

Medicinski fakultet Vojnomedicinske akademije

Univerzitet odbrane

Potpukovnik asistent dr med. Ivo Udovičić

**ZNAČAJ SUPRESORSKIH ĆELIJA MIJELOIDNOG
POREKLA U SISTEMSKOJ CIRKULACIJI PACIJENATA SA
PERITONITISOM, PANKREATITISOM I TRAUMOM
KOMPLIKOVANIH SEPSOM**

Doktorska disertacija

Beograd, 2018. godine

SADRŽAJ

SPISAK SKRAĆENICA	4
1. UVOD.....	11
1.1 Definicije sepse	11
1.1.1 Nova definicija sepse – SEPSA-3	14
1.2 Epidemiologija sepse.....	18
1.3 Patofiziologija sepse – poremećaj imunske homeostaze u sepsi.....	19
1.3.1 Proinflamatorni i antiinflamatorni citokini u sepsi.....	20
1.3.2 Imunosupresija u sepsi.....	24
1.3.3 Celularni odgovor u sepsi	25
1.3.4 Supresorske ćelije u sepsi	29
1.3.4.1 Regulatorne T-ćelije.....	29
1.3.4.2 Supresorske ćelije mijeloidnog porekla (MDSC).....	30
1.4 Sepsa kao hronična kritična bolest	39
1.4.1 Sindrom perzistentne inflamacije, imunosupresije i katabolizma (PICS).....	39
2. HIPOTEZA I CILJEVI ISTRAŽIVANJA.....	44
2.1 Hipoteza	44
2.2 Ciljevi istraživanja.....	44
3. ISPITANICI I METODE	45
3.1 Pacijenti i zdrave kontrolne osobe	45
3.2 Uzorkovanje i analiza.....	46
3.3 Imunofenotipska analiza ćelija.....	46
3.4 Statistička analiza.....	47
4. REZULTATI.....	48

4.1 Detekcija subpopulacija MDSC	48
4.2 Učestalost i apsolutni brojevi PMN-MDSC i M-MDSC veći su kod umrlih	52
4.3 Obe glavne subpopulacije MDSC značajno se akumuliraju u Gram-pozitivnoj sepsi ..	60
4.4 Odnosi neutrofila i PMN-MDSC (Ne/PMN-MDSC) i monocita i M-MDSC (Mo/M-MDSC) u sepsi prema prirodi bakterijemije	68
4.5 Klinička tačnost odnosa Ne/PMN-MDSC i Mo/M-MDSC u predviđanju prirode bakterijemije i ishoda	70
4.6 Nije nađena povezanost osnovnih uzroka sekundarne sepse sa akumulacijom MDSC.	77
5. DISKUSIJA	78
5.1 Detekcija PMN-MDSC i M-MDSC	78
5.2 Učestalost i apsolutni brojevi PMN-MDSC i M-MDSC koreliraju sa smrtnim ishodom	81
5.3 Obe glavne subpopulacije MDSC značajno se akumuliraju u Gram-pozitivnoj sepsi ..	85
5.4 Odnosi Ne/PMN-MDSC i Mo/M-MDSC u predikciji prirode bakterijemije i ishoda...	87
5.5 Imunomodulatorna terapija sepse.....	90
6. ZAKLJUČAK	92
7. LITERATURA	93

SPISAK SKRAĆENICA

ADAM17 (*engl. A Disintegrin And Metalloproteinase, metalloproteinase domain 17*) – protein koji sadrži domene disintegrina i metaloproteinaza

AIS (*engl. Abbreviated Injury Scale*) – skraćena skala povrede

AKT – familija serin/treonin-specifičnih proteinskih kinaza

APACHE (*engl. Acute Physiology And Chronic Health Evaluation*) – akutna fiziološka i hronična procena zdravstvenog stanja

aPTT (*engl. Activated Partial Thromboplastin Time*) – aktivirano parcijalno tromboplastinsko vreme

ARG - arginaza

ASC transporter (*engl. Alanine-Serine-Cysteine transporter*) – transporter amino-kiselina alanina, serina i cisteina

AUC (*engl. Area Under the Curve*) – površina ispod ROC krive, najopštija mera dijagnostičke tačnosti testa

C/EBP β (*engl. CCAAT/Enhancer-Binding Protein Beta*) – CCAAT/pojačivač-vezujući protein beta

CARS (*engl. Compensatory Anti-inflammatory Response Syndrome*) – sindrom kompenzatornog antiinflamatornog odgovora

CCR7 (*engl. C-C Chemokine Receptor type 7*) – receptor 7 za podfamiliju hemokina sa CC strukturnim motivom

CD (*engl. Cluster of Differentiation*) – diferencijacijska grupa molekula; površinski molekuli ispoljeni na ćelijama imunskog sistema i označeni CD brojem

cDC (*engl. Conventional Dendritic Cells*) – konvencionalne dendritske ćelije

CI (*engl. Confidence Interval*) – interval pouzdanosti ili poverenja

CCL3/5 (*engl. CC Motif Chemokine Ligand 3/5*) – CC ligand 3 ili 5 (podfamilija hemokina sa CC strukturnim motivom)

CMV – Citomegalovirus

CTLA-4 (*engl. Cytotoxic T Lymphocyte-associated Antigen-4*) – antigen 4 asociran sa citotoksičnim T-limfocitima

CXCL12 (*engl. CXC Motif Chemokine Ligand 12*) – CXC ligand 12 (podfamilija hemokina sa CXC strukturnim motivom)

CXCR4 (*engl. CXC Chemokine Receptor type 4*) – receptor 4 za podfamiliju hemokina sa CXC strukturnim motivom; receptor za CXCL12

DAMP (*engl. Damage-Associated Molecular Pattern*) – molekularni obrasci oštećenja

DC – dendritske ćelije

EBV – Epstein-Barr virus

EDTA – etilen-diamin tetraacetna kiselina

eMDSC (*engl. Early-stage Myeloid-Derived Suppressor Cells*) – rane supresorske ćelije mijeloidnog porekla

FDC – folikulske dendritske ćelije

FLT3L (*engl. FMS-Like Tyrosine Kinase 3 Ligand*) – ligand FMS-u slične tirozin-kinaze 3

Foxp3 (*engl. Forkhead Box P3*) – transkripcioni faktor iz *forkhead* familije koji je eksprimiran u regulatornim T-ćelijama

GALT (*engl. Gut-Associated Lymphoid Tissue*) – limfno tkivo gastrointestinalnog trakta

G-CSF (*engl. Granulocyte Colony-Stimulating Factor*) – faktor stimulacije kolonija granulocita

GM-CSF (*engl. Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor*) – faktor stimulacije kolonija granulocita i makrofaga/monocita

GNB – Gram-negativna bakterijemija

GPB – Gram-pozitivna bakterijemija

HDN(G) (*engl. High-Density Neutrophil (Granulocyte)*) – neutrofil (granulocit) velike gustine

HIF-1 α (*engl. Hypoxia-Inducible Factor 1-Alpha*) – hipoksijom inducibilni faktor 1 α (subjedinica heterodimernog transkripcionog faktora HIF-1)

HJIL – hirurška jedinica intenzivnog lečenja

HLA-DR (*engl. Human Leukocyte Antigen-D Related*) – humani leukocitni antigen-DR

HSV – Herpes Simplex Virus

IDC – interdigitalne dendritske ćelije

IFN α,γ – interferon- α , interferon- γ

IL – interleukin

IL-12 p40 – interleukin-12 subjedinica p40

IL-1Ra (*engl. Interleukin-1 Receptor Antagonist*) – antagonist receptora interleukina-1

IL-7R α (*engl. Interleukin-7 Receptor Subunit Alpha*) – subjedinica α receptora interleukina-7

iNOS (*engl. Inducible Nitric Oxide Synthase*) – inducibilna sintaza azot-monoksida

INR (*engl. International Normalized Ratio*) – internacionalni normalizovani odnos, standardizovana vrednost protrombinskog vremena bez obzira na metodu merenja

IRAK3 (*engl. Interleukin-1 Receptor-Associated Kinase 3*) - kinaza 3 asocirana s receptorom za interleukin-1

ISS (*engl. Injury Severity Score*) – skor težine povrede

Jak – Janus kinaze, familija membranskih tirozin kinaza

JIL – jedinica intenzivnog lečenja

KHCO₃ – kalijum bikarbonat

LDN(G) (*engl. Low-Density Neutrophil (Granulocyte)*) – neutrofil (granulocit) male gustine

LOX-1 (*engl. Lectin-type Oxidized LDL Receptor-1*) – lektinu sličan receptor oksidisanog LDL-a 1

LPS – lipopolisaharid

MAP (*engl. Mean Arterial Pressure*) – srednji arterijski pritisak

MAPK (*engl. Mitogen-Activated Protein Kinase*) – mitogenom aktivirana proteinska kinaza

M-CSF (*engl. Macrophage Colony-Stimulating Factor*) – faktor stimulacije kolonija makrofaga/monocita

MDSC (*engl. Myeloid-Derived Suppressor Cell*) – supresorska ćelija mijeloidnog porekla

MHC (*engl. Major Histocompatibility Complex*) – glavni kompleks gena tkivne podudarnosti

miR (*engl. MicroRNA*) – mikro RNK

M-MDSC (*engl. Monocytic Myeloid-Derived Suppressor Cells*) – monocitne supresorske ćelije mijeloidnog porekla

MMP – matriks metaloproteinaza

MODS (*engl. Multiple Organ Dysfunction Syndrome*) – sindrom multiple organske disfunkcije

MOF (*engl. Multiple Organ Failure*) – multipla organska insuficijencija

MRSA – meticilin-rezistentni *Staphylococcus aureus*

mTOR (*engl. Mammalian Target Of Rapamycin*) – intracelularna serin/treonin kinaza

NFI-A (*engl. Nuclear Factor I A*) – nuklearni faktor I A, gen koji kodira transkripcijski faktor iz NF1 proteinske familije

NF- κ B (*engl. Nuclear Factor Kappa light chain enhancer of activated B cells*) – transkripcijski faktor nuklearni faktor kapa B

NH₄Cl – amonijum hlorid

NK (*engl. Natural Killer*) – urođenoubilačke ćelije

NLR (*engl. Nucleotide oligomerization domain (NOD)-Like Receptor*) – receptor sličan NOD-u, vrsta citoplazmatskih receptora za prepoznavanje obrazaca

NO – azot monoksid

NOX2 (*engl. NADPH oxidase 2*) – NADPH oksidaza 2

OR (*engl. Odds Ratio*) – odnos šansi

PAMP (*engl. Pathogen-Associated Molecular Pattern*) – molekularni obrasci patogena

PBMC (*engl. Peripheral Blood Mononuclear Cell*) – mononuklearne ćelije periferne krvi

PD-1 (*engl. Programmed Death-1*) – protein programirane ćelijske smrti 1

pDC – plazmacitoidne dendritske ćelije

PD-L1 (*engl. Programmed Death-Ligand 1*) – ligand za PD-1

PGE2 – prostaglandin E2

PI3K – fosfatidil-inozitol-3 kinaza

PICS (*engl. Persistent Inflammation, Immunosuppression and Catabolism Syndrome*) – sindrom perzistentne inflamacije, imunosupresije i katabolizma

PMN-MDSC (*engl. Polymorphonuclear Myeloid-Derived Suppressor Cells*) – polimorfonuklearne supresorske ćelije mijeloidnog porekla

Poli – polimikrobna bakterijemija

qSOFA (*engl. Quick SOFA*) – brzi SOFA skor

RLR (*engl. Retinoic acid-Inducible Gene-1 (RIG)-Like Receptors*) – receptori slični RIG-u, vrsta citoplazmatskih receptora za prepoznavanje obrazaca

RNS (*engl. Reactive Nitrogen Species*) – reaktivne vrste azota

ROC (*engl. Receiver Operating Characteristic*) – karakteristična kriva prijelnika/operatera; analiza ROC krive koristi se u medicini za procenu efikasnosti dijagnostičkih testova

ROS (*engl. Reactive Oxygen Species*) – reaktivne vrste kiseonika

SAPS (*engl. Simplified Acute Physiology Score*) – pojednostavljeni akutni fiziološki skor

SCF (*engl. Stem-Cell Factor*) – faktor stem ćelija

SD – standardna devijacija

SIRS (*engl. Systemic Inflammatory Response Syndrome*) – sindrom sistemskog inflamatornog odgovora

SOFA skor (*engl. Sequential [Sepsis-related] Organ Failure Assessment*) – skor za procenu sekvencijalne (sa sepsom povezane) organske insuficijencije

SPSS (*engl. Statistical Package for the Social Sciences*) – statistički pakete za društvene nauke, statistički softver prvobitno korišćen u društvenim naukama

SSC (*engl. Surviving Sepsis Campaign*) – Kampanja za preživljavanje sepe

STAT (*engl. Signal Transducer and Activator of Transcription*) – prenosnik signala i aktivator transkripcije

sTNFR (*engl. Soluble Tumor Necrosis Factor Receptor*) – solubilni receptor faktora nekroze tumora

TAN (*engl. Tumor-Associated Neutrophil*) – tumor-asocirani neutrofil

TCR (*engl. T-Cell Receptor*) – T-ćelijski receptor

TGF- β (*engl. Transforming Growth Factor Beta*) – transformišući faktor rasta beta

TLR (*engl. Toll-Like Receptor*) – receptor sličan Toll-u (homologan proteinu vinske mušice nazvanom Toll); podvrsta transmembranskih receptora za prepoznavanje obrazaca

TNF α (*engl. Tumor Necrosis Factor Alpha*) – faktor nekroze tumora alfa

VEGF (*engl. Vascular Endothelial Growth Factor*) – faktor rasta vaskularnog endotela

VMA – Vojnomedicinska akademija

1. UVOD

Uprkos napretku u zbrinjavanju obolelih od sepse u poslednje dve decenije, sepsa i dalje predstavlja ogroman problem javnog zdravlja širom sveta. ¹ Ona je vodeći uzrok morbiditeta i mortaliteta u jedinicama intenzivnog lečenja (JIL) i predstavlja veliki ekonomski teret kako za zdravstvene sisteme, tako i za društvo u celini. Administrativni podaci iz SAD za 2013. pokazuju da je 'septikemija' najskuplje medicinsko stanje lečeno u bolnicama, sa godišnjim troškom lečenja od 23,7 milijardi dolara ili 6,2% od ukupnog troška svih hospitalizacija u SAD. ²

U cilju sprovođenja važnih epidemioloških i kliničkih ispitivanja, kao i pravovremene dijagnoze i terapije sepse neophodna je opšteprihvaćena definicija sa preciznim kliničkim kriterijumima za ovaj sindrom.

Sepsa se danas definiše kao životno ugrožavajuća disfunkcija organa izazvana poremećenom regulacijom odgovora domaćina na infekciju. ³ Ova treća internacionalna konsenzus definicija sepse predložena je 2016. da bi se ispravila ograničenja prethodne, a u svetlu novih saznanja o patobiologiji, epidemiologiji i zbrinjavanju sepse i septičnog šoka. ^{3,4}

1.1 Definicije sepse

Prva konsenzus konferencija o sepsi održana je 1991. godine u pokušaju da se standardizuje terminologija čime bi se omogućilo ranije dijagnostikovanje i lečenje sepse, ali i izbegli nesporazumi u komunikaciji i omogućila evaluacija i poređenje rezultata kliničkih ispitivanja sepse. ⁵

Definisan je sindrom sistemskog inflamatornog odgovora (SIRS) koji se javlja u različitim patološkim stanjima, poput pankreatitisa, opekotina, politraume, infekcije, hemoragijskog šoka i dr. Sepsa je definisana kao SIRS udružen sa infekcijom (**Tabela 1**). S obzirom na to da se SIRS često komplikuje disfunkcijom organa, uveden je i pojam sindroma multiple organske disfunkcije (MODS). Sepsa udružena sa multiplom organskom disfunkcijom, znacima hipoperfuzije ili hipotenzijom naziva se teškom sepsom; znaci hipoperfuzije mogu uključivati laktatnu acidozu, oliguriju ili akutnu promenu mentalnog statusa. Sindrom multiple organske disfunkcije (MODS) definisan je kao prisustvo izmenjene funkcije organa

kod akutno obolelih kada se homeostaza ne može održati bez terapijske intervencije. Ukoliko sepsom indukovana hipotenzija perzistira uprkos adekvatnoj nadoknadi volumena, a uz prisutne znake hipoperfuzije, govori se o septičnom šoku.⁵ Predložen je model po kojem sepsa prati linearni kontinuum od SIRS-a, preko teške sepse do septičnog šoka.⁵

Druga Internacionalna konferencija o definicijama sepse održana je 2001. godine, a rezultati su objavljeni 2003.⁶ Konferencija je sazvana da bi se revidirale i eventualno modifikovale definicije objavljene 1992. godine koje su eksperti često kritikovali. Na meti kritike bile su preterana senzitivnost i nespecifičnost SIRS-a, kao i nepovezanost kliničkih kriterijuma sa specifičnim patofiziološkim procesima.^{7,8} Takođe, učesnici konferencije bili su upoznati sa rezultatima internacionalne ankete sprovedene među lekarima koji rade u JIL, a koja je objavljena tek 2004. godine, u kojoj se navodi da je samo 22% intenzivista i 5% drugih lekara prilikom definisanja sepse navelo tada aktuelnu konsenzus definiciju iz 1991.⁹

Kriterijumi za SIRS	
Telesna temperatura	Groznica (> 38°C) ili hipotermija (< 36°C)
Srčana frekvencija	Tahikardija (> 90 otkucaja u minuti)
Frekvencija disanja	Tahipneja (> 20 respiracija u minuti) ili hiperventilacija (PaCO ₂ < 32 mmHg)
Broj leukocita	Leukocitoza (> 12000/mm ³) ili leukopenija (< 4000/mm ³) ili prisustvo više od 10% nezrelih leukocita

Tabela 1. Kriterijumi za SIRS prema preporukama iz 1991. godine. Za dijagnozu SIRS-a potrebno je da budu ispunjena najmanje dva od navedenih kliničkih kriterijuma. Prilagođeno prema *Bone et al.*⁵

Zaključak konferencije bio je da postojeće definicije ne treba menjati jer ne postoje dokazi koji bi to opravdali. Umesto toga, proširili su listu dijagnostičkih kriterijuma za sepsu (**Tabela 2**). Za procenu organske disfunkcije u teškoj sepsi predložen je SOFA skor.⁶

Dijagnostički kriterijumi za sepsu (SSC 2012)	
INFEKCIJA, dokumentovana ili suspektna, sa bilo kojim od ispod navedenih kliničkih ili dijagnostičkih kriterijuma:	
OPŠTI PARAMETRI	<ul style="list-style-type: none"> • Groznica ($> 38^{\circ}\text{C}$) ili hipotermija ($< 36^{\circ}\text{C}$) • Tahikardija (> 90 otkucaja u minuti) • Tahipneja • Izmenjen mentalni status • Značajni edemi ili pozitivan bilans tečnosti (> 20 ml/kg u 24 h) • Hiperglikemija ($> 7,7$ mmol/l) u odsustvu dijabetesa
INFLAMATORNI PARAMETRI	<ul style="list-style-type: none"> • Leukocitoza ($> 12 \times 10^9/l$) ili leukopenija ($< 4 \times 10^9/l$) ili prisustvo više od 10% nezrelih leukocita • C-reaktivni protein u plazmi > 2 SD iznad normalne vrednosti • Prokalcitonin u plazmi > 2 SD iznad normalne vrednosti
HEMODINAMSKI PARAMETRI	<ul style="list-style-type: none"> • Arterijska hipotenzija <ul style="list-style-type: none"> ○ Sistolni pritisak < 90 mmHg, ili ○ Srednji arterijski pritisak < 70 mmHg, ili ○ Pad sistolnog pritiska > 40 mmHg
PARAMETRI ORGANSKE DISFUNKCIJE	<ul style="list-style-type: none"> • Arterijska hipoksemija ($\text{PaO}_2/\text{FiO}_2 < 300$) • Akutna oligurija (diureza $< 0,5$ ml/kg/h tokom 2 ili više sati uprkos adekvatnoj nadoknadi volumena) • Porast kreatinina $> 0,5$ mg/dl • Poremećaji koagulacije <ul style="list-style-type: none"> ○ INR $> 1,5$, ili ○ aPTT > 60s • Ileus • Trombocitopenija ($< 100 \times 10^9/l$) • Hiperbilirubinemija (ukupni bilirubin u plazmi > 70 $\mu\text{mol/l}$)
PARAMETRI TKIVNE PERFUZIJE	<ul style="list-style-type: none"> • Hiperlaktemija (> 1 mmol/l) • Smanjeno kapilarno punjenje

Tabela 2. Dijagnostički kriterijumi za sepsu prema preporukama iz 2001. i smernicama SSC iz 2012. godine. $\text{PaO}_2/\text{FiO}_2$ – odnos parcijalnog pritiska kiseonika u arterijskoj krvi i inspiratorne frakcije kiseonika; INR – internacionalni normalizovani odnos; aPTT – aktivirano parcijalno tromboplastinsko vreme. Prilagođeno prema *Levy et al.*⁶ i *Dellinger et al.*¹⁰

Kriterijumi sa ove konferencije su u diskretno izmenjenom obliku preporučeni i u internacionalnim smernicama za zbrinjavanje teške sepse i septičnog šoka Kampanje za preživljavanje sepse iz 2012.¹⁰ Kampanja za preživljavanje sepse (SSC) započeta je 2002. godine saradnjom *Society of Critical Care Medicine, European Society of Intensive Care Medicine* i *International Sepsis Forum*, u cilju podizanja svesti o sepsi i poboljšanju ishoda teške sepse.¹¹ Smernice za zbrinjavanje teške sepse i septičnog šoka prvi put su objavljene 2004, a usledila su izdanja 2008, 2012. i 2016. sa ažuriranim preporukama baziranim na dokazima.^{10,12–14}

1.1.1 Nova definicija sepse – SEPSA-3

Definicije sepse, teške sepse i septičnog šoka nisu suštinski menjane više od dve decenije. Na osnovu novih saznanja iz patobiologije sepse bilo je jasno da je potrebna ponovna revizija starih definicija sepse.^{3,15} Stoga su *European Society of Intensive Care Medicine* i *Society of Critical Care Medicine* u januaru 2014. sazvali radnu grupu eksperata da bi se ažurirale postojeće definicije sepse i septičnog šoka.³

Radna grupa je ispitala sadržinsku, kriterijumsku (prediktivnu i dijagnostičku) i konstruktivnu (konvergentnu i diskriminantnu) validnost kriterijuma koji su se koristili za dijagnozu sepse. Bilo je potrebno da nove definicije budu ažurne i u skladu sa boljim razumevanjem promena u funkciji i morfologiji organa, biologiji ćelije, biohemiji, imunologiji i cirkulaciji, što je sve zbirno nazvano patobiologijom sepse. Rezultati njihovog rada objavljeni su 2016. godine.³

Sepsa se više ne posmatra samo kao preterana inflamacija, nego kao proces kod kojeg rano dolazi do aktivacije i proinflammatoryh i antiinflammatoryh odgovora.^{15,16} Dva ili više kriterijuma za SIRS prisutna su kod mnogih pacijenta koji nemaju infekciju, tako da kriterijumi za SIRS imaju lošu diskriminantnu validnost. Takođe, studija Kaukonenove i saradnika ukazala je na lošu dijagnostičku validnost SIRS kriterijuma, jer 1 od 8 pacijenata primljenih u JIL u Australiji i Novom Zelandu, a koji je imao infekciju i novonastalu insuficijenciju organa, nije ispunio najmanje dva kriterijuma za SIRS, pa tako ni uslove za dijagnozu teške sepse, iako su ovi SIRS-negativni septični pacijenti imali slične karakteristike i mortalitet kao i SIRS pozitivni pacijenti.¹⁷

