151-56
88. Mailly F, Berube G, Harada R, Mao PL, Phillips S, Nepveu A. The human Cut homeodomomain protein can repress gene expression by two distinct mechanisms: active repression and competition for binding site occupancy. *Mol Cell Biol* 1996; 16: 5346-57
89. Weston K. Myb proteins in life, death and differentiation. *Curr Opin Genet Dev* 1998; 335: 835-7
90. Kornbilt B, Munthe-Fog L, Madsen HO, et al. Association of HMGB1 polymorphisms with outcome in patients with systemic inflammatory response syndrome. *Critical Care* 2008; 12: R83
91. Zeng L, Zhang A, Gu W, Chen K, Jiang D et al. Clinical relevance of single nucleotide polymorphisms of the high mobility group box 1 protein gene in patients with major trauma in Southwest China. *Surgery* 2012; 151; 427-36
92. Deng CQ, Deng GH, Wang YM. HMBG1 gene polymorphisms in patients with chronic hepatitis B virus infection. *World Journal Gastroenterology* 2013; 19(31): 5144-49
93. Kornbilt B, Masmus T, Petersen SL, et al. Association of HMGB1 polymorphisms with outcome after allogeneic hematopoietic cell transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant.* 2010; 16: 239-52
94. Yao Y, Guo D, Yang S, Jin Y, He L, Chen J et al. HMGB1 gene polymorphisms is associated with hypertenyon in Han Chinese population. *Clin Exp Hypertens* 2015; DOI 10.3109/10641963.2014.933963
95. Supic G, Kozomara R, Zeljic K, Stanimirovic D, Magic M, Surbatovic M, Jovic N, Magic Z. HMGB1 genetic polymorphisms in oral squamous cell carcinoma and oral lichen planus patients. *Oral Diseases* 2015; doi: 10.1111/odi.2318

96. Ulloa L, Messmer D. High- mobility group box 1 (HMGB1) protein: friend and foe. *Cytokine Growth Factor Rev* 2006; 17: 189-20
97. Bustin M. Regulation of DNA- dependent activities by functional motifs of the high- mobility-group chromosomal proteins. *Mol Cell Biol* 1999; 19: 5237-46
98. Nagatani G, Nomoto M, Takano H et al. Transcriptional activation of the human HMGB1 gene in cisplatin- resistant human cancer cells. *Cancer Res* 2001; 61: 1592-7
99. Uramoto h, Iyumi H, Nagatani G et al. Physical interaction of tumor suppressor p53/p73 with CCAAT- binding transcripyion factor 2 (CFT2) and differential regulation of human high-mobility group 1 (HMG1) gene expression. *Biochem J* 2003; 371: 301-10
100. Brun-Buisson C, Doyon F, Carlet J, et al. Bacteremia and severe sepsis in adults: A multicenterprospective survey in ICUs and wards of 24 hospitals. French Bacteremia-Sepsis Study Group. *Am JResp Crit Care Med* 1996;154:617-624
101. Shorr AF, Tabak YP, Killian AD, et al. Healthcare-associated bloodstream infection: A distinct entity? Insights from a large U.S. database. *Crit Care Med* 2006;34:2588-2595
102. Wang HE, Shapiro NI, Angus DC, Yealy DM. National estimates of severe sepsis in United States emergency departments. *Crit Care Med* 2007; 35(8): 1928-36
103. Tenner S, Baillie J, de Witt J, Vege SS. American College of gastroenterology guideline: management of acute pancreatitis. *Am J Gastroenterol* 2013; 108: 1400-15
104. Martin G, Mannino DM, Eaton S, Moss M. The epidemiology of sepsis in the United States from 1979 through 2000. *N Eng J Med* 2003; 348(16): 1546-54
105. Surbatovic M, Grujic K, Cikota B et al. Polymorphisms of genes encoding tumor necrosis factor-alpha, interleukin-10, cluster of differentiation-14 and interleukin-1ra in critically ill patients. *Journal of Critical Care* 2010; 25: 542e1-542e8
106. Gerred P, Strom JJ, Quist L, Taaning E, Madsen HO. Association of mannose-binding lectin polymorphisms with sepsis and fatal outcome, in patients with systemic inflammatory response syndrome. *Journal of Inf Dis* 2003; 188: 1394-403