Radna grupa je definisala sepsu kao 'životno ugrožavajuću disfunkciju organa izazvanu poremećenom regulacijom odgovora domaćina na infekciju' (**Slika 1**). Dakle, nova definicija

sepsu uključuje disfunkciju organa, što je ranije bio kriterijum za tešku sepsu, te samim tim termin 'teška sepsa' postaje suvišan. Autori naglašavaju da 'sepsom izazvana disfunkcija organa može biti okultna', te da treba imati na umu tu mogućnost kod svakog pacijenta sa infekcijom. Važi i obrnuto, 'neprepoznata infekcija može biti uzrok novonastale disfunkcije organa'.³

Prepoznajući da danas ne postoje klinička merenja koja odražavaju koncept 'poremećene regulacije odgovora domaćina', radna grupa je evaluirala kliničke kriterijume u potrazi za onima koji najbolje identifikuju inficirane pacijente koji najverovatnije imaju sepsu. Procenjivane su konstruktivna i prediktivna validnost¹⁸ i na osnovu rezultata preporučeno je da se za identifikaciju organske disfunkcije u JIL koristi akutna promena u ukupnom SOFA skoru za 2 ili više poena u odnosu na početnu vrednost (**Tabela 3**). Treba smatrati da su početne vrednosti 0 osim ukoliko ne znamo da je pacijent već imao disfunkciju organa pre početka infekcije. Pokazano je da je porast SOFA skora za 2 ili više poena udružen sa bolničkim mortalitetom većim od 10% u opštoj populaciji pacijenata sa pretpostavljenom infekcijom.^{3,18}

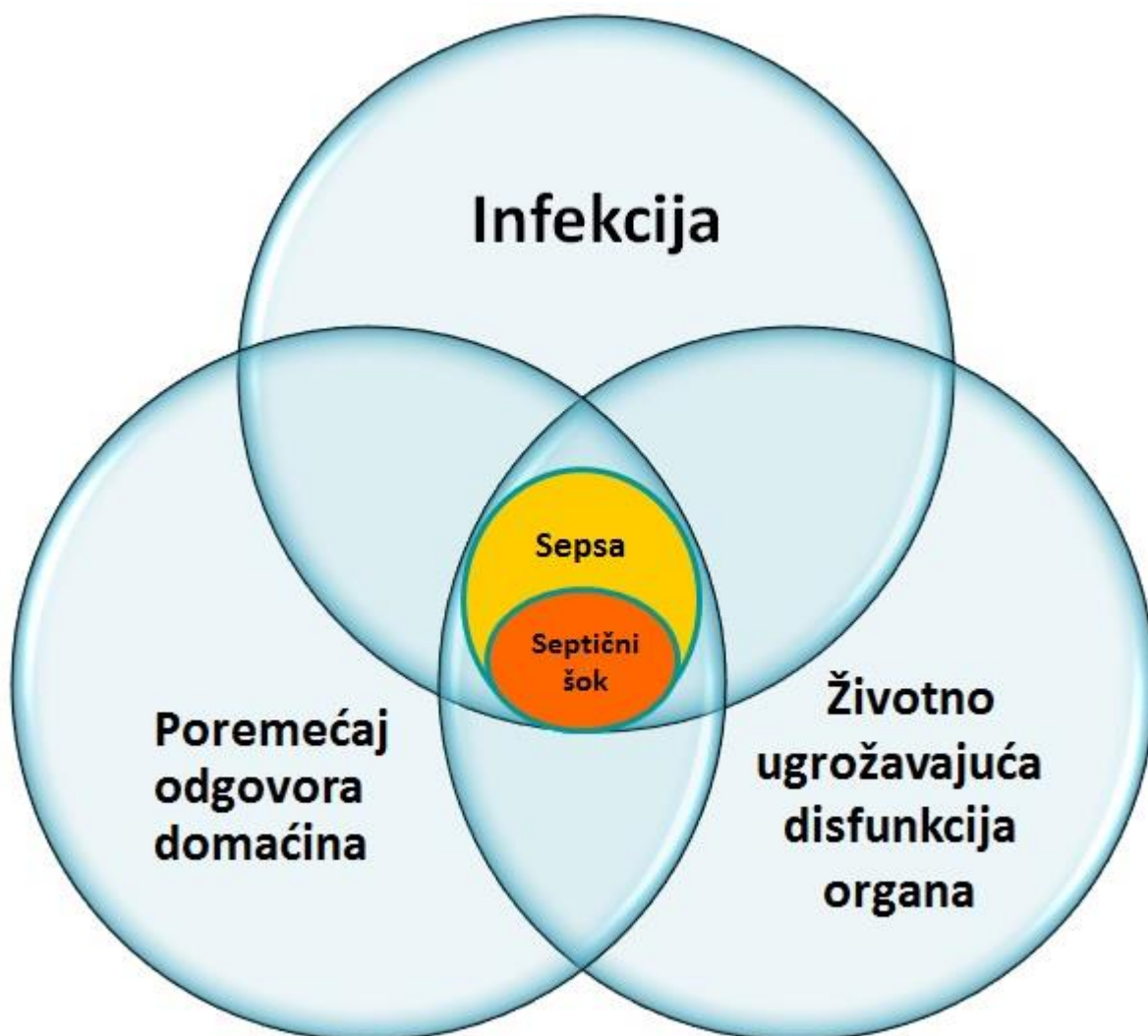
Radna grupa je predložila i novi klinički skor qSOFA za upotrebu izvan JIL, a za brzu identifikaciju onih pacijenata sa suspektom infekcijom koji će verovatno imati lošije ishode karakteristične za sepsu (**Tabela 4**). Kriterijumi su jednostavni: prisustvo bilo koja 2 od 3 klinička parametra - poremećaj stanja svesti, hipotenzija i tahipneja – kod pacijenata sa infekcijom izvan JIL ima prediktivnu validnost sličnu SOFA skoru u JIL.^{3,18} U prednosti qSOFA skora spada to što ne zahteva laboratorijska ispitivanja, može se često ponavljati, može da potakne lekara na detaljnija ispitivanja u cilju ranijeg otkrivanja organske disfunkcije i pravovremenog započinjanja ili korigovanja terapije, kao i na razmatranje mogućnosti da se pacijent prebaci u JIL.³

Ažurirana je i definicija septičnog šoka. Septični šok se sada definiše kao oblik sepsu kod kojeg su osnovni cirkulatorni, celularni i metabolički poremećaji toliko teški da značajno povećavaju mortalitet. Kriterijumi za septični šok uključuju sepsu uz perzistentnu hipotenziju koja zahteva terapiju vazopresorima da bi se srednji arterijski pritisak održao na vrednostima jednakim ili većim od 65 mmHg, i hiperlaktemiju veću od 2 mmol/l uprkos adekvatnoj nadoknadi volumena. Ako su ovi kriterijumi prisutni, bolnički mortalitet je veći od 40%.

Hiperlaktemija je uključena u dijagnostičke kriterijume jer se smatra da odražava poremećaj ćelijske funkcije u sepsi. ³

SISTEM	SKOR				
	0	1	2	3	4
<u>Respiratorni</u> PaO ₂ /FiO ₂ , mmHg	≥ 400	< 400	< 300	< 200 sa respiratornom podrškom	< 100 sa respiratornom podrškom
<u>Hematološki</u> Trombociti, x 10 ⁹ /l	≥ 150	< 150	< 100	< 50	< 20
<u>Hepato- bilijarni</u> Bilirubin, mg/dl (μmol/l)	< 1,2 (20)	1,2 – 1,9 (20 – 32)	2,0 – 5,9 (33 – 101)	6,0 – 11,9 (102 – 204)	> 12,0 (204)
<u>Kardio- vaskularni</u> Hipotenzija (mmHg)	MAP ≥ 70	MAP < 70	DOP < 5 ili DOBUT (bilo koja doza)*	DOP 5,1 - 15 ili ADR ≤ 0,1 ili NORAD ≤ 0,1*	DOP > 15 ili ADR > 0,1 ili NORAD > 0,1*
<u>Centralni nervni sistem</u> Glasgow coma score	15	13 – 14	10 – 12	6 – 9	< 6
<u>Urinarni</u> Kreatinin, mg/dl (μmol/l)	< 1,2 (110)	1,2 – 1,9 (110 – 170)	2,0 – 3,4 (171 – 299)	3,5 – 4,9 (300-440)	> 5,0 (440)
Diureza, ml/dan				< 500	< 200

Tabela 3. SOFA skor. *Doze kateholamina su u μg/kg/min tokom najmanje 1 sata. PaO₂/FiO₂ – odnos parcijalnog pritiska kiseonika u arterijskoj krvi i inspiratorne frakcije kiseonika; MAP – srednji arterijski pritisak; DOP – dopamin; DOBUT – dobutamin; ADR – adrenalin; NORAD - noradrenalin. Prilagođeno prema *Singer et al.*³



Slika 1. Treća internacionalna konsenzus definicija sepse i septičnog šoka.

Kriterijumi za qSOFA	
Frekvencija disanja	Tahipneja ($\geq 22/\text{min}$)
Stanje svesti	Poremećaj stanja svesti (Glazgov koma skor < 15)
Sistolni krvni pritisak	Hipotenzija ($\leq 100 \text{ mmHg}$)

Tabela 4. Kriterijumi za qSOFA. Prilagođeno prema *Singer et al.* ³

1.2 Epidemiologija sepse

Istraživanja incidence i mortaliteta od sepse uglavnom su sprovedena u zemljama sa visokim nacionalnim dohotkom,^{19,20} a rezultati studija veoma variraju u zavisnosti od toga kako je sepsa definisana, odnosno da li se koriste administrativne definicije, što je čest slučaj u SAD, ili definicije na osnovu konsenzus kriterijuma.²⁰

Prema studiji objavljenoj 2014, u kojoj su učestvovali zdravstveni centri iz 84 zemlje uključujući Srbiju, a koja je ispitivala mortalitet u JIL, 29,5% pacijenta imalo je sepsu na prijemu ili tokom boravka u JIL. Mortalitet bolesnika sa sepsom u JIL bio je 25,8%, a njihov bolnički mortalitet 35,3%.¹ U ovoj studiji sepsa je definisana kao 'prisustvo infekcije sa istovremeno prisutnom insuficijencijom bar jednog organa (SOFA > 2 za insuficijentni organ)', što odgovara aktuelnoj definiciji sepse prema konsenzus kriterijumima, Sepsis-3.

Noviju procenu globalne incidence i mortaliteta od bolnički lečene sepse pružili su Fleischmannova i saradnici, u studiji objavljenoj 2016. Procena stope incidence sepse za period od 2003. do 2015. iznosila je 437 slučajeva na 100.000 osoba-godina, a za tešku sepsu 270 slučajeva na 100.000 osoba-godina. Za isti period bolnički letalitet bio je 17% za sepsu, a 26% za tešku sepsu. Ekstrapolacijom podataka iz zemalja sa visokim dohotkom procenili su da se svake godine u bolnicama širom sveta može očekivati 31,5 miliona slučajeva sepse i 19,4 miliona slučajeva teške sepse, kao i mogućih 5,3 miliona smrti izazvanih sepsom. Autori takođe napominju da bi ova procena mogla potceniti stvarnu globalnu incidencu sepse s obzirom na to da je izvedena na osnovu podataka iz visoko razvijenih zemalja, a da je prevalenca akutnih infekcija koje mogu da dovedu do sepse značajno viša u zemljama sa niskim i srednjim dohotkom.¹⁹

Istraživači su saglasni da se incidenca sepse povećava, a iako je letalitet manji, beleži se više slučajeva težih oblika bolesti.^{19,21-24} Metacentrična analiza objavljena 2014. pokazala je da se mortalitet teške sepse smanjivao za 3% godišnje, sa 46,9% u periodu 1991-1995. na 29% u periodu 2006-2009. godine.²³

Sepsu najčešće dobijaju starije osobe. Prema jednoj studiji u SAD, pacijenti stariji od 65 godina predstavljali su 12% populacije SAD, ali 64,9% slučajeva sepse u toj zemlji.²⁵ Starije osobe imaju veći broj komorbiditeta i poremećaje stečene imunosti zbog starenja imunskog sistema (imunosenescencije) zbog čega su podložniji infekcijama i razvoju sepse.^{26,27}

Najčešća ishodišta sepse su infekcije respiratornog trakta, praćene infekcijama urinarnog i gastrointestinalnog trakta, bakterijemijama nepoznatog izvora i infekcijama kože i mekih tkiva.^{28,29} Velika internacionalna studija Vincenta i saradnika pokazala je da su najčešći prouzrokovatori Gram-negativni mikroorganizmi (62%), praćeni Gram-pozitivnim bakterijama (47%) i gljivicama (19%). Među Gram-negativnim bakterijama najčešće su izolovane vrste roda *Pseudomonas* (~20%), *Escherichia coli* (16%) i vrste roda *Klebsiella* (~13%). Najčešći Gram-pozitivan prouzrokovatelj bio je *Staphylococcus aureus* (20,5%), uključujući MRSA.²⁹ Važno je napomenuti da je, prema raznim istraživanjima, hemokultura negativna u 30-50% slučajeva.²⁹⁻³²

1.3 Patofiziologija sepse – poremećaj imunske homeostaze u sepsi

Imunski sistem prepoznaje patogene mikroorganizme koji su prodrli u tkiva i cirkulaciju pomoću receptora za prepoznavanje obrazaca. Ovi receptori se nalaze na ćelijama urođene imunosti, ali i na limfocitima, epitelnim, endotelnim i drugim ćelijama.³³ Receptori za prepoznavanje obrazaca prepoznaju komponente/molekule mikroorganizama (npr. bakterijski endotoksin, peptidoglikane, dvolančanu RNK virusa i dr.) koje se zbirno nazivaju molekulskim obrascima patogena (PAMP).³³ Međutim, urođeni imunski sistem prepoznaje i molekule koje se oslobađaju iz oštećenog ili nekrotičnog tkiva, tzv. alarmine, koje mogu da proizvode i same efektorske ćelije imunosti. Egzogeni PAMP i endogeni alarmini zbirno se nazivaju molekulskim obrascima oštećenja (DAMP).^{34,35}

Receptori za prepoznavanje obrazaca mogu se klasifikovati prema lokalizaciji na membranske (na ćelijskoj membrani ili membrani endozoma) i citoplazmatske. Membranski receptori su receptori slični Tollu (TLR) i lektinski receptori, a citoplazmatski su receptori slični NOD-u (NLR) i receptori slični RIG-u (RLR).^{33,36}

Kada receptori prepoznaju PAMP i DAMP, dolazi do aktivacije signalnih puteva i ushodne regulacije gena uključenih u regulaciju inflamatornog odgovora.^{33,35} U sepsi može da dođe do snažnog hiperinflamatornog odgovora poznatog kao 'citokinska oluja', koja može da dovede do multiple organske insuficijencije i smrti.³⁷ Ubrzo nakon inflamatornog odgovora, a možda i istovremeno,³⁸ pokreće se i antiinflamatorni odgovor, iako se donedavno smatralo da ovaj 'kompenzatorni' odgovor započinje danima nakon snažnog proinflamatornog odgovora.³⁹ Ukoliko nema komplikacija, a mikroorganizam ili štetni agens je uklonjen,

započinje aktivni proces ponovnog uspostavljanja homeostaze, u kojem važnu, i poželjnu, ulogu imaju procesi apoptoze i autofagije.⁴⁰

U nekim slučajevima ne dolazi do kompletne rezolucije inflamacije i pacijenti razvijaju hroničnu kritičnu bolest, odnosno sindrom perzistentne inflamacije, imunosupresije i katabolizma.⁴

1.3.1 Proinflamatorni i antiinflamatorni citokini u sepsi

Tokom osamdesetih i početkom devedesetih godina XX veka već su bili identifikovani pojedini proinflamatorni citokini i njihovi receptori (npr. IL-1, TNF, IL-6 i dr.), čija je uloga u izazivanju ranog, nekontrolisanog hiperinflamatornog odgovora u sepsi potvrđena u različitim eksperimentalnim modelima.⁴¹⁻⁴⁹ Ova otkrića su dovela do formulisanja SIRS-a i viđenja sepse kao sistemskog inflamatornog odgovora na infekciju.⁵ Aikawa je ovo sistemsko neregulisano oslobađanje proinflamatornih citokina koje dovodi do generalizovane inflamatorne reakcije kod pacijenata sa sindromom multiple organske disfunkcije nazvao 'citokinskom olujom'.⁵⁰ U istom periodu je otkriveno i da se u odgovoru na stimulse kakav je bakterijski endotoksin (LPS) osim proinflamatornih citokina u organizmu oslobađaju i antiinflamatorni citokini i molekule koje neutrališu citokine, poput antagonista citokinskih receptora i solubilnih citokinskih receptora,⁵¹⁻⁵⁴ međutim, pažnja je prvobitno bila usmerena na proinflamatorni odgovor.

U eksperimentima na životinjama u kojima su korišćena antiendotoksinska antitela,⁵⁵⁻⁵⁷ anti-TNF monoklonalna antitela,⁵⁸ i antagonisti IL-1 receptora,⁵⁹⁻⁶¹ pokazano je da su životinje bile zaštićene, delimično ili u potpunosti, od razvoja sepse, organske insuficijencije ili septičnog šoka i poboljšano je njihovo preživljavanje. Na bazi ovih ohrabrujućih rezultata započeta su i prva klinička ispitivanja različitih antitela protiv endotoksina, anti-TNF α antitela, antagonista IL-1 receptora i drugih antiinflamatornih agensa.⁶²⁻⁶⁶ Međutim, rezultati nisu ispunili očekivanja,⁶⁷⁻⁷⁶ a u jednom slučaju je, sa povećanjem doze agensa, mortalitet čak bio i povećan.⁷⁷ U diskusijama i analizama koje su usledile kao mogući razlozi neuspeha navode se velike razlike koje postoje između eksperimenata na životinjama, koji se izvode u strogo kontrolisanim uslovima, i kliničkih studija na izuzetno heterogenoj populaciji pacijenata u pogledu starosti, prisustva komorbiditeta, načina nastanka infekcije, vrste i virulencije prouzrokovala, preduzetih terapijskih mera i odgovora domaćina na infekciju,

odnosno, njegove imunokompetencije. ^{78–80} Neuspeh studija je istakao u prvi plan kompleksnu patofiziologiju sepse i potrebu za njenim boljim razumevanjem. ⁸¹

Munoz i saradnici stimulisali su monocite septičnih pacijenata lipopolisaharidom *in vitro* i pronašli su smanjenu monocitnu proizvodnju IL-1 β , TNF α i IL-6 kod pacijenata sa sepsom u odnosu na kontrolnu grupu. Proizvodnja citokina bila je naročito smanjena kod pacijenata sa Gram-negativnim infekcijama. Takođe, monociti preživelih pacijenata povratili su sposobnost proizvodnje citokina u normalnim količinama, što nije bio slučaj sa monocitima umrlih. ⁸² Slično ovome, Ertel i saradnici stimulisali su punu krv pacijenata sa teškom sepsom lipopolisaharidom *ex vivo* da bi utvrdili kinetiku oslobađanja TNF α , IL-1 β i IL-6. Eksperiment je pokazao da u sepsi dolazi do izrazite depresije oslobađanja pomenutih proinflammatoryh citokina iz mononuklearnih ćelija pune krvi, čak i pri malim koncentracijama lipopolisaharida kakve se inače detektuju kod septičnih pacijenata. Ovaj fenomen, poznat kao endotoksinska tolerancija, trajao je do kraja opservacionog perioda od 10 dana i autori su smatrali da može dovesti do imunodeficijencije kod pacijenata sa teškom sepsom. ⁸³

S obzirom na to da se SIRS nije javljao kod svih pacijenata sa sepsom, i prepoznajući da je SIRS samo 'polovina cele slike', Bone i saradnici su 1997. predložili da se postojećim definicijama doda novi sindrom kompenzatornog antiinflammatoryh odgovora (CARS), a na osnovu tadašnjih saznanja da ubrzo nakon oslobađanja proinflammatoryh medijatora dolazi do oslobađanja antiinflammatoryh citokina (IL-4, IL-10, TGF- β i dr.) u cilju moduliranja inflamacije i ponovnog uspostavljanja homeostaze. Ukoliko je kompenzatorni antiinflammatoryh odgovor preteran dolazi do imunosupresije koja može perzistirati. ³⁹ Dakle, prema SIRS-CARS modelu, kompenzatorni odgovor se javlja nakon povlačenja rane hiperinflammatoryh faze i odgovoran je za hroničnu fazu sepse.

Međutim, u godinama koje su usledile, studije na pacijentima pokazale su postojanje različitih citokinskih profila sa različitim uticajem na ishod sepse, od povećane proizvodnje antiinflammatoryh IL-10, preko smanjene proizvodnje citokina, do povećane proizvodnje i proinflammatoryh i antiinflammatoryh citokina. ⁸⁴

Van Dissel i saradnici su pokazali da je visok odnos antiinflammatoryh IL-10 prema proinflammatoryh TNF α udružen sa smrtnim ishodom febrilnih pacijenata sa vanbolničkom

infekcijom i upozorili na opasnost upotrebe inhibitora proinflammatoryh citokina kod pacijenata sa sepsom.⁸⁵

U studiji koju su sproveli Gogos i saradnici merene su koncentracije proinflammatoryh citokina (TNF α , IL-1 β i IL-6) i antiinflammatoryh IL-10, kao i citokinskih inhibitora IL-1Ra i solubilnog receptora TNF (sTNFR) kod 65 pacijenata sa teškom sepsom. Svi pacijenti su na prijemu imali znatno više nivoe svih merenih citokina u odnosu na kontrolnu grupu, a posebno su bili visoki nivoi antiinflammatoryh citokina. Kod umrlih su izmerene značajno visoke vrednosti IL-10 i TNF α , i veoma visok odnos IL-10 prema TNF α . S druge strane, kod preživelih je zabeleženo značajno smanjenje nivoa IL-10 u serumu, pa samim tim i odnosa IL-10 prema TNF α . Takođe, kod pacijenata koji su razvili septični šok u prvih 48 sati od prijema zabeležene su značajno više vrednosti TNF α , IL-6, IL-1Ra i sTNFR.⁸⁶

Velika multicentrična studija Kellum-a i saradnika merila je nivoe TNF, IL-6 i IL-10 kod pacijenata sa vanbolničkom pneumonijom da bi se utvrdilo da li postoje citokinski obrasci udruženi sa sepsom i smrću. Kod većine pacijenata došlo je do porasta nivoa citokina, ali je deo i preživelih i umrlih pacijenata imao normalne vrednosti pri svakom merenju. Najviše vrednosti su zabeležene već prvog dana da bi se postepeno smanjivale tokom prve nedelje, ali su povišeni nivoi citokina perzistirali mnogo duže od kliničkih znakova bolesti. Srednje vrednosti sva tri merena citokina bile su više kod pacijenata sa teškom sepsom u odnosu na pacijente bez sepse, te kod umrlih u odnosu na preživеле. Vrednosti IL-6 bile su najveće kod pacijenata koji su razvili tešku sepsu, a najveći rizik od umiranja imali su pacijenti sa istovremenim visokim nivoima IL-6 i IL-10. Zanimljivo je da je 64% preživelih i 42% umrlih imalo normalne vrednosti IL-10 tokom celog perioda merenja, kao i da nije dolazilo do iznenadnog porasta nivoa bilo kog citokina sa nastankom organske disfunkcije. Nije uočena ni dominacija bilo kog pojedinog citokina u odnosu na druge. Važan nalaz ove studije je da su uočeni različiti obrasci citokinskog odgovora, ali da je aktivacija bila generalizovana. Autori su zaključili da je citokinski odgovor dugotrajniji nego što se mislilo i da je odgovor mnogo heterogeniji od očekivanog.⁸⁷

Nalaz istovremene sekrecije i proinflammatoryh i antiinflammatoryh citokina potvrđen je i u drugim studijama ljudske sepse.^{88,89}

S obzirom na to da se SIRS ne javlja samo u sepsi nego i u mnogim drugim patološkim stanjima, veoma je zanimljiva multicentrična studija Xiao-a i saradnika koji su ispitivali ekspresiju celog genoma leukocita iz krvi traumatizovanih pacijenata odmah nakon povrede i periodično tokom 28 dana, i upoređivali je sa ekspresijom genoma pacijenata sa teškim opekotinama i 4 zdrava subjekta kojima je dat endotoksin u maloj dozi.³⁸ Jedan od ciljeva studije bio je da se utvrdi da li je MODS nakon traume posledica SIRS-a nakon kojeg se razvija CARS. Analiza transkriptoma je pokazala da je teška trauma dovela do izmenjene ekspresije više od 80% gena leukocita tokom 28 dana koliko je trajalo ispitivanje. Najviše je porasla ekspresija gena koji kontrolišu urođenu imunost, inflamatorni odgovor (i proinflamatorni i antiinflamatorni) i prepoznavanje patogena (npr. skoro svih TLR, NLR i dr.), a ekspresija je dostigla maksimum u prvih 12 sati od povrede. Istovremeno je došlo do supresije gena uključenih u kontrolu stečene imunosti, a najviše su bili suprimirani geni uključeni u prezentaciju antigena i aktivaciju T-ćelija. Promene genske ekspresije leukocita traumatizovanih pacijenata bile su veoma slične onima kod pacijenata sa opekotinama i zdrave kontrole koja je primila infuzije niske doze endotoksina. Na primer, 88% gena sa najvećom promenom ekspresije nakon traume na sličan način je bilo promenjeno u endotoksemiji (uškodno ili nishodno eksprimirano), a razlike su postojale uglavnom u trajanju odgovora. Autori su ove brze, opsežne i dramatične promene transkriptoma u odgovoru na težak inflamatorni stres nazvali 'genomskom olujom'.³⁸ Grupa je ispitivala i da li postoji razlika u ekspresiji gena između komplikovanog i nekomplikovanog toka bolesti i našla je da su razlike kvantitativne prirode – postojala je razlika u dužini i stepenu ekspresije, odnosno supresije gena, ali nije došlo do aktivacije ili supresije gena koja bi bila udružena isključivo sa komplikacijama. Ova važna studija dovela je u pitanje SIRS/CARS paradigmu, barem na nivou transkriptoma leukocita.³⁸

Bone i saradnici su smatrali da model SIRS-CARS može da objasni ranu smrt od septičnog šoka, multiplu organsku disfunkciju i perzistentnu imunosupresiju koja se javlja kod nekih pacijenata posle sepse.³⁹ Danas znamo da je patogenezna sepse mnogo kompleksnija nego što se mislilo pre dvadeset godina.

1.3.2 Imunosupresija u sepsi

Odavno je poznato da pacijenti sa sepsom gube reakciju kasne preosetljivosti i da ih karakteriše nemogućnost zalečenja primarne infekcije, sklonost ka razvijanju nozokomijalnih infekcija i reaktivacija latentnih virusa što jasno ukazuje na imunosupresiju.^{84,90,91} Ovo stanje teške supresije imunskog sistema do kojeg dolazi nakon početne hiperinflamatorne faze sepse nazvano je 'imunoparaliza'.⁹²

Meakins i saradnici su još 1977. primetili da hirurški pacijenti koji su izgubili reakciju kasne preosetljivosti na uobičajene antigene imaju veći rizik od razvoja sepse i mortaliteta. Analiza je, takođe, pokazala veću smrtnost kod pacijenata kod kojih je anergija perzistirala (74,4%), u odnosu na one pacijente kod kojih je došlo do oporavka reakcije kasne preosetljivosti (5,1%).⁹³

U retrospektivnoj studiji Torgersena i saradnika analizirani su makroskopski nalazi autopsija 235 pacijenata koji su umrli u JIL od sepse ili septičnog šoka. Analiza je pokazala da je u vreme smrti oko 77% pacijenata imalo nezalečene septične fokuse, bez obzira na razlog prijema u JIL.⁹⁴ Ipak, ova studija ne daje odgovor na pitanje od čega su umrli pacijenti koji su imali sepsu ili septični šok jer nezalečena žarišta nisu obavezno i uzrok smrti. Stvarni uzrok smrti mnogih pacijenata umrlih od sepse je i dalje predmet istraživanja, a studije ukazuju na to da bi, u odsustvu masivne nekroze i apoptoze u ispitivanim organima,^{95,96} disfunkcija mitohondrija mogla imati ulogu u nastanku organske insuficijencije.⁹⁶⁻⁹⁹

Sun i saradnici su pronašli da je 23,4% pacijenata koji su preživeli sepsu ponovo primljeno u bolnicu 30 dana nakon otpusta, a razlog za readmisiju je u 69,2% slučajeva bila infekcija. Među ovim slučajevima 51,4% imalo je nezalečenu ili rekurentnu infekciju. Visokorizična grupa za neplaniranu readmisiju nakon 30 dana bili su septični pacijenti koji su takođe dobili bolničku infekciju i koji su duže primali antibiotike.¹⁰⁰

Poznato je da su pacijenti sa sepsom skloni razvoju sekundarnih infekcija izazvanih oportunističkim, slabo virulentnim mikroorganizmima i reaktivaciji latentnih virusnih infekcija. U novijoj studiji je nađeno da je 13,5% pacijenata primljenih u JIL zbog sepse dobilo sekundarnu infekciju, a najčešći prouzrokovaniči bile su Gram-pozitivne bakterije (45,2%), posebno *Staphylococcus epidermidis* i vrste roda *Enterococcus*; Gram-negativne bakterije (26,6%), najčešće *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Klebsiella*

pneumoniae i *Stenotrophomonas maltophilia*; i gljivice (9,6%), najčešće vrste roda *Candida*. Virusne infekcije nađene su u 9,9% slučajeva, i to najčešće reaktivacije *Herpes Simplex* virusa i *Citomegalovirusa*. Septični pacijenti koji su stekli bolničku infekciju u JIL imali su težu sliku bolesti na prijemu.¹⁰¹

Ubedljive dokaze u prilog narušene imunosti u sepsi dali su Walton i saradnici koji su ispitivali reaktivaciju više virusa kod pacijenata sa sepsom. Pronašli su da je do reaktivacije *CMV* došlo kod 24,2% septičnih pacijenata, *EBV* kod 53,2%, a reaktivaciju *HSV* imalo je 14,1 % pacijenata sa sepsom. Česte su bile i reaktivacije drugih ispitivanih virusa. Čak 42,7% pacijenata imalo je reaktivaciju dva ili više virusa tokom trajanja sepse. Pacijenti sa reaktivacijom *CMV* i *EBV* imali su povećan rizik od razvoja gljivičnih infekcija, a oni sa reaktivacijom *HSV* povećan rizik od razvoja oportunističkih bakterijskih infekcija vrstama iz roda *Acinetobacter*, *Stenotrophomonas* i *Enterococcus*.¹⁰²

1.3.3 Celularni odgovor u sepsi

Brojne studije koje su ispitivale mehanizme nastanka imunosupresije u sepsi ukazale su na postojanje različitih poremećaja funkcije i broja ćelija i urođene i stećne imunosti.

Poremećaj funkcije makrofaga dobro je poznata pojava u sepsi. Smanjena monocitna proizvodnja proinflammatoryh citokina *TNF α* , *IL-1 β* i *IL-6* na stimulaciju endotoksinom poznata je kao endotoksinska tolerancija.^{82,83} Mereći endotoksinom indukovanu monocitnu sekreciju citokina kod pacijenata sa sepsom, Weighardt i saradnici pronašli su da je postoperativna sepsa udružena sa smanjenom monocitnom proizvodnjom *IL-12 p40*, *IL-1 β* i *IL-10* i kod preživelih i kod umrlih. Oporavak sekrecije proinflammatoryh *IL-12 p40* i *IL-1 β* , ali ne i antiinflammatoryh *IL-10*, korelirao je sa preživljavanjem. Autori su zaključili da je imunosupresija pre primarni nego kompenzatorni odgovor u sepsi.¹⁰³

Osim smanjene proizvodnje proinflammatoryh citokina, monociti septičnih pacijenta pokazuju i smanjenu ekspresiju *HLA-DR*,^{104,105} što pacijente predisponira za nastanak sekundarnih nozokomijalnih infekcija.¹⁰⁶ Monneret i saradnici pronašli su da monociti pacijenata sa septičnim šokom imaju smanjenu ekspresiju *HLA-DR* (monocitna anergija), da antiinflammatoryh odgovor dominira nakon septičnog šoka i da niže vrednosti koreliraju sa smrtnim ishodom.^{107,108} Longitudinalna studija je pokazala da je do smanjene *HLA-DR* ekspresije na monocitima došlo istovremeno sa znacima hiperinflamacije kod septičnih

pacijenata, te da je kod preživelih, za razliku od umrlih, došlo do opravka ekspresije HLA-DR.¹⁰⁹ Do opravka ekspresije HLA-DR na monocitima došlo je i primenom IFN γ ¹¹⁰ i primenom GM-CSF¹¹¹ čime je ponovo uspostavljena njihova imunokompetencija. Smanjena ekspresija HLA-DR na monocitima danas se koristi kao marker imunoparalize u sepsi.⁹² Monociti septičnih pacijenata pokazuju i smanjenu ekspresiju kostimulatornog liganda CD86, povećanu ekspresiju inhibitornog receptora CTLA-4,¹¹² i povećanu ekspresiju PD-L1.¹¹³ Studija Guignantove i saradnika pokazala je da su pacijenti sa septičnim šokom imali veću ekspresiju PD-L1 i PD-1 na monocitima i CD4⁺ T-limfocitima, respektivno, što je koreliralo sa povećanjem koncentracije IL-10 u cirkulaciji, smanjenom proliferacijom limfocita, povećanjem sekundarnih nozokomijalnih infekcija i mortalitetom nakon septičnog šoka.¹¹⁴

U sepsi su poremećeni i broj i funkcija dendritskih ćelija. Pored smanjenog broja cirkulišućih DC,¹¹⁵⁻¹¹⁸ u sepsi dolazi i do smanjene ekspresije HLA-DR i na konvencionalnim DC (ranije nazvanih mijeloidnim, cDC) i na plazmacitoidnim DC (pDC).¹¹⁶⁻¹¹⁸ Pri stimulaciji, cDC su proizvodile manje TNF α i IL-6, a pDC manje IFN α .¹¹⁶ Porast broja cDC zapažen je kod preživelih pacijenata, mada su vrednosti bile i dalje značajno niže nego kod zdrave kontrole, dok su kod umrlih vrednosti pDC bile značajno povećane. Ista studija je pronašla i smanjenu ekspresiju kostimulatornog molekula CD86, povećanu ekspresiju hemokinskog receptora CXCR4 i povećanu apoptozu DC.¹¹⁷ Niske vrednosti cirkulišućih DC bile su udružene sa razvojem septičnog šoka,^{115,118} i pojavom nozokomijalnih infekcija kod pacijenata sa sepsom.¹¹⁸ Takođe, u sepsi dolazi i do apoptotskog gubitka dendritskih ćelija slezine.¹¹⁹⁻¹²¹

Poznato je da u sepsi dolazi do skretanja CD4⁺ T-ćelijskog odgovora u pravcu antiinflamatornog Th2 imunskog odgovora.¹²²⁻¹²⁴ Ferguson i saradnici su pronašli da je kod pacijenata sa sepsom Th1/Th2 odnos bio značajno niži u odnosu na kontrolne pacijente, odnosno da dominira Th2 imunski odgovor koji može dovesti do imunosupresije.¹²⁵ Za Th1 diferencijaciju potrebna je stimulacija pomoću IL-12 i IFN γ , a u sepsi je nađeno da antigen prezentujuće ćelije imaju smanjenu proizvodnju IL-12.¹²⁶ Viši nivoi IL-12 korelirali su sa preživljavanjem,^{126,127} kao i veći odnos Th1/CD4⁺ i veći broj Th1 limfocita u cirkulaciji.¹²⁴

Heidecke i saradnici ispitivali su funkciju T-ćelija kod pacijenata sa postoperativnom sepsom i pronašli su da je oštećenje funkcije (izraženo kroz smanjeno lučenje IL-2 i TNF) i proliferacije T-ćelija kod umrlih bilo prisutno od početka sepse, dok je sekrecija IL-4 i IL-10 bila neizmenjena. Njihov zaključak je bio da imunosupresija u sepsi može biti primarni

odgovor, bez prethodne hiperinflamatorne faze.¹²⁸ Ovaj nalaz ukazuje na anergiju T-ćelija - stanje funkcionalne hiporeaktivnosti naivnih ili efektorskih ćelija koje se javlja usled nedovoljne kostimulacije ili usled prisustva snažnih inhibitornih signala. Anergичne T-ćelije su zaustavljene u ćelijskom ciklusu, ne proliferišu, dugoživuće su i karakterišu se malom proizvodnjom IL-2.^{129,130}

Sepsa se karakteriše i značajnom apoptozom ćelija stečene i urođene imunosti. Hotchkiss i saradnici su objavili da je kod pacijenata sa sepsom apoptoza uzrok deplecije limfocita u slezini i limfnom tkivu creva (GALT),¹³¹ a naročito B-limfocita i CD4⁺ T-limfocita u slezini, što je bilo udruženo sa limfopenijom.¹¹⁹ Kod pacijenata sa dužim trajanjem sepse gubitak B-limfocita i CD4⁺ T-limfocita bio je izraženiji. Ista grupa je takođe pokazala da u slezinama septičnih pacijenata dolazi i do izrazitog gubitka folikulskih dendritskih ćelija (FDC), kao i do smanjenog broja interdigitalnih dendritskih ćelija (IDC). Gubitak FDC i IDC bi takođe mogao objasniti gubitak B-limfocita i CD4⁺ T-limfocita koji se viđa u sepsi, respektivno, mada je moguće i obrnuto, da gubitak limfocita dovodi do gubitka dendritskih ćelija.¹²⁰

Što se tiče apoptoze cirkulišućih limfocita, nađeno je da je apoptoza povećana kod septičnih u odnosu na neseptične pacijente i zdravu kontrolu, a pogođeni su bili i CD4⁺ i CD8⁺ T-limfociti,^{113,132,133} kao i NK ćelije.¹³² Apoptoza T-ćelija korelirala je sa aktivnošću bolesti.^{132,133}

Osim što doprinosi imunosupresiji redukcijom broja imunokompetentnih ćelija, apoptoza sama po sebi ima imunosupresivno dejstvo. Voll i saradnici stimulisali su mononuklearne ćelije periferne krvi i monocite lipopolisaharidom u prisustvu apoptotskih ćelija. Zabeležena je smanjena sekrecija TNF α , IL-1 β i IL-12, a povećana sekrecija antiinflamatornog IL-10. Takođe, injekcija apoptotskih ćelija dovela je do slabljenja reakcija kasne preosetljivosti kod miševa.¹³⁴ Drugi eksperiment je pokazao da makrofagi koji fagocituju nekrotične ćelije ushodno regulišu kostimulacioni molekul CD40, dok oni koji su fagocitovali apoptotske ćelije luče TGF- β 1 (antiinflamatorni citokin).¹³⁵

Važna post mortem studija Boomer-a i saradnika ispitivala je promene u urođenoj i stečenoj imunosti umrlih od teške sepse. Istraživači su pronašli da su splenociti umrlih od sepse proizvodili značajno manje i proinflamatornih i antiinflamatornih citokina (TNF α , IFN γ , IL-6, IL-10) nakon stimulacije lipopolisaharidom i drugim agensima. Sekrecija citokina iznosila

je 10% od sekrecije u kontrolnim splenocitima. U slezinama septičnih pacijenata došlo je do deplecije CD4⁺, CD8⁺ i HLA-DR ćelija. T-limfociti slezine imali su povećanu ekspresiju aktivacionog markera CD69 na CD4⁺ i CD8⁺ T-limfocitima, i IL-2R α (CD25) na CD4⁺ T-limfocitima. Ekspresija kostimulatornog receptora CD28 na T-limfocitima bila je smanjena, dok je ekspresija liganda za CD28, kostimulatornog CD86, bila smanjena na makrofagima i drugim antigen prezentujućim ćelijama. Inhibitorni receptor CTLA-4, koji se vezuje za iste ligande kao i CD28, pojačano je eksprimiran na CD8⁺ T-limfocitima. Ekspresija PD-1, inhibitornog receptora koji zaustavlja proliferaciju T ćelija, proizvodnju citokina i citolitičku funkciju i indukuje apoptozu,¹³⁶ bila je značajno povećana na CD4⁺ T-limfocitima, a inhibitornog liganda PD-L1 na makrofagima i drugim antigen-prezentujućim ćelijama, što je uz značajno smanjenu ekspresiju HLA-DR ukazivalo na imunosupresivni fenotip. U slezini septičnih pacijenata nađeno je dvostruko više T_{reg} ćelija nego u slezinama kontrolnih pacijenata, dok je u septičnom tkivu pluća pronađeno značajno više supresorskih ćelija mijeloidnog porekla (MDSC) u odnosu na kontrolu. Takođe, bila je redukovana i ekspresija IL-7R α na CD4⁺ i CD8⁺ T-limfocitima slezine, što ukazuje na iscrpljenost T-ćelija.¹²¹

Studija Boomer-a i saradnika identifikovala je brojne funkcionalne poremećaje stečene, ali i urođene imunosti, i to u kontekstu apoptotske deplecije imunskih ćelija, što jasno ukazuje na imunosupresiju. Na osnovu nalaza može se zaključiti da je iscrpljenost T-ćelija jedan od mehanizama imunosupresije u sepsi. Iscrpljenost T-ćelija karakteriše se progresivnim gubitkom funkcije efektorskih CD4⁺ i CD8⁺ T-limfocita u uslovima hronične aktivacije zbog stalnog prisustva antigena ili inflamacije, npr. u hroničnim virusnim infekcijama ili malignim bolestima.^{129,137-139} Među prvim funkcijama koje se gube je sposobnost sekrecije IL-2 i TNF α , a kasnije i IFN γ . Ove ćelije na površini eksprimiraju brojne inhibitorne receptore, između ostalih i PD-1 i CTLA-4,^{137,138} dok je ekspresija IL-7R α (CD127) i IL-2R β (CD122, deo receptora za IL-15) niska, te ove ćelije ne reaguju adekvatno na IL-7 i IL-15.^{137,138}

1.3.4 Supresorske ćelije u sepsi

1.3.4.1 Regulatorne T-ćelije

Regulatorne T-ćelije (T_{reg}) čine subpopulaciju T-ćelija koja ima ulogu u sprečavanju ili ograničavanju imunskog odgovora prema sopstvenim i stranim antigenima, regulišući funkciju $CD4^+$ i $CD8^+$ T-limfocita, B-limfocita i ćelija mijeloidne loze.^{140,141} Prema novoj nomenklaturi¹⁴² T_{reg} se dele na timusne T_{reg} (ranije nazvane 'prirodne' ili 'urođene') i periferne T_{reg} (ranije nazvane 'stečene' ili 'inducibilne'). T_{reg} se uobičajeno opisuju kao $CD4^+$ T-ćelije koje eksprimiraju CD25 (IL-2R α) i transkripcioni faktor Foxp3.¹⁴³ Međutim, iako se smatra da je Foxp3 ključni regulator razvoja i funkcije T_{reg} ,¹⁴⁴ opisane su različite populacije T_{reg} od kojih neke ne eksprimiraju Foxp3, npr. Tr1, periferne T_{reg} koje ne eksprimiraju ni CD25 ni Foxp3, ali proizvode IL-10 i TGF- β .¹⁴⁵⁻¹⁴⁷ Periferne T_{reg} mogu nastati diferencijacijom naivnih konvencionalnih $CD4^+CD25^-Foxp3^-$ T-limfocita u prisustvu stranih antigena i pod uticajem citokina, npr. TGF- β .^{148,149}

Ispitivano je da li ove ćelije imaju ulogu u nastanku imunoparalize u sepsi. Monneret i saradnici prvi su objavili da je kod pacijenata sa septičnim šokom povećan broj cirkulišućih $CD4^+CD25^+$ supresorskih T-ćelija, a povišene vrednosti ovih ćelija perzistirale su samo kod umrlih.¹⁵⁰ Drugi eksperimenti su pokazali da je veći procenat T_{reg} ćelija u septičnom šoku posledica smanjenog broja ukupnih efektorskih $CD4^+$, pa i $CD4^+CD25^-CD127^+$ T-ćelija, što ukazuje na to da bi $CD4^+CD25^+CD127^-$ T_{reg} mogle biti rezistentnije na apoptozu, ali i da bi mogle imati ulogu u nastanku limfocitne anergije u sepsi.^{143,151}

Regulatorne T-ćelije imaju uticaj i na monocite/makrofage. One mogu da indukuju alternativnu aktivaciju monocita/makrofaga, sa smanjenom ekspresijom HLA-DR i CD86, i mogu da inhibiraju proinflamatorni odgovor monocita/makrofaga na LPS, sa smanjenom proizvodnjom proinflamatornih citokina i povećanom proizvodnjom antiinflamatornih IL-1Ra i IL-10. U ovoj supresiji važnu ulogu imaju IL-10, IL-4 i IL-13 koje proizvode $CD4^+CD25^+CD127^{low}Foxp3^+$ regulatorne T-ćelije.¹⁵² Leng i saradnici su pokazali da je kod pacijenta sa septičnim šokom povećana proporcija $CD4^+CD25^+Foxp3^+$ T_{reg} ćelija, a bili su povišeni i nivoi IFN γ , IL-4 i odnos IFN γ /IL-4. Nalaz je ukazao na to da su i pro- i antiinflamatorni odgovori aktivni u ranim fazama septičnog šoka.¹⁵³ Novija studija je pokazala da T_{reg} mogu da, posredstvom TGF- β , pojačaju inhibitorne funkcije MDSC i da, u prisustvu GM-CSF i IL-4, moduliraju njihovu diferencijaciju.¹⁵⁴

1.3.4.2 Supresorske ćelije mijeloidnog porekla (MDSC)

MDSC su heterogena populacija ćelija mijeloidnog porekla u različitim stadijumima diferencijacije koja uključuje mijeloidne progenitore i nezrele mijeloidne ćelije (makrofage, granulocite i dendritske ćelije).^{155,156} Ove ćelije su snažni supresori imunskih odgovora, a javljaju se u različitim patološkim stanjima sa akutnom i hroničnom inflamacijom, uključujući sepsu. Iako heterogene, imaju nekoliko zajedničkih osobina: one ne eksprimiraju ili slabo eksprimiraju markere zrelih mijeloidnih ćelija, ne diferencijiraju se u prisustvu faktora koje proizvode tumori, proizvode velike količine reaktivnih vrsta kiseonika (ROS), pokazuju aktivnost arginaze 1 i dr.¹⁵⁵