107. Unterwalder N, Meisel C, Savvatis K, Hammoud B, Fotopoulous C, Volk HD. High-mobility group box-1 protein serum levels do not reflect monocytic function in patients with sepsis- induced immunosuppression. *Mediator of Inflammation* 2010; 2010; ID 745724
108. 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: 1046-53
109. Eskici ZM, Acikgoz S, Piskin N, Mungan G, Can M, Guven B, Kokturk F. High mobility group B1 levels in sepsis and disseminated intravascular coagulation. *Acta Biochimica Polonica* 2012; 59(4): 561-6
110. Papachristou GI, Clermont G, Sharma A et al. Risk and markers of severe acute pancreatitis. *Gastroenterol Clin N Am* 2007; 36: 277-96
111. Zhang DL, Zheng HM, Yu BJ et al. Association of polymorphisms of IL and CD14 genes with acute severe pancreatitis and septic shock. *World J Gastroenterol* 2005; 11: 4409-13
112. Lin Y, Lin LJ, Jin Y, Cao Y, Zhang Y, Zheng CQ et al. Correlation between serum levels of high mobility group box-1 protein and pancreatitis: a meta- analysis. *BioMed research International* 2015; 2015: article ID 430185, 10 pages
113. Tang D, Lotze M, Zen HJ, Kang R. Targeting HMGB1 in acute pancreatitis. *Austin J Surg* 2014; 1(9): 1045-9
114. Miguel-Bayarri V, Casanoves-Laparra EB, Pallas-BeneytoL, Sancho-Chinesta S, Martin-Osorio LF, Tormo-CalandinC, et al. Prognostic value of the biomarkers procalcitonin,interleukin-6 and C-reactive protein in severe sepsis. *MedIntensiva* 2012; 36(8): 556–62
115. Pettila V, Hynninen M, Takkunen O, Kuusela P, ValtonenM. Predictive value of procalcitonin and interleukin 6 in critically ill patients with suspected sepsis. *Intensive Care Med* 2002; 28(9): 1220–5

116. Devran O, Karakurt Z, Adiguzel N, Gungor G, Mocin YO, Balci MK, et al. C-reactive protein as a predictor of mortality in patients affected with severe sepsis in intensive care unit. *Multidiscip Respir Med* 2012; 7(1): 47–52
117. Pova P, Teixeira-Pinto AM, Carneiro AH for the Portuguese Community-Acquired Sepsis Study Group (SACiUCI). C-reactive protein, an early marker of community-acquired sepsis resolution: a multi-center prospective observational study. *Crit Care* 2011; 15: R169
118. Hoffmann J. Neutrophil CD64 as a sepsis biomarker. *Biochem Med* 2011; 21(3): 282-90
119. Hsu KH, Chan MC, Wang JM, Lin LY, Wu CL. Comparison of Fcγ receptor expression on neutrophils with procalcitonin for the diagnosis of sepsis in critically ill patients. *Respirology* 2011; 16(1): 152–60
120. Song SH, Kim HK, Park MH, Cho HI. Neutrophil CD64 expression is associated with severity and prognosis of disseminated intravascular coagulation. *Thromb Res* 2008; 121(4): 499–507
121. Cid J, Garcia-Pardo G, Aguinaco R, Sanchez R, Llorente A. Neutrophil CD64: diagnostic accuracy and prognostic value in patients presenting to the emergency department. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2011; 30(7): 845–52
122. Morris AC, Simpson AJ, Walsh TS. Hyperinflammation and mediators of immune suppression in critical illness. In: Vincent JL, editor. *Annual update in intensive care and emergency medicine*. Berlin Heidelberg: Springer-Verlag; 2013, pp. 135–44