Pojava imunosupresivnih ćelija u kostnoj srži, sekundarnim limfnim organima i tumorskim tkivima uočena je još osamdesetih i devedesetih godina XX veka kod miševa¹⁵⁷⁻¹⁵⁹ i ljudi sa tumorima,¹⁶⁰ a ove ćelije su nazvane 'prirodnim supresorskim ćelijama',^{161,162} ili 'null' ćelijama^{157,163} s obzirom na to da nisu eksprimirale markere ni T-, ni B-, ni NK ćelija, a ni makrofaga.¹⁶⁴ Tokom dvehiljaditih je potvrđeno da se ove ćelije javljaju u raznim tipovima tumora, ali i u akutnim i hroničnim infekcijama, sepsi, infestaciji parazitima, traumi, opekotinama, autoimunskim bolestima, i dr.¹⁶⁵⁻¹⁶⁷ Međutim, ova heterogena populacija je i dalje bila različito imenovana u literaturi kao 'nezrele mijeloidne ćelije', 'supresorski makrofagi', 'supresorske mijeloidne ćelije', pa je grupa eksperata, da bi se izbegla dalja konfuzija, predložila naziv 'supresorske ćelije mijeloidnog porekla' što je konsenzusom i usvojeno.^{155,168}

Podvrste i fenotip MDSC

Mnoge informacije o MDSC dobijene su iz eksperimenata na mišjim modelima bolesti. Mišje MDSC imaju nekoliko zajedničkih osobina: one koeksprimiraju antigene diferencijacije mijeloidne loze Gr-1 i CD11b,^{169,170} ne eksprimiraju ili slabo eksprimiraju druge markere zrelih mijeloidnih ćelija (npr. CD11c, MHC molekule II klase) iako su im morfološki slične, imaju pojačanu ekspresiju enzima arginaze i inducibilne sintaze azot monoksida (iNOS), povećanu proizvodnju ROS¹⁷¹ i reaktivnih vrsta azota (RNS) i moćno suprimiraju antigen-specifične CD4⁺ i CD8⁺ T-ćelijske odgovore.^{156,172,173} Antigen Gr-1 ima dva epitopa, Ly6G i Ly6C, koja se mogu detektovati pomoću specifičnih antitela. Upotreba anti-Ly6G i anti-Ly6C antitela dovela je do identifikacije dve podvrste MDSC: monocitne MDSC sa fenotipom CD11b⁺Ly6G⁺Ly6C^{high} (M-MDSC) i polimorfonuklearne ili granulocitne MDSC

sa fenotipom $CD11b^+Ly6G^+Ly6C^{low}$ (PMN-MDSC) (**Tabela 5**). Obe podvrste MDSC suprimiraju funkciju $CD8^+$ T-limfocita, ali su mehanizmi supresije različiti. ^{174,175}

Kod ljudi je identifikacija MDSC značajno otežana zbog nepostojanja dobrog markera kakav je Gr-1 antigen. ¹⁷³ Prema preporukama iz 2016, kod ljudi se razlikuju tri glavne populacije MDSC: polimorfonuklearne PMN-MDSC, monocitne M-MDSC i eMDSC. ¹⁷⁶ Fenotipski, PMN-MDSC se definišu kao $CD11b^+CD14^-CD15^+$ (ili $CD66b^+$), a M-MDSC kao $CD11b^+CD14^+CD15^-HLA-DR^{-/low}$ ćelije. Rane MDSC (eMDSC) sa fenotipom Lin^- (uključuje $CD3, CD14, CD15, CD19, CD56$)/ $HLA-DR^-/CD33^+$ sadrže nezrelije progenitorske ćelije. ¹⁷⁶ Fenotipske karakteristike mišjih i ljudskih MDSC prikazane su u **Tabeli 5**.

Međutim, trenutno ne postoji nijedan marker koji bi bio karakterističan isključivo za MDSC. Nedavno su Condamine i saradnici predložili novi marker za PMN-MDSC, oksidisani LDL receptor lektinskog tipa-1 (LOX-1) koji je bio ushodno regulisan na polimorfonuklearima iz tumorskog tkiva koji su imali moćnu imunosupresivnu aktivnost i druge karakteristike PMN-MDSC, a nije se mogao detektovati na polimorfonuklearima u perifernoj krvi zdravih donora. ¹⁷⁷

	Mišje MDSC	Ljudske MDSC
PMN-MDSC	$CD11b^+Ly6G^+Ly6C^{low}$	$CD11b^+CD14^-CD15^+$ ili $CD11b^+CD14^-CD66b^+$
M-MDSC	$CD11b^+Ly6G^-Ly6C^{high}$	$CD11b^+CD14^+CD15^-HLA-DR^{-/low}$
eMDSC	Nisu jasno definisane	$Lin^-(CD3/14/15/19/56)/HLA-DR^-/CD33^+$

Tabela 5. Fenotipske karakteristike mišjih i ljudskih MDSC. Minimum dijagnostičkih kriterijuma za fenotipsku identifikaciju polimorfonuklearnih, monocitnih i ranih MDSC (PMN-MDSC, M-MDSC, eMDSC, respektivno). Prema *Bronte et al.* ¹⁷⁶

Ekspanzija i aktivacija MDSC

Kod zdravih osoba PMN-MDSC ne mogu se naći u krvi, dok su M-MDSC prisutne u veoma malom broju među mononuklearnim ćelijama periferne krvi.¹⁷⁸ Vrednosti ovih ćelija se povećavaju u raznim patološkim stanjima, uključujući i infekcije.

Kada receptori za prepoznavanje obrazaca (TLR i dr.) na endotelnim i ćelijama urodene imunosti prepoznaju PAMP i DAMP dolazi do oslobađanja citokina, hemokina i drugih medijatora zapaljenja, što stimuliše mobilizaciju i migraciju neutrofila i monocita iz krvi i kostne srži u pravcu inficiranog ili oštećenog tkiva prateći hemotaktički gradijent.^{36,179–182} Ubrzana migracija neutrofila iz kostne srži dovodi do reaktivne neutrofilije, sa pojavom nezrelih oblika ćelija u krvi, poput štapićastih neutrofila.^{183,184} Pražnjenje niša kostne srži u odgovoru na inflamaciju i oslobađanje lokalnih medijatora aktivira hematopoezu na takav način da dolazi do ekspanzije mijeloidne loze na račun limfopoeze.^{183,185,186} Ovaj odgovor na inflamaciju sa brzim nastankom efektorskih mijeloidnih ćelija naziva se urgentnom mijelopoezom-granulopoezom.^{173,187} Studije su pokazale da u ovom procesu dolazi do smanjenja nivoa hemokina CXCL12, koji pruža retencione signale za neutrofile i limfocite kostne srži, s tim da nezreli neutrofile reaguju na znatno niže koncentracije CXCL12. Sa smanjenjem koncentracije CXCL12 pod uticajem inflamacije limfociti se mobilisu, a posledično dolazi do ekspanzije mijeloidne loze.^{183,185} Blokada CXCR4/CXCL12 signalizacije u eksperimentalnoj polimikrobnoj infekciji pokazala je da CXCL12 ne utiče na hematopoetske stem ćelije, zajedničke mijeloidne progenitore, ni granulocitno-monocitne progenitore, ukazujući na to da CXCL12 ne reguliše razvoj neutrofilnih progenitora u akutnoj polimikrobnoj sepsi.¹⁷⁹

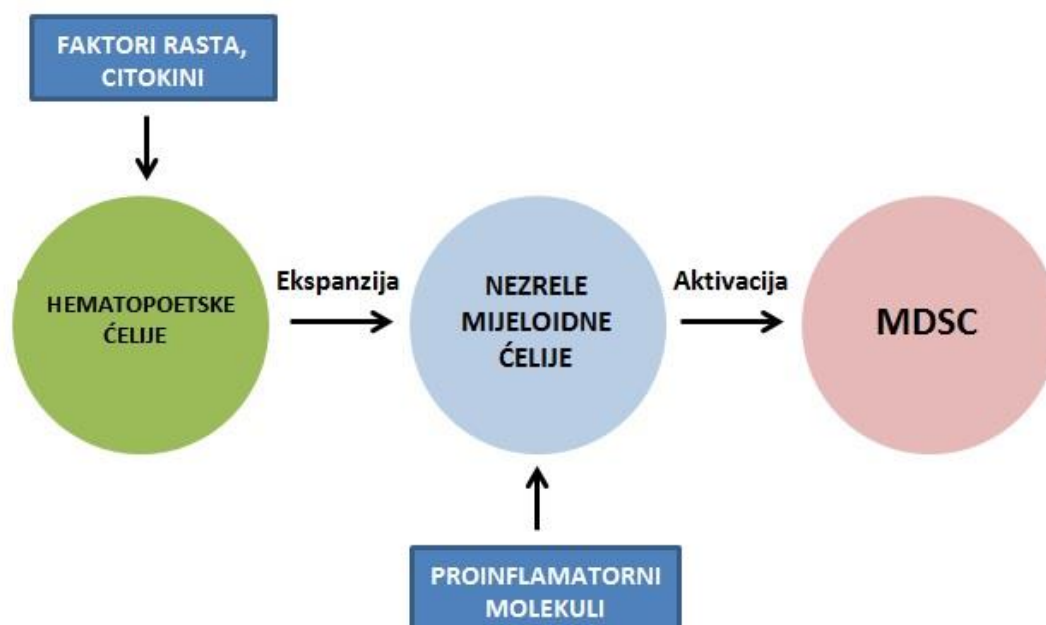
U fiziološkim uslovima iz hematopoetskih matičnih ćelija diferencijacijom preko zajedničkih mijeloidnih progenitora i granulocitno-monocitnih progenitora nastaju nezrele mijeloidne ćelije koje se diferenciraju u zrele granulocite, makrofage i dendritske ćelije.¹⁵⁶ Smatra se da u raznim patološkim uslovima koji dovode do urgentne mijelopoeze, pa i u sepsi, usled perzistentne stimulacije relativno slabijim signalima dolazi do delimičnog bloka u diferencijaciji nezrelih mijeloidnih ćelija i njihove patološke aktivacije kada stiču sposobnost supresije stečene imunosti. Ovakve ćelije, koje danas nazivamo supresorskim ćelijama mijeloidnog porekla, slabi su fagociti, ispoljavaju povećanu aktivnost arginaze 1, iNOS i NOX2, i proizvode antiinflamatorne citokine, poput IL-10 i TGF- β .^{156,173,188}

U pokušaju da se objasni nastanak i aktivacija MDSC u različitim patološkim stanjima, predložena su dva modela. Prema modelu jednog signala, isti faktori iniciraju i ekspanziju nezrelih mijeloidnih ćelija i njihovu aktivaciju u pravcu imunosupresivnih MDSC. Prema modelu dva signala (**Slika 2**), ekspanzija i aktivacija MDSC dva su procesa kojima upravljaju različiti signali, pri čemu je prva grupa signala odgovorna za ekspanziju nezrelih mijeloidnih ćelija, a druga za aktivaciju ovih ćelija i nastanak MDSC, mada je moguće njihovo preklapanje.¹⁸⁹ U prilog modela sa dva signala govori nedavna studija koja je pokazala da je za indukovanje imunosupresivne funkcije neophodno, ali ne i dovoljno, izlaganje ćelija faktoru stimulacije kolonija granulocita i makrofaga (GM-CSF). Drugi signal za ekspresiju iNOS i nastanak M-MDSC obezbedila je stimulacija interferonom- γ i lipopolisaharidom.¹⁹⁰

U uslovima homeostaze i u inflamaciji na proliferaciju stem i progenitorskih ćelija zajedničkim dejstvom utiču različiti citokini i faktori rasta, poput GM-CSF, G-CSF, M-CSF, SCF, IL-3, IL-6, citokina FLT3L, VEGF, IL-17, i dr.¹⁹⁰⁻¹⁹⁵ Signale za aktivaciju MDSC obezbeđuju različiti citokini, PAMP i DAMP, poput IFN γ , IL-1 β , IL-6, IL-13, IL-4, TGF- β , TNF α , prostaglandina E2, liganada za TLR i dr. U *in vitro* i *in vivo* uslovima kombinacijom više faktora dolazi do ekspanzije i aktivacije MDSC, uz sprečavanje njihove diferencijacije u zrele granulocite, makrofage i DC.^{154,190,193,196-200} Takođe, hemotaktički alarmini S100A8/A9, osim proinflamatorne, imaju i antiinflamatornu ulogu tako što blokiraju diferencijaciju makrofaga i DC povećavajući proizvodnju ROS, što dovodi do ekspanzije i akumulacije MDSC.²⁰¹ Osim toga, Dai i saradnici su pokazali da u kasnoj sepsi dolazi do translokacije nefosforilisanog S100A9 iz citosola u nukleus gde pospešuje ekspresiju miR-21 i miR-181b, imunosupresivnih nekodirajućih RNK.²⁰² Smatra se da bi S100A8/A9 heterodimeri i/ili sam S100A9 mogli učestvovati i u aktivaciji MDSC vezujući se za karboksilisane N-glikane receptora na površini ćelije čime se aktivira signalni put NF- κ B, kao i pomenutom regulacijom proizvodnje ROS.^{156,201,203}

Navedeni faktori ispoljavaju dejstvo preko različitih signalnih puteva koji dovode do promena u transkripciji gena.¹⁸⁸ Za ekspanziju MDSC važan je signalni put Jak/STAT, a posebno aktivacija STAT3, čiji su ligandi, između ostalih, i IL-6, IL-10, G-CSF i GM-CSF,^{188,204,205} i STAT5, kojeg aktiviraju IL-3, GM-CSF i dr. Aktivacija STAT3 pospešuje proliferaciju mijeloidnih ćelija, reguliše diferencijaciju i sprečava apoptozu ushodnom regulacijom antiapoptotskih gena. STAT3 takođe dovodi do povećane ekspresije

transkripcionog faktora C/EBP β i S100A8/A9, što pospešuje ekspanziju MDSC. ^{189,206} Drugi signalni putevi i transkripcioni faktori za koje se smatra da imaju ulogu u ekspanziji MDSC su transkripcioni faktor NFI-A koji sprečava diferencijaciju monocita i granulocita, signalni put PI3K/AKT/mTOR, MAPK signalni put i dr. ^{188–190,207–210}



Slika 2. Ekspanzija i aktivacija MDSC prema modelu dva signala.

Na aktivaciju MDSC utiču STAT1 (posreduje u odgovoru na IFN γ , IFN tip 1 i IL-6; dovodi do ushodne regulacije arginaze 1 i iNOS), STAT3 (ushodna regulacija NOX2 i proizvodnja ROS), STAT6 (vezivanjem IL-4 i IL-13 za IL-4R α dolazi do povećane ekspresije arginaze 1 i povećane proizvodnje TGF- β), NF- κ B i dr. ^{166,188,189} Transkripcioni faktor NF- κ B mogu aktivirati brojni stimulusi, između ostalih i IL-1 β , TNF α i ligandi za TLR (npr. LPS, heterodimer S100A8/A9), a svi ovi faktori povećavaju supresivnu aktivnost MDSC. ^{188,211}

Mehanizmi dejstva MDSC

MDSC mogu da blokiraju antigen-specifičnu i nespecifičnu aktivaciju T-ćelija na različite načine, delujući i na CD4⁺ i na CD8⁺ T-limfocite (**Slika 3**). ^{169,212,213} MDSC ispoljavaju ovo dejstvo u direktnom ćelijskom kontaktu, što ukazuje na to da deluju preko receptora i/ili kratkoživućih medijatora, ^{156,205,214} pri čemu može, a ne mora, da postoji MHC restrikcija. ^{169,170,212} Za supresivnu aktivnost MDSC naročito su važne aktivnosti arginaze 1, iNOS i proizvodnja ROS.

Arginazu 1 podjednako eksprimiraju i PMN-MDSC i M-MDSC, ali se ove podvrste MDSC razlikuju po proizvodnji ROS i RNS: PMN-MDSC proizvode velike količine ROS aktivnošću NADPH oksidaze 2 (NOX 2), a male količine RNS, dok M-MDSC aktivnošću iNOS proizvode velike količine RNS, poput azot-monoksida (NO), a male količine ROS. ^{174,175}

Supstrat za arginazu 1 i iNOS je L-arginin, ²¹⁵ uslovno esencijalna amino-kiselina, neophodna za funkciju T-limfocita. Dejstvom arginaze 1 na L-arginin nastaje L-ornitin, prekursor poliamina neophodnih za proliferaciju ćelije, a dejstvom iNOS na L-arginin nastaje NO, sa različitim biološkim aktivnostima. ²¹⁵⁻²¹⁷ Oba enzima smanjuju koncentraciju L-arginina u lokalnom miljeu što, uz proizvodnju ROS i RNS, putem različitih mehanizama dovodi do supresije proliferacije i antigen-specifičnih odgovora T-ćelija. Zbog deplecije arginina smanjene su proliferacija T-ćelija, proizvodnja citokina i ekspresija CD3 ζ lanca kompleksa T-ćelijskog receptora (TCR). CD3 ζ je važan za prenošenje signala koji nastaju kad TCR prepozna antigen, pa usled njegove smanjene ekspresije izostaje aktivacija T-limfocita, tj. dolazi do anergije T-ćelija. ^{218,219}

Reaktivne vrste kiseonika takođe izazivaju antigen-specifičnu inhibiciju T-ćelija u direktnom međućelijskom kontaktu. Ulogu u imunosupresiji do koje dovode ROS imaju i adhezivni molekuli, integrini poput CD11b, tako što doprinose povećanoj proizvodnji ROS nakon kontakta MDSC sa T-limfocitima. U studiji je pokazano da je proizvodnja ROS zavisila od aktivnosti arginaze, a da je primena inhibitora ROS potpuno zaustavila antigen-specifične inhibitorne efekte MDSC. ¹⁷¹ Studije na drugim modelima pokazale su da proizvodnja ROS može, a ne mora, da zavisi od aktivnosti arginaze. ²¹⁴ Pojedini citokini i faktori rasta stimulišu proizvodnju ROS, npr. IL-1 β , TNF α , IL-6, IL-3, TGF- β , GM-CSF i dr. ²²⁰

Međućelijski kontakt je nepohodan i za supresiju T-ćelija pri koekspresiji arginaze 1 i iNOS. U uslovima smanjene količine L-arginina, iNOS, osim što proizvodi NO, proizvodi i superoksid koji reaguje sa NO i nastaje peroksinitrit, snažan oksidans. ²²¹ Studija Nagaraja i saradnika ispitivala je mehanizam nastanka anergije T-limfocita pod uticajem MDSC. Pokazano je da u nastanku antigen-specifične tolerancije CD8⁺ T-ćelija učestvuju ROS i peroksinitrit koji modifikuju molekule TCR i CD8 tako da T ćelije ne mogu da prepoznaju antigen. Za inhibiciju je važno prisustvo MHC molekula I klase. U eksperimentu, MDSC nisu uticale na ekspresiju TCR i CD8, već je pod dejstvom peroksinitrita došlo do nitracije amino-

kiseline tirozina u TCR i CD8, a nastali nitrotirozin se mogao detektovati prvo na mestima interakcije MDSC i T-ćelija, a kasnije i difuzno. U odsustvu ROS ili peroksinitrita ovi tolerogeni efekti MDSC potpuno su izostali. Pokazano je i da NO nije odgovoran za antigen-specifičnu toleranciju CD8⁺ T-limfocita. Takođe, peroksinitrit dovodi do nitracije i drugih amino-kiselina (cisteina, metionina, triptofana), ali se nitrotirozin koristi kao biomarker oksidativnog oštećenja. ²²²

MDSC mogu da indukuju nastanak i proliferaciju T_{reg} na različite načine. Na primer, Huang i saradnici su pokazali da MDSC mogu da indukuju razvoj Foxp3⁺ T_{reg} kod miševa sa tumorima, što je zahtevalo aktivaciju tumor specifičnih T-ćelija i prisustvo IFN γ i IL-10, a nije zavisilo od iNOS i NO. Takođe, MDSC su sekretovale IL-10 i TGF- β pri stimulaciji interferonom- γ kojeg oslobađaju aktivirane T-ćelije. ²²³ S druge strane, Serafini i saradnici su pokazali da su MDSC značajno stimulisale proliferaciju Foxp3⁺ T_{reg} iz već postojeće populacije T_{reg}, a da nisu indukovale konverziju naivnih/efektorskih T-ćelija; da su MDSC delovale kao tolerogene antigen prezentujuće ćelije, da je za ovu stimulaciju neophodna aktivnost arginaze 1, a da je proces nezavisan od TGF- β . ²²⁴

Još jedan mehanizam koji doprinosi imunosupresiji koju izazivaju MDSC je sekvestracija cisteina. ²²⁵ T-limfociti ne mogu da proizvedu cistein i moraju ga preuzimati iz ekstracelularne sredine. Najveću potrebu za cisteinom T-limfociti imaju kad su aktivirani antigenom, što dovodi do proliferacije i diferencijacije, i tada su izvor cisteina za T-limfocite antigen prezentujuće ćelije. ²²⁶ Srivastava i saradnici su pokazali da za razliku od antigen prezentujućih ćelija, MDSC ne mogu da isporuče cistein T-ćelijama jer nemaju ASC transporter amino-kiselina. Istovremeno, MDSC preuzimaju cistein iz ekstracelularne sredine čime smanjuju njegovu dostupnost za antigen prezentujuće ćelije i dodatno lišavaju T-limfocite ove za njih esencijalne amino-kiseline. Konačni rezultat je inhibicija funkcije T-ćelija. ²²⁵

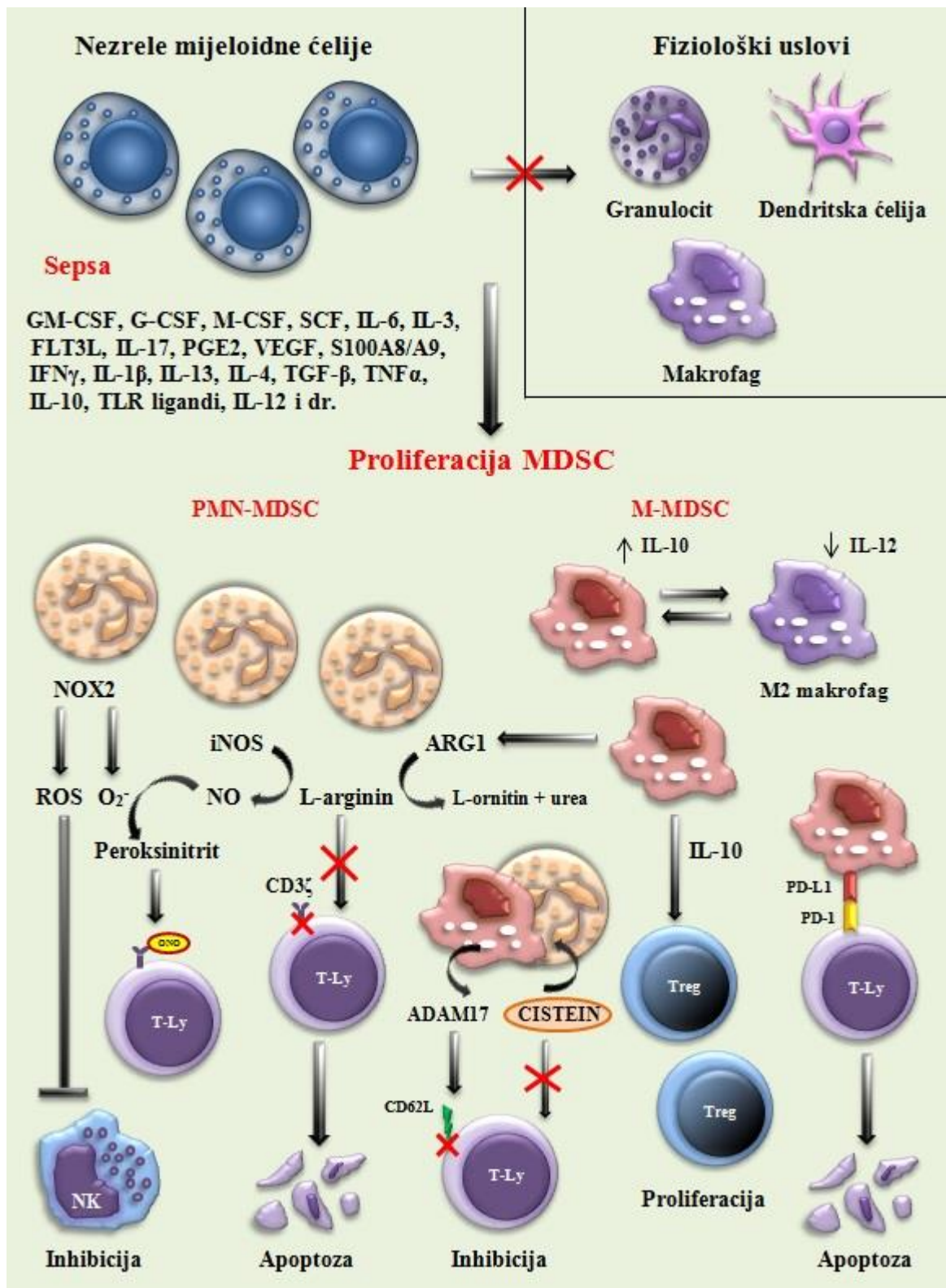
Hanson i saradnici su predložili mehanizam po kojem bi MDSC ometale limfocite u selektivnoj migraciji do mesta inflamacije. ²²⁷ Naivni T-limfociti eksprimiraju adhezivni molekul L-selektin (CD62L) koji ih, zajedno sa hemokinskim receptorom CCR7, usmerava ka sekundarnim limfnim organima gde dolaze u kontakt sa antigenima i aktiviraju se, nakon čega prestaje ekspresija L-selektina. ³⁶ L-selektin takođe usmerava naivne limfocite ka mestu inflamacije ili oštećenja tkiva gde se mogu aktivirati. ²²⁸ Studija je pokazala da MDSC, a ne

aktivacija limfocita, dovode do smanjene ekspresije L-selektina na CD4⁺ i CD8⁺ T-limfocitima, dejstvom proteolitičkog enzima ADAM17 kojeg MDSC konstitutivno ekspimiraju. Na ovaj način se sprečava aktivacija T-limfocita i nastanak efektorskih ćelija.

227

MDSC mogu uticati na izmenu fenotipa i aktivnost makrofaga. Klasični put aktivacije makrofaga pokreću IFN γ i ligandi (npr. bakterijski endotoksin) koji se vezuju za TLR. Klasično aktivirani makrofagi (M1) proizvode ROS i NO i ubijaju fagocitovane patogene, luče proinflamatorne medijatore, poput IL-1 β , TNF α i IL-12, i pojačano ekspimiraju MHC molekule II klase i kostimulatore. Za razliku od klasične, na alternativnu aktivaciju makrofaga utiču IL-4 i IL-13 signalizacijom preko STAT6, a ovi M2 makrofagi imaju smanjenu proizvodnju IL-12 i povećanu proizvodnju IL-10 i TGF- β . Njihov fenotip je antiinflamatorni.³⁶ Sinha i saradnici su pokazali da MDSC dovode do smanjene makrofagne proizvodnje IL-12, a da makrofagi utiču na MDSC tako da proizvode više IL-10. Za ovaj uticaj potreban je direktan međućelijski kontakt, i zavisen je od proizvodnje IL-10 od strane MDSC.²²⁹

Opisani su i drugi mehanizmi dejstva MDSC: smanjena intracelularna količina L-arginina indukuje apotpozu T-limfocita,²³⁰ supresija NK ćelija posredstvom TGF- β ²³¹ ili ROS²³², ekspresija PD-L1 na MDSC koji, vezivanjem za PD-1 na T-limfocitima, indukuje anergiju i apoptozu T-ćelija^{136,233,234} i dr.



Slika 3. Nastanak i mehanizmi dejstva MDSC. U fiziološkim uslovima nezrele mijeloidne ćelije diferentuju se u zrele mijeloidne ćelije. U sepsi dolazi do blokade diferencijacije nezrelih mijeloidnih ćelija pod uticajem različitih proinflamatornih i antiinflamatornih citokina, faktora rasta i dr. i nastaju MDSC. Shematski su prikazani brojni mehanizmi dejstva MDSC. Modifikovano i prilagođeno prema *Mira et al.*⁴

1.4 Sepsa kao hronična kritična bolest

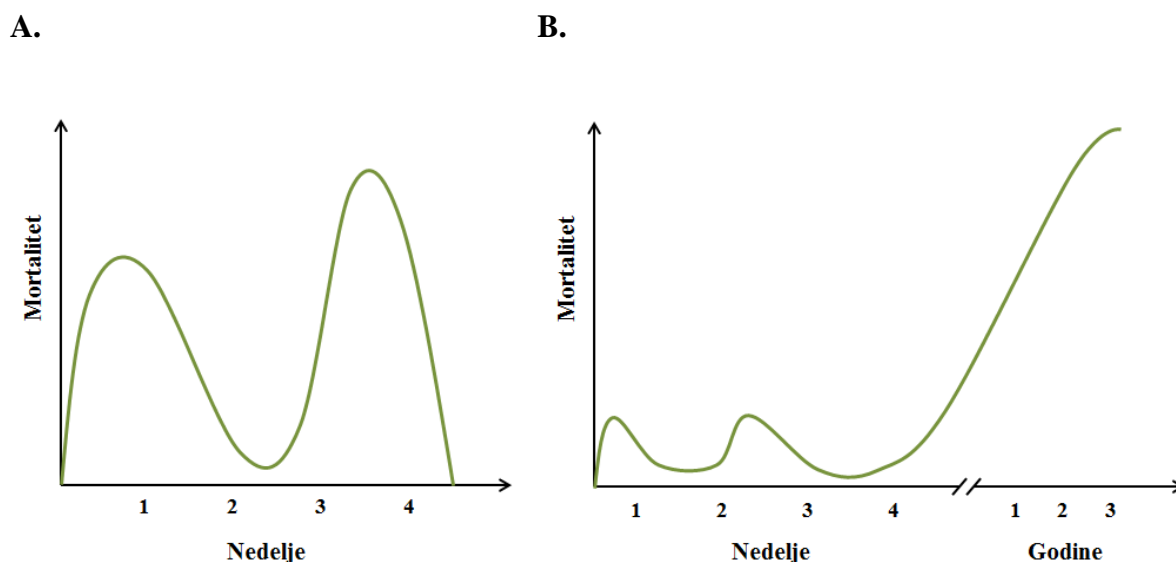
Zahvaljujući poboljšanju u ranoj dijagnostici sepse i savremenim, pravovremenim i adekvatnim terapijskim merama većina pacijenata danas preživi početnu hiperinflamatornu fazu sepse. Jedan deo pacijenata ima nekomplikovan klinički tok i potpuno se rehabilituje, dok se drugi deo preživelih nikad ne oporavi u potpunosti razvijajući hroničnu kritičnu bolest.

4

Iako nema konsenzusa o definiciji hronične kritične bolesti, ²³⁵ tipični pacijent ima komplikovan tok bolesti koji zahteva duže lečenje u JIL, neophodna mu je produžena mehanička ventilacija (duža od 21 uzastopnog dana, najmanje 6 sati dnevno), ²³⁶ urađena mu je traheotomija, ima moždanu disfunkciju, neuromišićnu slabost i neuroendokrine poremećaje, sklon je infekcijama, gubi mišićnu masu, dobija dekubituse i dr. ^{235–237} Studija u SAD pronašla je da je među pacijentima koji pate od hronične kritične bolesti više od 60% primljeno u JIL sa dijagnozom sepse. ²³⁸ Dugoročna prognoza za ove pacijente je veoma nepovoljna – jednogodišnje preživljavanje pacijenata sa hroničnom kritičnom bolešću je između 48% i 68% (**Slika 4**). ^{37,235,237,239,240} Većina preživelih ima funkcionalne i kognitivne deficite, a manje od 12% je funkcionalno nezavisno nakon godinu dana. ^{236,237,241}

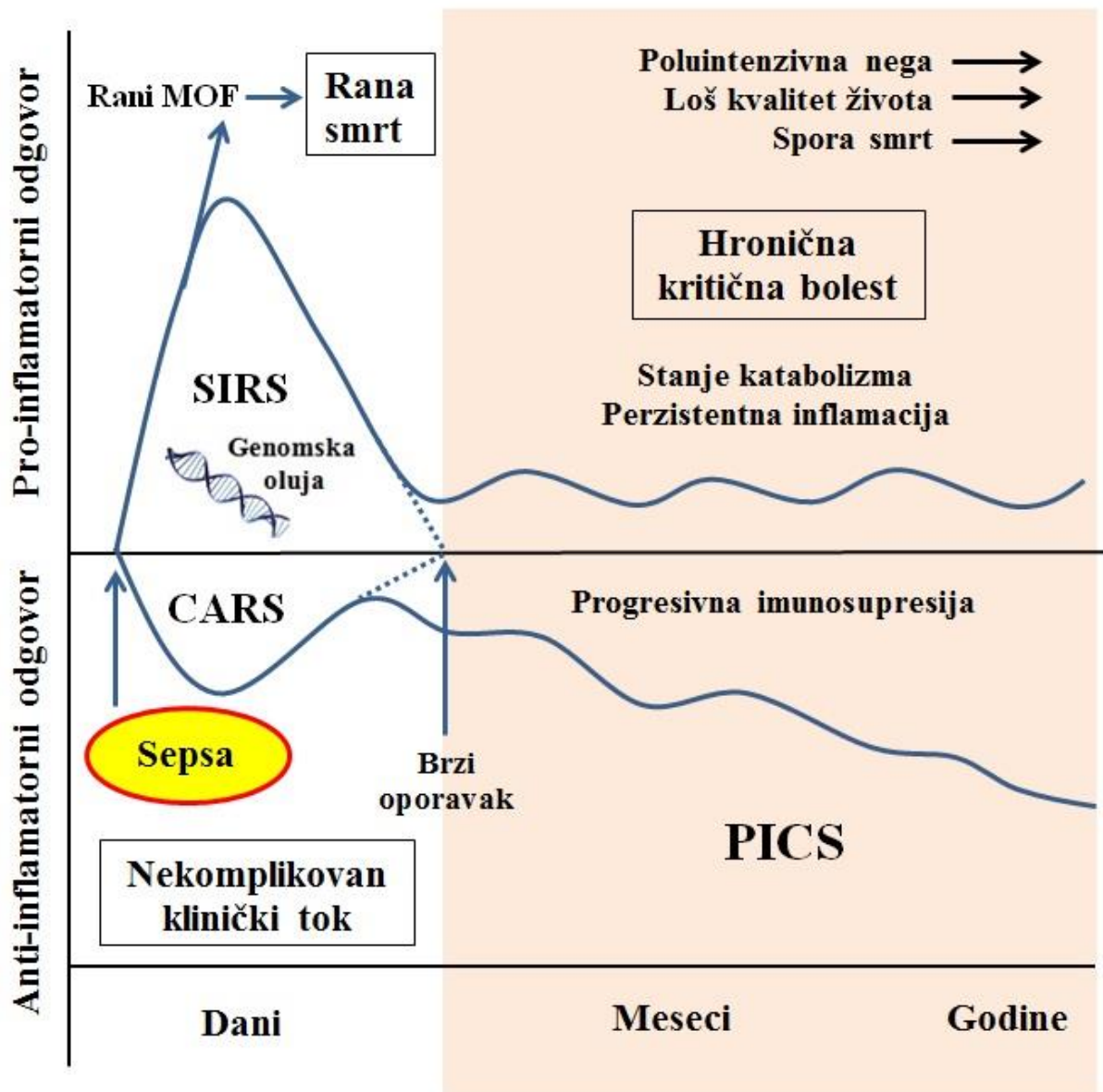
1.4.1 Sindrom perzistentne inflamacije, imunosupresije i katabolizma (PICS)

Pre nekoliko godina Gentileova i saradnici predložili su novi sindrom perzistentne inflamacije, imunosupresije i katabolizma (PICS) da opišu pacijente koji su preživeli inicijalni septični insult, ali dugo borave u JIL (> 14 dana) sa umerenim organskim disfunkcijama koje se mogu zbrinjavati, imaju perzistentnu inflamaciju niskog stepena, progresivan katabolizam proteina i loš nutritivni status koji dovodi do kaheksije, lošeg zarastanja rana i pojave dekubitusa, te imunosupresiju zbog čega su skloni sekundarnim, nozokomijalnim infekcijama (**Slika 5**). ^{4,242} Autori smatraju da ovaj fenotip odgovara jednom delu pacijenata sa hroničnom kritičnom bolešću i predlažu kriterijume za dijagnozu PICS-a prikazane u **Tabeli 6**.



Kao što je prikazano na **Slici 5**, ovi pacijenti se po otpustu iz bolnice retko potpuno rehabilituju i zahtevaju produženo lečenje i negu, umirući sporom smrću. Često imaju novonastala funkcionalna ograničenja i kognitivna oštećenja pa im je neophodna pomoć u svakodnevnom životu.²⁴³ Dugoročni mortalitet ovih pacijenata je takođe značajno povećan, ali se izveštaji o mortalitetu razlikuju u zavisnosti od praćene kohorte: jednogodišnji mortalitet je u rasponu od 11% do 42,5%, dok je mortalitet 2-5 godina nakon sepse u rasponu od 29% do 45%.²⁴⁴⁻²⁴⁶

Prema predloženoj patogenezi PICS-a važnu ulogu u ovom sindromu imaju supresorske ćelije mijeloidnog porekla (MDSC). Infekcija, odnosno molekularni obrasci patogena (PAMP), pokreću urgentnu mijelopoezu i pojavu MDSC u kostnoj srži i sekundarnim limfnim organima. Dugotrajna izloženost dejstvu ovih ćelija dovodi do perzistentne inflamacije i istovremene supresije urođene i, naročito, stečene imunosti, a pacijenti razvijaju hroničnu kritičnu bolest sa fenotipom PICS-a.^{4,242,247}



Slika 5. Model PICS-a. Na početku sepse istovremeno se pokreću proinflamatorni i antiinflamatorni odgovor. Ranu fazu sepse karakterišu genomska i citokinska oluja. Ako prežive ranu hiperinflamatornu fazu i rano nastalu multiplu organsku insuficijenciju (MOF), pacijenti se mogu brzo oporaviti ili razviti hroničnu kritičnu bolest i PICS. Modifikovano i prilagođeno prema Mira *et al.*⁴ i Hawkins *et al.*²⁴⁷

Međutim, perzistentna inflamacija postoji i u odsustvu izvora infekcije, odnosno u odsustvu egzogenih PAMP. U ovom slučaju, pokretači inflamacije su endogeni alarmini ili molekularni obrasci oštećenja (DAMP) koji se oslobađaju iz nekrotičnih ćelija ili se sekretuju u odgovoru na celularni stres.^{4,247} Smatra se da su primarni izvor alarmina oštećeni bubrezi i skeletni mišići,²⁴⁷ ali mogu poticati i iz pluća, digestivnog trakta i drugih organa, uključujući dijafragmu, za koju je potvrđeno da ima izrazit gubitak mišićne mase tokom produžene

mehaničke ventilacije.^{4,248,249} Posledica trajnog endogenog oslobađanja alarmina je perzistentna inflamacija koja dovodi do skretanja hematopoeze u pravcu mijelopoeze, sa ekspanzijom imunosupresivnih i proinflamatornih MDSC, a na račun limfopoeze i eritropoeze, čime se delimično objašnjavaju limfopenija i anemija kod pacijenata sa PICS-om.²⁴⁷ Pacijenti su podložni nastanku sekundarnih nozokomijalnih infekcija i reaktivaciji latentnih virusa čime se ponovo pokreće začarani krug inflamacije, imunosupresije i katabolizma.^{4,247}

Kriterijumi za PICS	
Perzistencija	Produžen boravak u JIL (> 14 dana)
Inflamacija	C-reaktivni protein > 50 µg/dl
Imunosupresija	Ukupni limfociti < 0,8 x 10 ⁹ /l
Katabolizam	Gubitak težine > 10% tokom hospitalizacije ili Indeks telesne mase < 18
	Albumini u serumu < 30,0 g/l

Tabela 6. Kriterijumi za sindrom perzistentne inflamacije-imunosupresije i katabolizma (PICS). Prilagođeno prema *Mira et al.*⁴

MDSC su detektovane kod pacijenata sa akutnom sepsom,²⁵⁰⁻²⁵³ pri čemu je visoka učestalost M-MDSC uočena i u Gram-pozitivnoj i u Gram-negativnoj sepsi, ali su PMN-MDSC dominirale u Gram-pozitivnoj sepsi.²⁵¹

U opservacionoj studiji koja je ispitala ulogu MDSC u razvoju hronične imunosupresije nakon teške sepse/septičnog šoka nađeno je da kod pacijenata sa teškom sepsom ili septičnim šokom dolazi do akutnog porasta vrednosti MDSC, a da su značajno povišene vrednosti perzistirale tokom svih 28 dana praćenja pacijenata. Ovo povećanje bilo je posledica porasta procenta PMN-MDSC, dok je procenat M-MDSC bio značajno snižen u poređenju sa zdravom kontrolom. MDSC su suprimirale T-ćelijsku proizvodnju i Th1 i Th2 citokina, imale su smanjenu ekspresiju HLA-DR, povećanu ekspresiju arginaze 1, kao i povećanu proizvodnju NO i ROS, što je u skladu sa istovremenom inflamatornom i imunosupresivnom funkcijom MDSC. Povećani procenti MDSC bili su udruženi sa ranim mortalitetom, ali i sa

produženim boravkom u JIL, razvojem nozokomijalnih infekcija i lošim funkcionalnim statusom na otpustu, što ukazuje na PICS.²⁵²

Klinička studija objavljena 2017. godine pružila je dokaz za postojanje perzistentne imunosupresije kod hronično kritično obolelih pacijenata koji su preživeli sepsu. Upoređivani su biomarkeri imunosupresije (apsolutni broj limfocita, ekspresija HLA-DR, koncentracija solubilnog PD-L1) i incidenca sekundarnih infekcija kod pacijenata koji su se brzo oporavili nakon sepse i onih koji su razvili hroničnu kritičnu bolest. Više od 70% pacijenta sa hroničnom kritičnom bolešću razvilo je sekundarnu bolničku infekciju, u poređenju sa 6% pacijenta koji su se brzo oporavili nakon sepse. Pacijenti koji su razvili hroničnu kritičnu bolest imali su i značajno veći tridesetodnevni i šestomesečni mortalitet u odnosu na one koji su se brzo oporavili, 11,4 prema 0 % i 25,7 prema 4,0%, respektivno. Obe grupe pacijenata imale su značajno niži apsolutni broj limfocita, izrazito smanjenu ekspresiju HLA-DR i povišene vrednosti solubilnog PD-L1 u poređenju sa zdravom kontrolom. U prva 24 sata sepse nije bilo značajne razlike u vrednostima ovih biomarkera između onih koji će se brzo oporaviti i onih koji će razviti hroničnu kritičnu bolest. Međutim, razlika između dve grupe septičnih pacijenata bila je u brzini normalizacije apsolutnog broja limfocita, HLA-DR ekspresije i vrednosti solubilnog PD-L1, gde su pacijenti sa hroničnom kritičnom bolešću imali izraženije i prolongirano oštećenje i urođene i stečene imunosti.²⁵⁴

Mehanizmi imunosupresije u sepsi su brojni i još nepotpuno istraženi. Danas je prihvaćeno da istovremeno sa sekrecijom proinflamatornih citokina dolazi i do aktivacije antiinflamatornog odgovora koji može dovesti do imunosupresije. U nekim slučajevima antiinflamatorni odgovor dominira od samog početka ili postoji globalno smanjena sekrecija i proinflamatornih i antiinflamatornih citokina. Osim poremećenog citokinskog odgovora sa skretanjem od inflamatornog Th1 ka antiinflamatornom Th2 odgovoru, kod imunosuprimiranih septičnih pacijenata dolazi i do smanjene ekspresije HLA-DR na monocitima/makrofagima i drugim antigen prezentujućim ćelijama, anergije i iscrpljenosti T-ćelija, apoptoze efektorskih ćelija imunskog sistema i uticaja same apoptoze na imunosupresiju, porasta broja T_{reg} ćelija i supresorskih ćelija mijeloidnog porekla i dr.^{84,91,121} Ukratko, danas se prepoznaje da sepsa nije samo inflamatorni fenomen, nego sindrom kod kojeg je poremećena homeostaza,²⁵⁵ a u kojem, kako se čini, značajnu ulogu igraju MDSC.

2. HIPOTEZA I CILJEVI ISTRAŽIVANJA

2.1 Hipoteza

Vrednosti MDSC povišene su u perifernoj krvi pacijenata sa sepsom i koreliraju sa vrstom bakterijskog prouzrokača, osnovnim oboljenjem koje je dovelo do sepse i ishodom.

2.2 Ciljevi istraživanja

1. Odrediti učestalost i apsolutni broj MDSC u perifernoj krvi pacijenata sa sepsom
2. Ispitati povezanost učestalosti i apsolutnog broja MDSC u perifernoj krvi septičnih pacijenata sa vrstom bakterijskog prouzrokača (Gram-pozitivne bakterije, Gram-negativne bakterije, polimikrobna infekcija), osnovnim oboljenjem koje je dovelo do sekundarne sepse (pankreatitis, peritonitis, trauma), i ishodom (preživeo, umro).

3. ISPITANICI I METODE

3.1 Pacijenti i zdrave kontrolne osobe

Ukupno 40 kritično obolelih septičnih pacijenata, primljenih u hiruršku jedinicu intenzivnog lečenja (HJIL) uključeno je u prospektivnu opservacionu studiju sprovedenu u Vojnomedicinskoj akademiji (VMA). Studiju je odobrio Etički komitet VMA u skladu sa Helsinškom deklaracijom, a pacijenti ili njihovi najbliži srodnici potpisali su informisani pristanak. Studija je sprovedena u skladu sa smernicama Dobre kliničke prakse u kliničkom ispitivanju (*Službeni glasnik RS*, br. 28/2008).

Pacijenti sa sepsom su uključeni ako su ispunili aktuelne dijagnostičke kriterijume Sepse-3 za sepsu (ranije teška sepsa) i/ili septični šok (akutna promena u ukupnom SOFA skor ≥ 2 poena, neophodni vazopresori za održavanje srednjeg arterijskog pritiska ≥ 65 mmHg i nivo laktata u serumu > 2 mmol/l uprkos adekvatnoj nadoknadi volumena).³ Studija je trajala 2 godine i 1 mesec. Dijagnostički kriterijumi obuhvataju bilo koju od sledećih varijabli za koje se smatra da su posledica infekcije: sepsom indukovana hipotenzija, nivo laktata veći od 2 mmol/l, diureza manja od 0,5 ml/kg/h duže od dva sata uprkos adekvatnoj nadoknadi volumena, akutno oštećenje pluća sa $\text{PaO}_2/\text{FiO}_2$ manjim od 250, kreatinin veći od 2,0 mg/dl (176,8 $\mu\text{mol/l}$), bilirubin veći od 2,0 mg/dl (34,2 $\mu\text{mol/l}$), broj trombocita manji od 100.000/ μl i koagulopatija (INR veći od 1,5).

Kritično oboleli hirurški pacijenti sa teškom traumom (ISS > 25 , određen pomoću AIS) uključeni su u studiju nakon što su ispunili kriterijume za sekundarnu sepsu/septični šok. Povrede su najčešće nastajale u saobraćajnim nezgodama, a u nekoliko slučajeva bile su posledice pada s visine. Politraumatizovani pacijenti pretežno su imali povrede lokomotornog aparata, grudnog koša i glave.

Ekskluzioni kriterijumi bili su: sekundarna sepsa i/ili septični šok koji nije uzrokovan teškim peritonitisom, pankreatitisom ili traumom, i maligne bolesti bilo kog porekla. Isključeno je 25 od 65 pacijenata koji su prvobitno razmatrani za uključivanje u studiju.

SOFA skor,²⁵⁶ SAPS II²⁵⁷ i APACHE II skor²⁵⁸ računati su i zabeleženi u prva 24 sata po prijemu u HJIL (1. dan). SOFA skor beležen je dnevno tokom boravka u HJIL da bi se procenila težina organske disfunkcije u sekundarnoj sepsi.

Antibiotska terapija, nadoknada cirkulišućeg volumena, vazoaktivna podrška i kontrola izvora izvedeni su u skladu sa smernicama.¹⁴ Kod svih pacijenata su primenjeni različiti modovi mehaničke ventilacije i hirurške procedure ako i kad je bilo neophodno. Mera ishoda bio je bolnički mortalitet, a pacijenti su praćeni do otpusta iz bolnice (preživeli) ili do smrti u bolnici (umrli).

Kontrolni uzorci dobijeni su od 10 dobrovoljnih davalaca krvi Instituta za transfuziologiju i hemobiologiju VMA koji su potpisali informisani pristanak.

3.2 Uzorkovanje i analiza

Uzorci krvi za analizu MDSC prikupljeni su 1. i 5. dana po uključivanju u studiju. Istovremeno je uzimana krv za hemokulturu.

Analizirani su sveži uzorci periferne krvi u roku od sat vremena od uzimanja uzoraka. Određeni su učestalost i apsolutni broj MDSC. Detektovane su obe glavne podvrste MDSC, polimorfonuklearna (PMN-MDSC) i monocitna (M-MDSC) podvrsta.

Po 3 ml venske krvi prikupljeno je od pacijenata sa sepsom ($n = 40$) i zdravih kontrolnih osoba ($n = 10$). Po 100 μ l podeljeno je u epruvete za bojenje sa dole navedenim monoklonskim antitelima. Nakon 30 minuta inkubacije eritrociti su uklonjeni procesom liziranja upotrebom lizing pufera (EDTA, NH_4Cl , KHCO_3) tokom 20 minuta. Preostale nukleisane ćelije dvaput su oprane u RPMI 1640 kultivacionom medijumu sa 5% normalnog humanog seruma, centrifugirane i resuspendovane. Separacija mononuklearnih ćelija periferne krvi (PBMC) za komparativnu analizu izvedena je korišćenjem limfocitnog separacionog medijuma LSM 1077. Separacija je izvedena centrifugiranjem na 1200 x g tokom 20 minuta. Interfazni sloj je ekstrahovan pipetom po Pasteru i opran dva puta u kultivacionom medijumu. Ćelije su brojane manuelno u unapređenoj Nojbauerovoj komori, i automatski, na *Beckman Coulter ACT differ* brojaču krvnih ćelija. Konačno, suspenzija sa 1×10^6 ćelija/100 μ l podeljena je u 12x75 mm epruvete za dalje imunofenotipsko bojenje.

3.3 Imunofenotipska analiza ćelija

Sveži uzorci periferne krvi bojeni su sledećim anti-humanim monoklonskim antitelima u različitim kombinacijama za multikolornu analizu: CD15-PECy7 (Biolegend, USA), CD45-PEDyLight 594 i PECy5 (EXBIO, Czech republic), HLA-DR-FITC (Miltenyi Biotec,

Germany), CD14-PEDyLight 594 (EXBIO, Czech republic), CD16-PECy7 (Biolegend, USA), CD11b-PE (Miltenyi Biotec, Germany), CD10-PECy5 (BD Biosciences, USA), CD3-PEDyLight 594 (EXBIO, Czech republic), CD19-PEDyLight 594 (EXBIO, Czech republic) i CD56-PEDyLight594 (EXBIO, Czech republic). Obojene ćelije analizirane su na *Beckman Coulter FC 500* protočnom citofluorimetru pomoću CXP analitičkog softvera.

Akronimi M-MDSC i PMN-MDSC odnose se na fenotipski korespondirajuće ćelije. MDSC su definisane kao $\text{Lin}^-(\text{CD3}^-/\text{CD19}^-/\text{CD56}^-)/\text{HLA-DR}^{\text{low}}\text{CD11b}^+$ ćelije. U ovoj populaciji ćelija PMN-MDSC su definisane kao $\text{CD14}^-\text{CD15}^+$, a M-MDSC kao $\text{CD14}^+\text{CD15}^-$. Za dodatnu diskriminaciju PMN-MDSC korišćeni su markeri CD10 i CD16.

3.4 Statistička analiza

Kompletna statistička analiza urađena je u statističkom softverskom paketu SPSS Statistics 18. Većina varijabli prikazana je kao učestalost određenih kategorija, dok su statistički značajne razlike testirane hi-kvadrat testom. U slučaju kontinuiranih podataka, varijable su prikazane kao srednja vrednost \pm standardna devijacija (SD), medijana, minimalne i maksimalne vrednosti. Za ispitivanje normalnosti distribucije kontinuiranih podataka korišćen je Kolmogorov-Smirnov test. Statistički značajne razlike između ispitivanih grupa testirane su Wilcoxonovim ili Mann-Whitney testom. Spearmanov koeficijent korelacije rangova ρ korišćen je da bi se ispitala povezanost između izmerenih vrednosti varijabli i ishoda, odnosno prirode bakterijemije. Da bi se utvrdila senzitivnost i specifičnost varijabli kao prediktora letalnog ishoda, odnosno prirode bakterijemije, analizirane su ROC krive i površine ispod krivih (AUC). Izračunati su odnosi šansi (OR) i korespondirajući 95% intervali pouzdanosti da bi se utvrdila jačina statističke povezanosti između varijabli i ishoda, odnosno prirode bakterijemije. Nezavisne varijable koje su najviše obećavale kao pojedinačni ili kombinovani faktori rizika analizirane su binarnom logističkom regresijom.

Razlike su smatrane statistički značajnim ako je $p < 0,05$.

4. REZULTATI

U studiju je uključeno 40 pacijenata (prosečne starosti od 59,3 godine; raspon: 27-86 godina; 12 žena, 28 muškaraca) sa sekundarnom sepsom i/ili septičnim šokom zbog pankreatitisa (16 pacijenata – 40%), peritonitisa (14 pacijenata – 35%) ili traume (10 pacijenata – 25%). Od 40 pacijenata, 20 pacijenata (50%) je razvilo Gram-pozitivnu bakterijemiju (GPB), 8 pacijenata (20%) je razvilo Gram-negativnu bakterijemiju (GNB), a 10 pacijenata (25%) je imalo polimikrobnu bakterijemiju (Poli). Kod 2 pacijenta (5%) hemokultura je ostala sterilna, odnosno nije izolovan nijedan patogen. Izračunat je ISS za sve politraumatizovane pacijente (srednja vrednost \pm SD): $35,24 \pm 4,67$. Demografski podaci su prikazani u Tabeli 7.

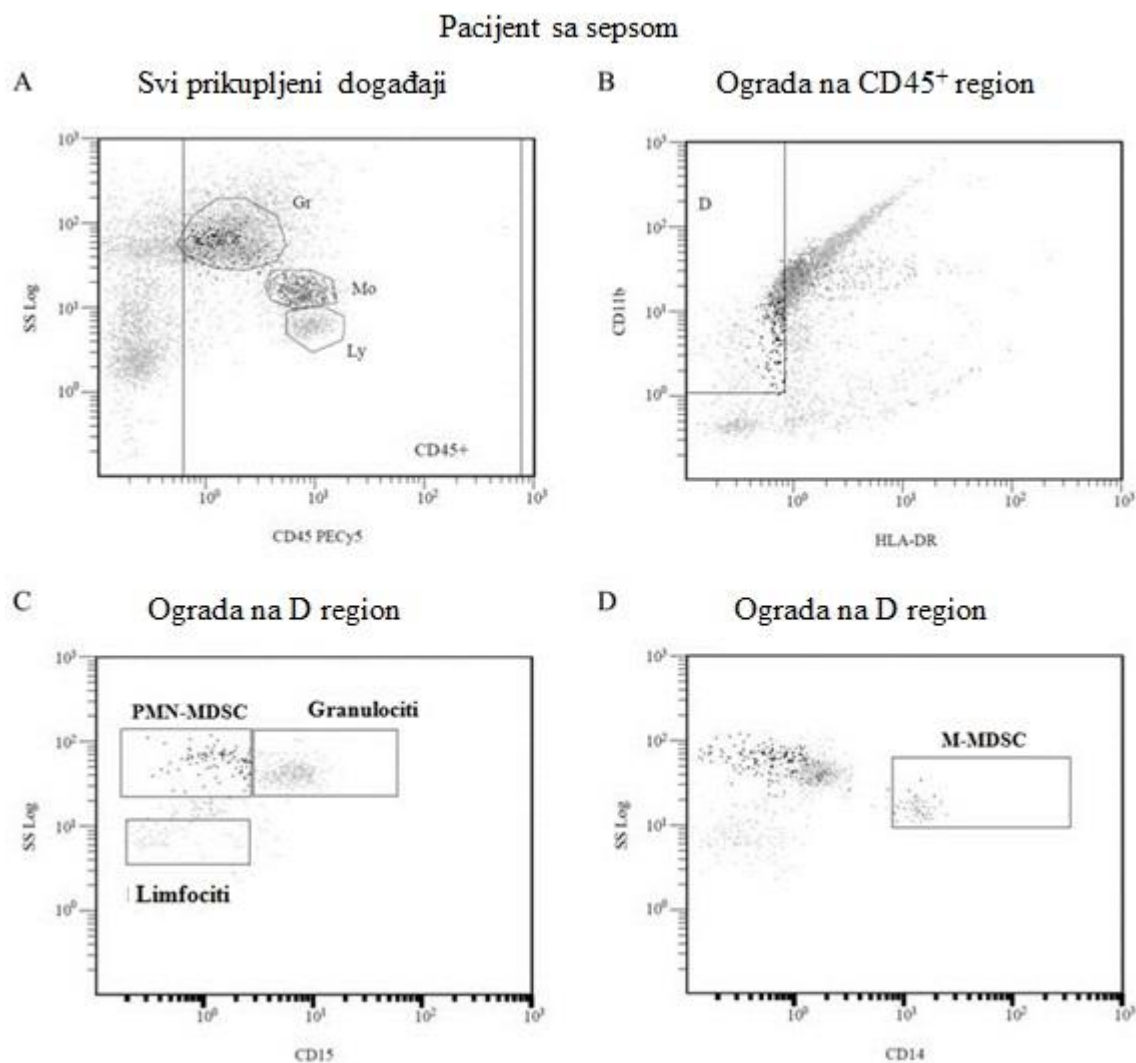
4.1 Detekcija subpopulacija MDSC

Obe glavne podvrste MDSC detektovane su kod obolelih od sepse. Ove ćelije su prvo ograđene ('gejtovane') na CD45 pozitivne događaje da bi se isključio detritus i kod pacijenata sa sepsom i kod zdravih kontrolnih osoba (Slika 6A i 7A, respektivno). U sledećem koraku, na HLA-DR/CD11b tačkastom dijagramu, selektovani su HLA-DR⁻/CD11b⁺ događaji (Slika 6B i 7B) i dalje analizirani na markere loze (CD3, CD19 i CD56, nije prikazano) kao i na ekspresiju CD10 (nije prikazano), CD15 (Slika 6C i 7C), CD14 (Slika 6D i 7D) i CD16 (nije prikazano). Klasifikacija polimorfonuklearnih i monocitnih podvrsta bazirana je na ekspresiji CD15 i CD14, respektivno. PMN-MDSC odvojene su od zrele granulocitne populacije na osnovu CD10 negativnosti, kao i niže i nehomogene ekspresije praktično svih pozitivnih markera (CD11b, CD15 i CD16). Učestalost MDSC prikazana je kao procenat ovih ćelija među svim CD45 pozitivnim događajima.

Pacijenti uključeni u studiju	
Ukupan broj pacijenata	40
Godine starosti (srednja vrednost, raspon)	59,3 (27 – 86)
Pol, n (%)	
Muški	28 (70%)
Ženski	12 (30%)
SAPS II skor (srednja vrednost ± SD)	57,05 ± 9,37
APACHE II skor (srednja vrednost ± SD)	21,65 ± 3,360
SOFA skor (srednja vrednost ± SD)	6,850 ± 2,832
Dijagnoza pri prijemu u JIL, n (%)	
Teška sepsa zbog	
Pankreatitisa	16 (40%)
Peritonitisa	14 (35%)
Traume	10 (25%)
Hemokultura, n (%)	
Gram-pozitivna	20 (50%)
Gram-negativna	8 (20%)
Polimikrobna	10 (25%)
Sterilna	2 (5%)
Ukupni bolnički mortalitet, n (%)	20 (50%)

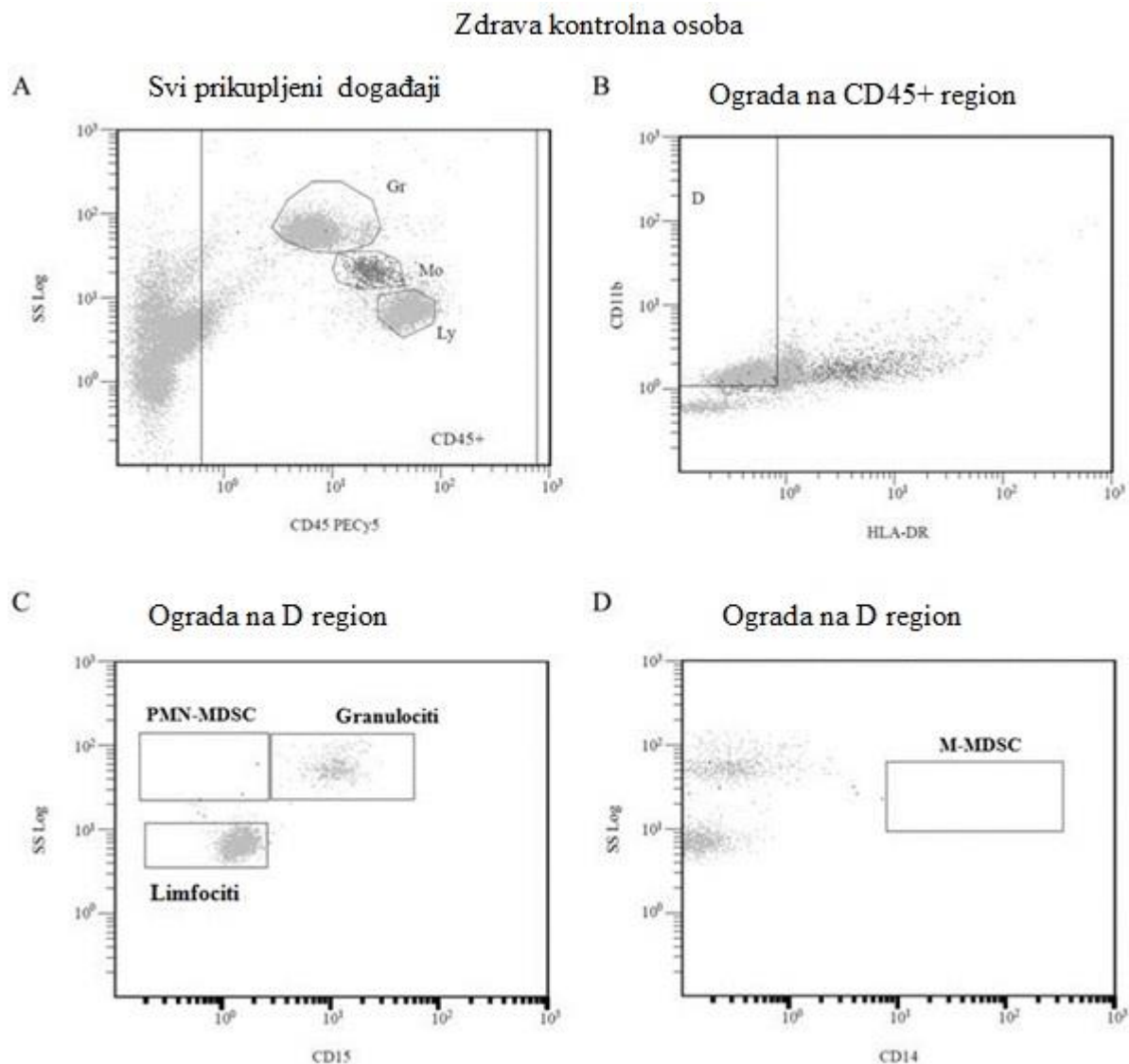
Tabela 7. Demografski podaci i kliničke karakteristike pacijenata uključenih u studiju.

Da bismo ispitali da li pretpostavljene MDSC imaju izmenjenu flotacijsku gustinu (engl. *buoyancy*), analizirali smo leukocite iz svežih liziranih uzoraka periferne krvi uporedo sa mononuklearnim ćelijama periferne krvi koje su dobijene izdvajanjem ćelija na gradijentu gustine iz uzoraka istih pacijenata.



Slika 6. Detekcija MDSC kod pacijenata sa sepsom. Reprezentativni dvoparametarski tačkasti dijagrami pokazuju identifikaciju PMN-MDSC i M-MDSC u uzorcima periferne krvi pacijenata sa sepsom. Ćelije su pripremljene liziranjem eritrocita periferne krvi i obojene fluorescentno obeleženim antitelima specifičnim za površinske markere označene na dijagramima. (A) Populacije leukocita selektovane su na osnovu ekspresije CD45. Monociti su obojeni tamnije sivo radi daljeg praćenja. (B) Tamnije sivi monociti pokazuju nisku ekspresiju HLA-DR. HLA-DR^{-low}CD11b⁺ događaji selektovani su i ispitani na (C) ekspresiju CD15 i (D) ekspresiju CD14. PMN-MDSC obojene su u crno radi lakšeg praćenja. Gr – granulociti; Mo – monociti; Ly – limfociti.

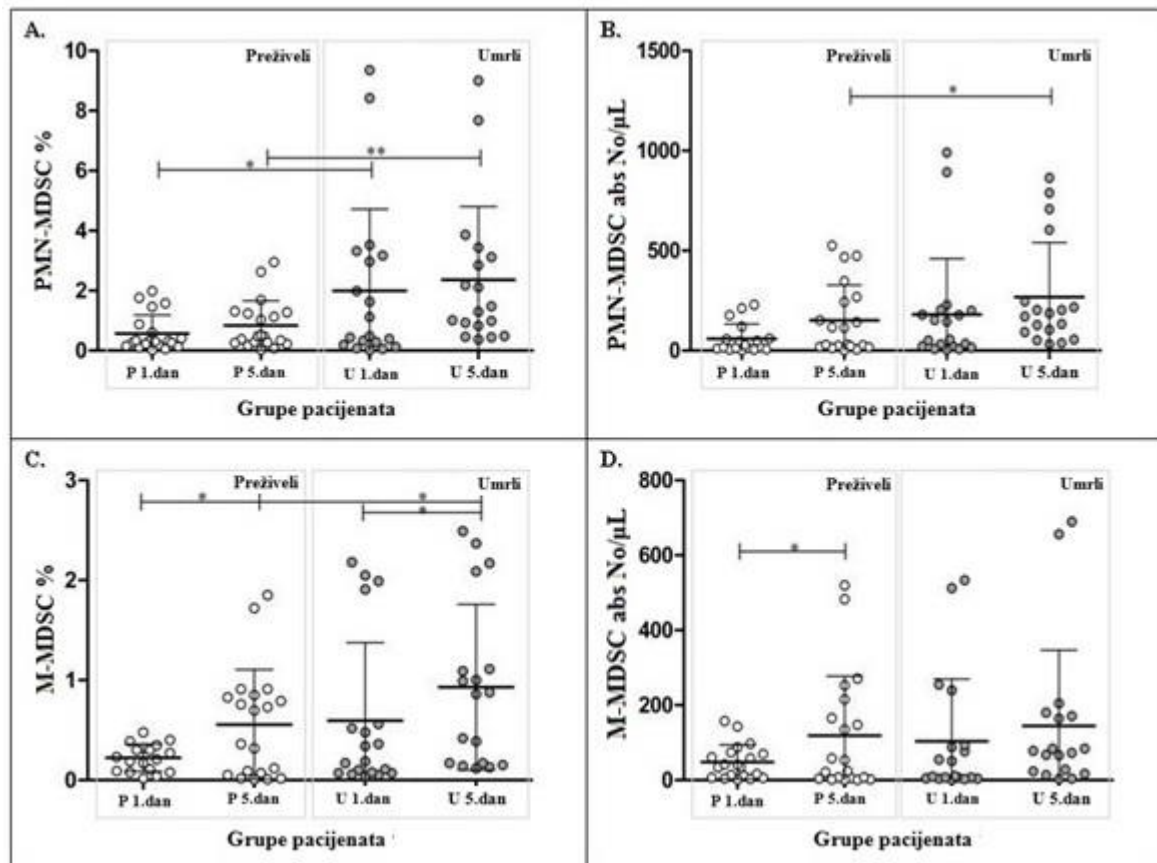
Utvrđeno je da se ćelije istog fenotipa zadržavaju u mononuklearnom sloju na gustinskom gradijentu (nije prikazano). Takođe je opservirano smanjenje ekspresije HLA-DR na monocitima pacijenata sa sepsom, što je marker imunoparalize (Slika 6B i 7B).



Slika 7. Detekcija MDSC kod zdravih kontrolnih osoba. Reprezentativni dvoparametarski tačkasti dijagrami pokazuju identifikaciju PMN-MDSC i M-MDSC u uzorku periferne krvi zdrave kontrolne osobe. Ćelije su pripremljene liziranjem eritrocita periferne krvi i obojene fluorescentno obeleženim antitelima specifičnim za površinske markere označene na dijagramima. (A) Populacije leukocita selektovane su na osnovu ekspresije CD45. Monociti su obojeni tamnije sivo radi daljeg praćenja. (B) Tamnije sivi monociti pokazuju veću ekspresiju HLA-DR kod zdravih kontrolnih osoba u odnosu na pacijente sa sepsom. Analiza HLA-DR^{low}CD11b⁺ događaja pokazala je minimalan broj događaja u (C) PMN-MDSC regionu, kao i u (D) M-MDSC regionu kod zdravih donora. Gr – granulociti; Mo – monociti; Ly – monociti.

4.2 Učestalost i apsolutni brojevi PMN-MDSC i M-MDSC veći su kod umrlih

Od 40 pacijenata sa sepsom uključenih u studiju, 20 je preživelo (otpušteno iz bolnice), a 20 pacijenata je umrlo. U obe grupe pacijenata, preživelih i umrlih, trajanje sepse od 1. do 5. dana bilo je praćeno porastom vrednosti MDSC u obe ispitivane subpopulacije (Slika 8A, B, C, D).



Slika 8. Poređenje vrednosti MDSC kod preživelih sa vrednostima MDSC kod umrlih, 1. i 5. dana praćenja. (A) Relativni broj PMN-MDSC (%). (B) Apsolutni broj PMN-MDSC (No/μl). (C) Relativni broj M-MDSC (%). (D) Apsolutni broj M-MDSC (No/μl). (P1, P5 – preživeli 1. i 5. dana; U1, U5 – umrli 1. i 5. dana) (Relativni i apsolutni brojevi prikazani su kao srednje vrednosti \pm SD, Mann-Whitney test, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$).

Osnovne karakteristike pacijenata sa sepsom 1. i 5. dana prema ishodu (preživeli ili umrli) prikazane su u Tabeli 8 i Tabeli 9, respektivno.

Učestalost PMN-MDSC bila je značajno viša kod umrlih i 1. dana ($p < 0,05$) i 5. dana ($p < 0,01$) praćenja u odnosu na preživele (Slika 8A). Apsolutni broj PMN-MDSC bio je viši kod

umrlih 1. dana (postojao je trend koji nije dostigao statistički značaj) i 5. dana (statistički značajno povećanje, $p < 0,05$) u odnosu na preživjele (Slika 8B).

Ishod 1. dan	SAPS II skor	SOFA skor	APACHE II skor	PMN- MDSC učestalost	PMN- MDSC apsolutni broj	M-MDSC učestalost	M-MDSC apsolutni broj	
Preživeli	N	20	20	20	20	20	20	
	Srednja vrednost	47,20	4,50	14,50	0,56	114,28	0,44	48,28
	SD	11,07	2,87	5,37	0,61	182,99	0,69	45,89
	Medijana	46,50	5,00	15,00	0,30	37,14	0,25	38,18
	Min	22	0	5	0,02	2,35	0,02	1,67
	Max	65	9	22	1,99	644,76	2,56	157,95
Umrli	N	20	20	20	20	20	20	
	Srednja vrednost	56,90	8,60	20,80	1,99	180,42	0,59	103,46
	SD	15,52	3,50	5,57	2,72	280,09	0,78	165,89
	Medijana	55,00	8,50	21,00	0,48	55,29	0,19	10,77
	Min	23	1	11	0,02	5,20	0,04	1,77
	Max	85	14	30	9,35	991,10	2,18	533,92

Tabela 8. Osnovne karakteristike pacijenata sa sepsom prema ishodu (preživeli ili umrli) 1. dana praćenja.

Učestalost M-MDSC bila je značajno viša 5. dana u poređenju sa 1. danom ($p < 0,05$) i kod preživelih i kod umrlih, ali je 5. dana učestalost M-MDSC bila takođe značajno viša kod umrlih u odnosu na preživjele ($p < 0,05$) (Slika 8C).

Što se tiče apsolutnog broja M-MDSC, iako je postojao trend viših vrednosti kod umrlih i 5. dana praćenja, samo je razlika između 1. i 5. dana u grupi preživelih dostigla statističku značajnost ($p < 0,05$) (Slika 8D).

Urađene su analize univarijabilnom logističkom regresijom da bi se utvrdilo da li postoji povezanost svake individualne varijable sa smrtnim ishodom. Za svaku varijablu je izračunat standardizovani regresioni koeficijent (β) i odnos šansi (OR) sa 95% intervalom pouzdanosti (CI). Urađena je multivarijabilna logistička regresiona analiza metodom 'korak po korak',

izbor unapred (engl. *forward stepwise multivariate logistic regression*) da bi se utvrdili nezavisni prediktori smrtnog ishoda, bez efekta mogućih ometajućih faktora (engl. *confounder*). U Tabeli 10 i Tabeli 11 prikazani su univarijabilni odnosi šansi varijabli u predviđanju smrtnog ishoda pacijenata sa sepsom 1. i 5. dana, respektivno.

Ishod 5. dan	SOFA skor	PMN-MDSC učestalost	PMN-MDSC apsolutni broj	M-MDSC učestalost	M-MDSC apsolutni broj	
Preživeli	N	20	20	20	20	
	Srednja vrednost	3,10	0,83	152,17	0,55	118,99
	SD	2,53	0,82	175,42	0,55	158,91
	Medijana	3,00	0,48	72,24	0,53	39,01
	Min	0	0,03	2,05	0,01	0,68
	Max	9	2,95	525,10	1,85	519,85
Umrli	N	20	20	20	20	
	Srednja vrednost	9,00	2,36	268,27	0,93	145,05
	SD	4,52	2,44	272,00	0,82	202,22
	Medijana	10,00	1,39	178,35	0,87	75,66
	Min	3	0,37	31,45	0,12	3,51
	Max	14	9,00	864,24	2,49	689,73

Tabela 9. Osnovne karakteristike pacijenata sa sepsom prema ishodu (preživeli ili umrli) 5. dana praćenja.

Varijable 1. dan	Standardizovani β koeficijent	OR	95% interval pouzdanosti		<i>p</i> vrednost
			Donja granica	Gornja granica	
SAPS II skor	0,059	1,061	1,001	1,124	0,045*
SOFA skor	0,411	1,508	1,147	1,982	0,003**
APACHE II skor	0,216	1,241	1,068	1,443	0,005**
PMN-MDSC učestalost	0,671	1,956	0,958	3,997	0,040*
PMN-MDSC apsolutni	0,001	1,001	0,998	1,004	0,387
M-MDSC učestalost	0,292	1,339	0,552	3,252	0,519
M-MDSC apsolutni	0,005	1,005	0,998	1,012	0,199

Tabela 10. Odnosi šansi varijabli 1. dana u predviđanju smrtnog ishoda kod pacijenata sa sepsom, dobijeni univarijabilnom logističkom regresionom analizom. Statistički značajne razlike označene su sa * ($p < 0,05$) ili ** ($p < 0,01$).

Varijable 5. dan	Standardizovani β koeficijent	OR	95% interval pouzdanosti		<i>p</i> vrednost
			Donja granica	Gornja granica	
SOFA skor	0,408	1,504	1,167	1,938	0,002**
PMN-MDSC učestalost	0,821	2,272	1,075	4,800	0,032*
PMN-MDSC apsolutni	0,002	1,002	0,999	1,006	0,135
M-MDSC učestalost	0,807	2,242	0,820	6,131	0,116
M-MDSC apsolutni	0,001	1,001	0,997	1,004	0,651

Tabela 11. Odnosi šansi varijabli 5. dana u predviđanju smrtnog ishoda kod pacijenata sa sepsom, dobijeni univarijabilnom logističkom regresionom analizom. Statistički značajne razlike označene su sa * ($p < 0,05$) ili ** ($p < 0,01$).

Analiza varijabli 1. dana univarijabilnom logističkom regresijom u pogledu predikcije smrtnog ishoda otkrila je da su sva tri skora težine (SAPS II, SOFA, APACHE II), zajedno sa učestalošću PMN-MDSC, imala statistički značajnu moć u predviđanju smrtnog ishoda. Kada je na istim varijablama 1. dana urađena multivarijabilna logistička regresiona analiza metodom 'korak po korak', pokazano je da nijedna od ispitivanih varijabli nije bila nezavisan prediktor smrtnog ishoda.

Analiza varijabli 5. dana univarijabilnom logističkom regresijom u pogledu predikcije smrtnog ishoda otkrila je da SOFA skor uz učestalost PMN-MDSC ima statistički značajnu moć u predviđanju smrtnog ishoda. Suprotno nalazima multivarijabilne logističke regresione analize metodom 'korak po korak' na varijablama 1. dana, 5. dana je utvrđeno da su SOFA skor i učestalost PMN-MDSC nezavisni prediktori smrtnog ishoda, što je pokazano u Tabeli 12.

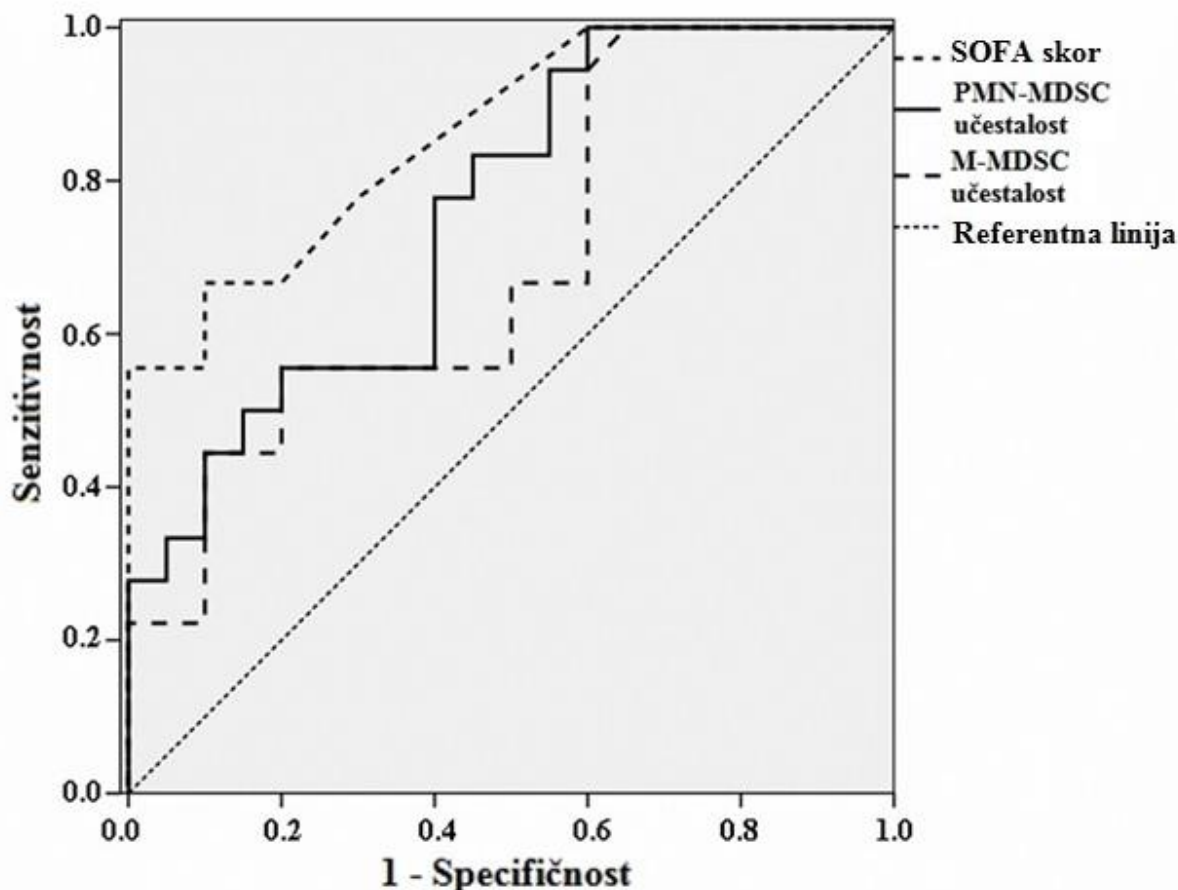
Varijable 5. dan	Standardizovani β koeficijent	OR	95% interval pouzdanosti		<i>p</i> vrednost
			Donja granica	Gornja granica	
SOFA skor	0,854	2,350	0,929	5,941	0,042*
PMN-MDSC učestalost	1,274	3,575	1,098	11,639	0,030*

Tabela 12. Nezavisni prediktori smrtnog ishoda utvrđeni multivarijabilnom logističkom regresionom analizom varijabli 5. dana. Statistički značajne razlike označene su sa * ($p < 0,05$).

Da bi se procenio prognostički značaj ispitivanih varijabli u predviđanju smrtnog ishoda, konstruisane su ROC krive. Prvog dana ni učestalost ni apsolutni brojevi PMN-MDSC i M-MDSC nisu bili značajni za diskriminaciju preživelih i umrlih. Suprotno 1. danu, 5. dana su sve ispitivane varijable bile umereno dobri prediktori smrtnog ishoda, osim apsolutnih brojeva M-MDSC (AUC 0,597, $p = 0,306$). Učestalosti i apsolutni brojevi viši od graničnih vrednosti (engl. *cut-off*) prediktori su smrtnog ishoda. Klinička tačnost varijabli 5. dana u predviđanju smrtnog ishoda kod pacijenata sa sepsom prikazana je u Tabeli 13 i Slikom 9.

Varijable 5. dan	AUC ROC	p vrednost	95% interval pouzdanosti		Granična vrednost (<i>cut-off</i>)	Senzitivnost (%)	Specifičnost (%)	Youdenov indeks
			Donja granica	Gornja granica				
SOFA skor	0,861	0,000**	0,748	0,975	6,50	67,0	90,0	0,56
PMN- MDSC učestalost	0,758	0,007**	0,607	0,909	0,36	100,0	40,0	0,40
PMN- MDSC apsolutni broj	0,692	0,040*	0,519	0,864	30,75	100,0	50,0	0,50
M-MDSC učestalost	0,699	0,037*	0,530	0,867	0,86	56,0	80,0	0,35

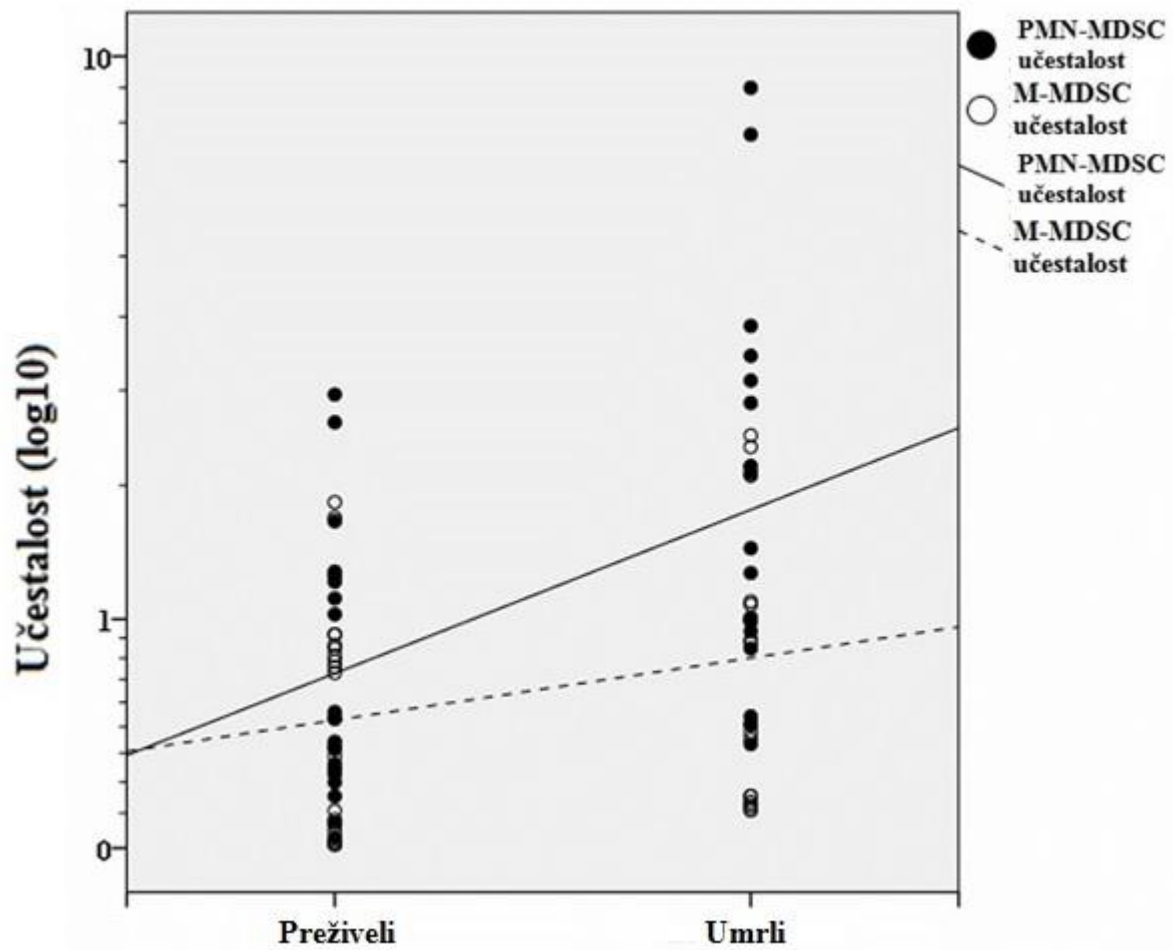
Tabela 13. Klinička tačnost varijabli 5. dana u predviđanju smrtnog ishoda kod pacijenata sa sepsom. Statistički značajne razlike označene su sa * ($p < 0,05$) ili ** ($p < 0,01$).



Slika 9. ROC krive za SOFA skor, učestalost PMN-MDSC i učestalost M-MDSC 5. dana praćenja kod umrlih pacijenata sa sepsom.

Da bi se procenila jačina povezanosti, izračunat je Spearmanov koeficijent korelacije ρ između učestalosti i apsolutnih brojeva PMN-MDSC i M-MDSC s jedne strane, i smrtnog ishoda s druge. Prvog dana ni učestalosti ni apsolutni brojevi PMN-MDSC i M-MDSC nisu značajno korelirali sa smrtnim ishodom. Suprotno 1. danu, 5. dana, izuzev apsolutnih brojeva M-MDSC, postojale su statistički značajne pozitivne korelacije između ispitivanih varijabli i letalnog ishoda (Tabela 14). Najjača korelacija postojala je između učestalosti PMN-MDSC i smrtnog ishoda (Slika 10).

Nije postojala statistički značajna povezanost pola, starosti, uzroka sekundarne sepse ili prirode hemokulture sa ishodom.



Slika 10. Učestalosti PMN-MDSC i M-MDSC 5. dana na logaritmovanoj skali u odnosu na ishod kod pacijenata se sepsom.

Varijable 5. dan	PMN-MDSC učestalost	PMN-MDSC apsolutni broj	M-MDSC učestalost	M-MDSC apsolutni broj
Smrtni ishod	0,447; p=0,005	0,332; p=0,042	0,344; p=0,035	0,168; p=0,313
PMN-MDSC učestalost		0,818; p=0,000	0,484; p=0,002	0,389; p=0,016
PMN-MDSC apsolutni broj			0,663; p=0,000	0,749; p=0,000
M-MDSC učestalost				0,899; p=0,000

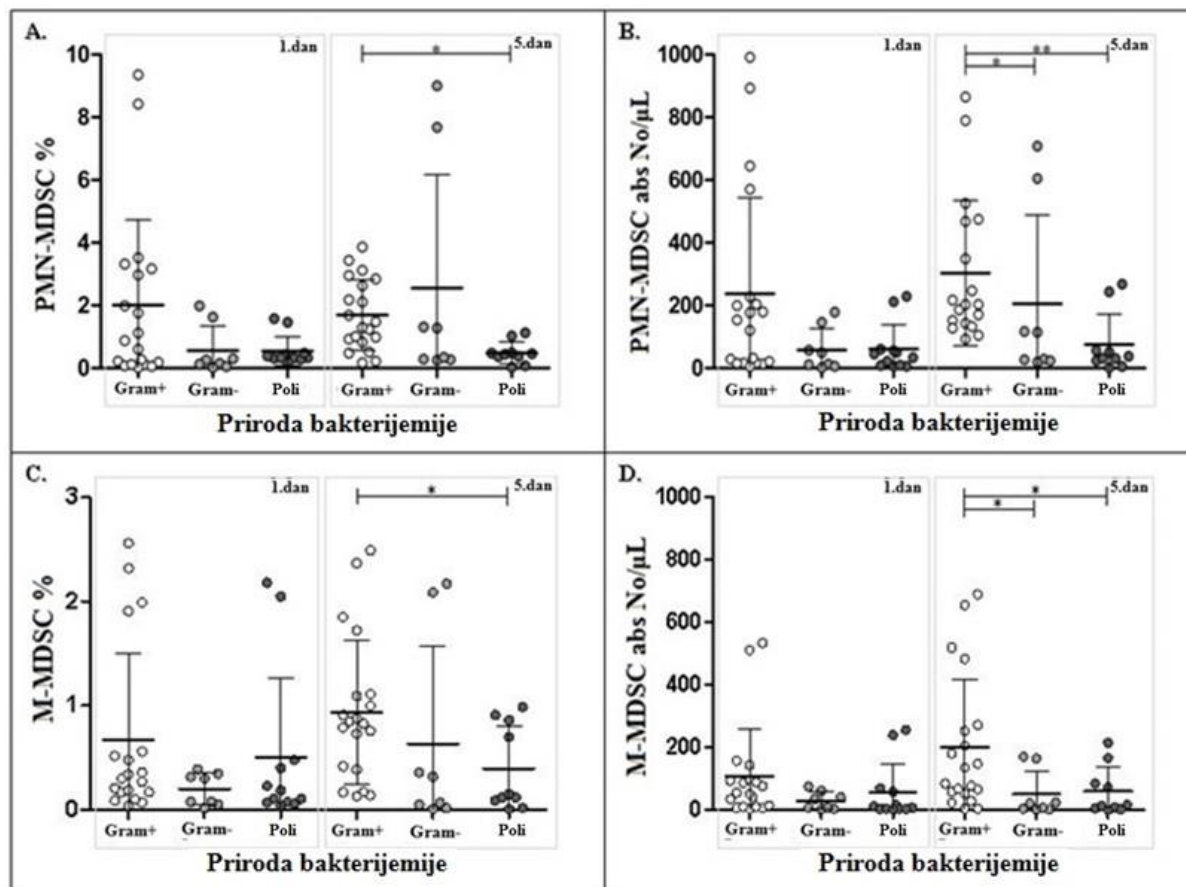
Tabela 14. Spearmanov koeficijent korelacije ρ između varijabli 5. dana i smrtnog ishoda kod pacijenata sa sepsom.

4.3 Obe glavne subpopulacije MDSC značajno se akumuliraju u Gram-pozitivnoj sepsi

Uporedili smo učestalost i apsolutne brojeve PMN-MDSC i M-MDSC kod pacijenata sa sepsom prema prirodi bakterijemije (Gram-pozitivna, Gram-negativna i polimikrobna grupa) 1. i 5. dana praćenja, što je prikazano u Tabeli 15 i Slikom 11. Dva pacijenta sa sterilnom hemokulturom isključena su iz daljih analiza.

Parametri	Gram-pozitivna bakterijemija (n=20) Srednja vrednost ± SD; M; (min – max)	Gram-negativna bakterijemija (n=8) Srednja vrednost ± SD; M; (min – max)	Polimikrobna bakterijemija (n=10) Srednja vrednost ± SD; M; (min – max)
PMN-MDSC učestalost (%)			
1. dan	2,00 ± 2,72; 0,88; (0,02 – 9,35)	0,56 ± 0,77; 0,20; (0,02 – 1,99)	0,58 ± 0,50; 0,37; (0,19 – 1,58)
5. dan	1,69 ± 1,12; 1,39; (0,17 – 3,86)	2,55 ± 3,61; 0,81; (0,25 – 9,00)	0,49 ± 0,35; 0,45; (0,03 – 1,13)
PMN-MDSC apsolutni broj			
1. dan	237,42 ± 306,16; 153,44; (5,20 – 991,10)	57,92 ± 68,11; 31,12; (2,35 – 178,50)	72,09 ± 80,53; 48,12; (5,92 – 229,10)
5. dan		205,34 ± 282,57; 71,67; (19,40 – 991,10)	75,12 ± 97,00; 34,85; (2,05 – 267,81)
M-MDSC učestalost (%)			
1. dan	0,66 ± 0,83; 0,30; (0,04 – 2,56)	0,19 ± 0,15; 0,19; (0,02 – 0,39)	0,58 ± 0,82; 0,21; (0,04 – 2,18)
5. dan	0,94 ± 0,69; 0,84; (0,13 – 2,49)	0,63 ± 0,93; 0,19; (0,01 – 2,17)	0,39 ± 0,41; 0,13; (0,01 – 0,99)
M-MDSC apsolutni broj			
1. dan	106,57 ± 153,82; 55,12; (4,81 – 533,92)	29,02 ± 28,35; 21,21; (1,67 – 74,61)	66,97 ± 98,00; 13,96; (3,52 – 255,06)
5. dan	200,51 ± 216,24; 109,76; (3,51 – 533,92)	49,46 ± 73,44; 14,45; (0,89 – 170,78)	58,47 ± 76,61; 15,39; (0,68 – 215,67)

Tabela 15. Učestalost i apsolutni brojevi PMN-MDSC i M-MDSC kod septičnih pacijenata prema prirodi bakterijemije, 1. i 5. dana praćenja. SD – standardna devijacija; M – medijana; min – minimum; max – maksimum.



Slika 11. Poređenje vrednosti MDSC među grupama pacijenata sa različitim prirodom bakterijemije. (A) Relativni broj PMN-MDSC (%). **(B)** Apsolutni broj PMN-MDSC (No/μL) **(C)** Relativni broj M-MDSC (%). **(D)** Apsolutni broj M-MDSC (No/μL). Relativni i apsolutni brojevi prikazani su kao srednje vrednosti ± SD, Mann-Whitney test, * p < 0,05, ** p < 0,01.

U početku, 1. dana, pacijenti sa Gram-pozitivnom sepsom imali su više PMN-MDSC i M-MDSC (i relativni i apsolutni broj) u poređenju sa drugim dvema grupama, ali bez statistički značajne razlike. Akumulacija PMN-MDSC i M-MDSC kod pacijenata sa Gram-pozitivnom sepsom postala je intenzivnija 5. dana. Ova grupa imala je značajno veći relativni broj PMN-MDSC, te veći relativni i apsolutni broj M-MDSC u poređenju sa grupom polimikrobne sepse ($p < 0,05$) (Slika 11A, C, D), dok je apsolutni broj PMN-MDSC dosegao statistički veoma značajnu razliku između grupe sa Gram-pozitivnom u odnosu na grupu sa polimikrobnom sepsom ($p < 0,01$) (Slika 11B). Takođe, pacijenti sa Gram-pozitivnom sepsom imali su značajno veći apsolutni broj i PMN-MDSC i M-MDSC u odnosu na pacijente sa Gram-negativnom sepsom ($p < 0,05$) (Slika 11B, D).

Urađena je univarijabilna logistička regresiona analiza da bi se utvrdilo da li postoji povezanost svake individualne varijable sa Gram-pozitivnom sepsom. Izračunati su

standardizovani regresioni koeficijenti (β) i odnosi šansi (OR) sa 95% CI za svaku varijablu. Urađena je multivarijabilna logistička regresiona analiza 'korak po korak', izbor unapred, da bi se utvrdili nezavisni prediktori Gram-pozitivne sepse, bez efekta mogućih pridruženih, ometajućih faktora. U Tabeli 16 i Tabeli 17 prikazani su odnosi šansi varijabli za predikciju Gram-pozitivne sepse, 1. i 5. dana, respektivno. Univarijabilna logistička regresiona analiza varijabli 1. dana u Gram-pozitivnoj sepsi otkrila je da su i učestalost i apsolutni broj PMN-MDSC imali statistički značajnu moć predviđanja Gram-pozitivne sepse. Univarijabilna logistička regresiona analiza varijabli 5. dana u Gram-pozitivnoj sepsi otkrila je da su apsolutni brojevi PMN-MDSC i M-MDSC, kao i učestalost M-MDSC imali statistički značajnu moć predikcije Gram-pozitivne sepse. Multivarijabilnom logističkom regresionom analizom 'korak po korak' varijabli 5. dana utvrđeno je da je apsolutni broj M-MDSC nezavisni prediktor Gram-pozitivne sepse, što je prikazano u Tabeli 18.

Varijable 1. dan	Standardizovani β koeficijent	OR	95% interval pouzdanosti		p vrednost
			Donja granica	Gornja granica	
PMN-MDSC učestalost	0,709	2,033	0,974	4,242	0,023*
PMN-MDSC apsolutni	0,007	1,007	0,999	1,014	0,039*
M-MDSC učestalost	0,580	1,786	0,689	4,624	0,232
M-MDSC apsolutni	0,005	1,006	0,998	1,013	0,166

Tabela 16. Odnosi šansi varijabli 1. dana u predviđanju Gram-pozitivne sepse, dobijeni univarijabilnom logističkom regresionom analizom. Statistički značajne razlike označene su sa * ($p < 0,05$).

Varijable 5. dan	Standardizovani β koeficijent	OR	95% interval pouzdanosti		<i>p</i> vrednost
			Donja granica	Gornja granica	
PMN-MDSC učestalost	0,084	1,087	0,767	1,542	0,638
PMN-MDSC apsolutni	0,003	1,003	1,000	1,007	0,043*
M-MDSC učestalost	1,012	2,752	0,915	8,275	0,038*
M-MDSC apsolutni	0,009	1,009	1,001	1,017	0,030*

Tabela 17. Odnosi šansi varijabli 5. dana u predviđanju Gram-pozitivne sepse, dobijeni univarijabilnom logističkom regresionom analizom. Značajne razlike označene su sa * ($p < 0,05$).

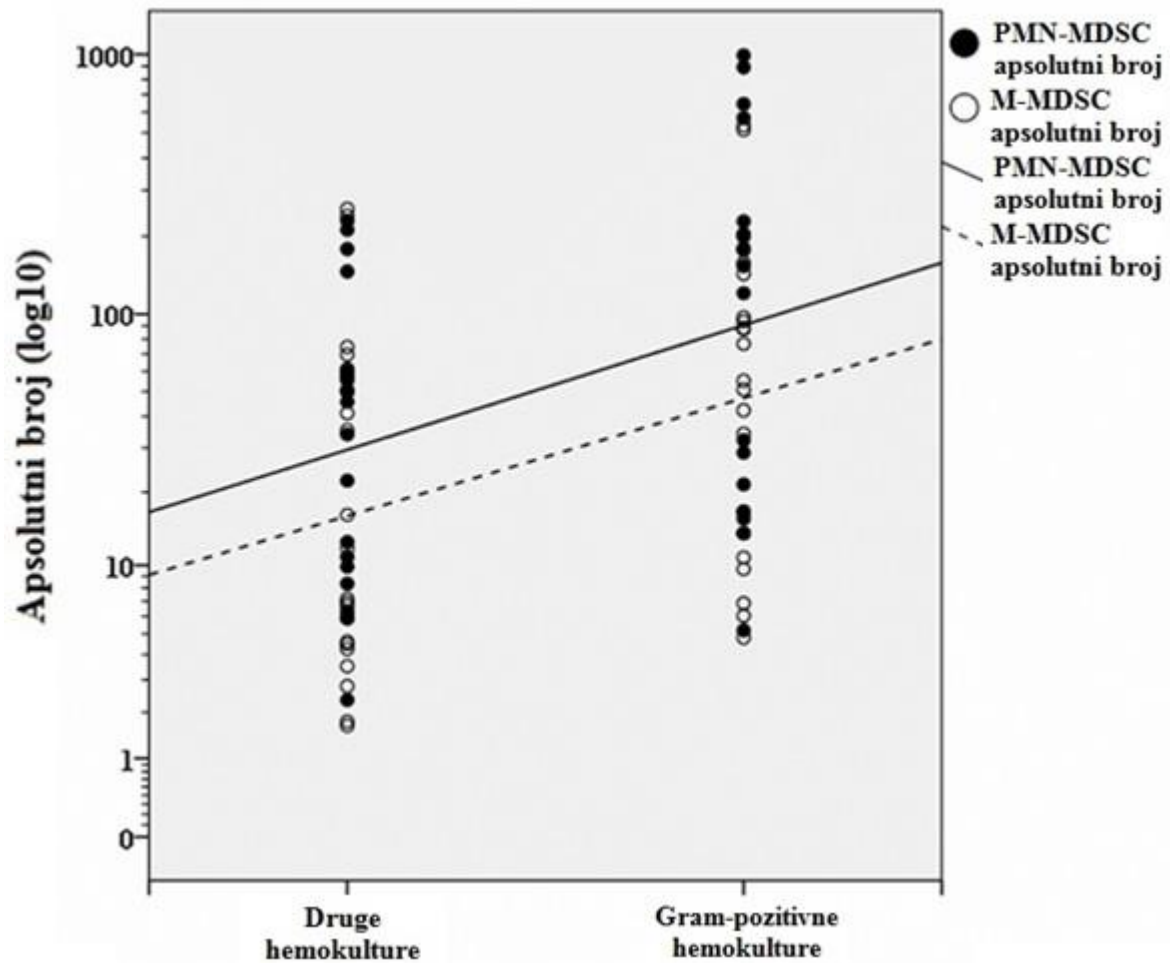
Varijable 5. dan	Standardizovani β koeficijent	OR	95% interval pouzdanosti		<i>p</i> vrednost
			Donja granica	Gornja granica	
M-MDSC apsolutni	0,012	1,012	0,999	1,026	0,035*

Tabela 18. Nezavisni prediktor Gram-pozitivne sepse utvrđen multivarijabilnom logističkom regresionom analizom varijabli 5. dana. Statistički značajna razlika označena je sa * ($p < 0,05$).

Da bi se procenila jačina povezanosti između učestalosti i apsolutnih brojeva PMN-MDSC i M-MDSC s jedne strane, i Gram-pozitivne sepse s druge, izračunat je Spearmanov koeficijent korelacije ρ . Prvog dana postojala je statistički značajna pozitivna korelacija apsolutnih brojeva PMN-MDSC i M-MDSC sa Gram-pozitivnom sepsom. Ova pozitivna korelacija prikazana je u Tabeli 19. i Slici 12. Petog dana postojale su statistički značajne pozitivne korelacije između svih ispitivanih varijabli i Gram-pozitivne sepse, što je prikazano u Tabeli 20. Pozitivne korelacije između učestalosti PMN-MDSC i M-MDSC i Gram-pozitivne sepse prikazane su Slikom 13.

Varijable 1. dan	PMN-MDSC učestalost	PMN-MDSC apsolutni broj	M-MDSC učestalost	M-MDSC apsolutni broj
Gram-pozitivna hemokultura	0,185; p=0,261	0,328; p=0,040	0,258; p=0,113	0,378; p=0,018
PMN-MDSC učestalost		0,854; p=0,000	-0,152; p=0,356	-0,221; p=0,177
PMN-MDSC apsolutni broj			0,043; p=0,797	0,154; p=0,350
M-MDSC učestalost				0,866; p=0,000

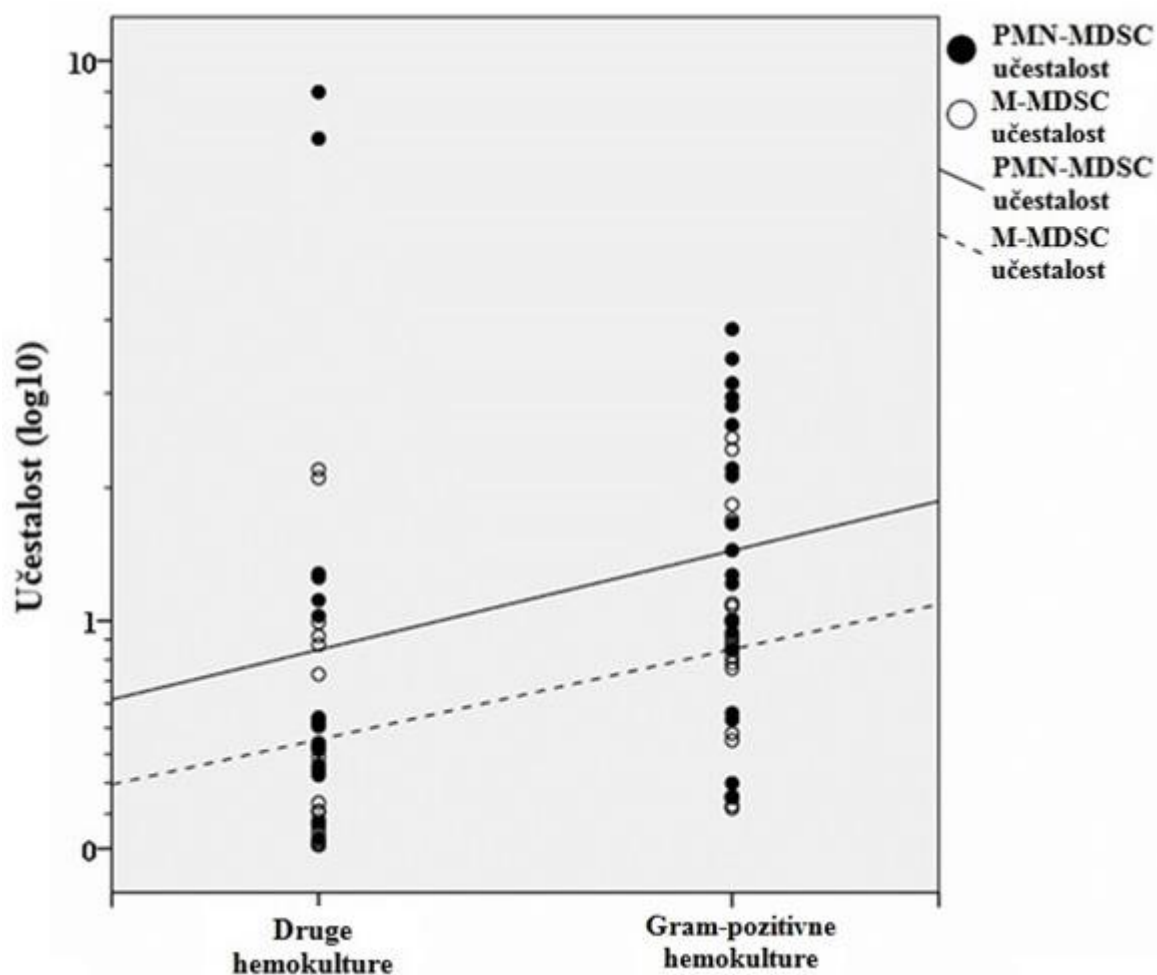
Tabela 19. Spearmanov koeficijent korelacije ρ između varijabli 1. dana i Gram-pozitivne sepse.



Slika 12. Apsolutni brojevi PMN-MDSC i M-MDSC 1. dana na logaritmovanoj skali u odnosu na Gram-pozitivne i druge hemokulture.

Varijable 5. dan	PMN-MDSC učestalost	PMN-MDSC apsolutni broj	M-MDSC učestalost	M-MDSC apsolutni broj
Gram-pozitivna hemokultura	0,401; p=0,013	0,428; p=0,007	0,440; p=0,006	0,466; p=0,003
PMN-MDSC učestalost		0,818; p=0,000	0,484; p=0,002	0,389; p=0,016
PMN-MDSC apsolutni broj			0,663; p=0,000	0,749; p=0,000
M-MDSC učestalost				0,899; p=0,000

Tabela 20. Spearmanov koeficijent korelacije ρ između varijabli 5. dana i Gram-pozitivne sepse.



Slika 13. Učestalosti PMN-MDSC i M-MDSC 5. dana na logaritmovanoj skali u odnosu na Gram-pozitivne i druge hemokulture.

4.4 Odnosi neutrofila i PMN-MDSC (Ne/PMN-MDSC) i monocita i M-MDSC (Mo/M-MDSC) u sepsi prema prirodi bakterijemije

Odnosi Ne/PMN-MDSC i Mo/M-MDSC kod septičnih pacijenata prema prirodi bakterijemije 1. i 5. dana praćenja prikazani su u Tabeli 21.

Odnosi Ne/PMN-MDSC i Mo/M-MDSC bili su najniži kod kritično obolelih pacijenata sa Gram-pozitivnom bakterijemijom i 1. i 5. dana. Prvog dana ta razlika nije dosegla statistički značaj, ali su 5. dana oba odnosa bila statistički značajno niža kod pacijenata sa Gram-pozitivnom bakterijemijom u poređenju sa pacijentima sa Gram-negativnom ili polimikrobnom hemokulturom (Ne/PMN-MDSC: hi-kvadrat = 6,806, $p < 0,05$; Mo/M-MDSC: hi-kvadrat = 9,070, $p < 0,01$).

Post-hoc Mann-Whitney testom pokazano je da je 5. dana odnos Mo/M-MDSC bio značajno niži kod pacijenata sa Gram-pozitivnom u odnosu na one sa Gram-negativnom hemokulturom ($Z = -2,389$; $p < 0,05$). Takođe, pacijenti sa Gram-pozitivnom hemokulturom imali su značajno niže odnose Ne/PMN-MDSC i Mo/M-MDSC u poređenju sa polimikrobnom hemokulturom (Ne/PMN-MDSC: $Z = -2,781$, $p < 0,01$; Mo/M-MDSC; $Z = -2,493$, $p < 0,01$, respektivno).

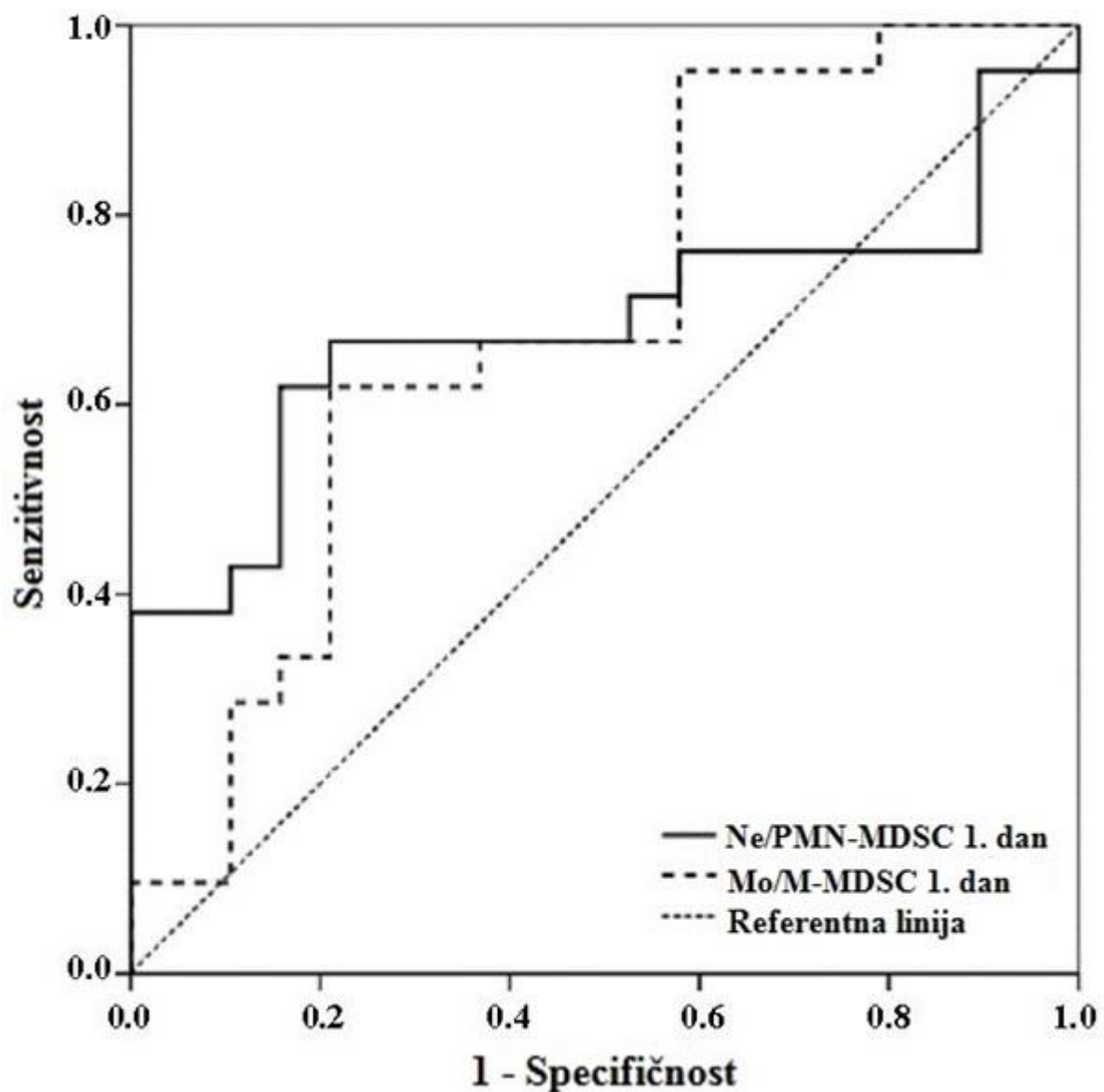
Takođe, nivo Ne/PMN-MDSC bio je značajno niži kod umrlih, i 1. dana ($Z = -1,921$; $p < 0,05$) i 5. dana ($Z = -1,815$; $p < 0,05$).

Parametri	Gram-pozitivna bakterijemija (n=20) srednja vrednost \pm SD; M; (min-max)	Gram-negativna bakterijemija (n=8) srednja vrednost \pm SD; M; (min-max)	Polimikrobna bakterijemija (n=10) srednja vrednost \pm SD; M; (min-max)
Neutrofil x $10^6/L$			
1. dan	11743,33 \pm 8567,86; 9410; (1390 – 28600)	11701,25 \pm 8265,44; 8700; (1960 – 22800)	9909,09 \pm 4823,16; 10300; (1500 – 18300)
5. dan	12893,33 \pm 8141,56; 14500; (1610 - 26000)	6810,00 \pm 3868,92; 6265; (2110 – 14800)	9585,00 \pm 5160,65; 7960; (4500 – 21800)
Odnos neutrofila i PMN-MDSC			
1. dan	481,05 \pm 1039,91; 61,32; (5,55 – 4655,64)	863,99 \pm 1502,29; 375,70; (33,24 – 4553,19)	465,90 \pm 818,14; 229,67; (39,72 – 2909,38)
5. dan	128,10 \pm 250,63; 37,57; (9,60 – 1070,24)	143,12 \pm 139,56; 91,52; (9,65 – 336,13)	589,28 \pm 890,21; 217,10; (27,71 – 2625,67)
Monociti x $10^6/L$			
1. dan	718,09 \pm 706,23; 600; (43 – 2610)	566,50 \pm 341,08; 510; (100 – 1090)	533,63 \pm 346,21; 537; (50 – 1120)
5. dan	801,00 \pm 742,35; 697; (43 - 3460)	430,25 \pm 189,21; 411; (170 – 670)	699,80 \pm 449,03; 525; (310 – 1810)
Odnos monocita i M-MDSC			
1. dan	16,02 \pm 23,86; 8,38; (0,60 – 114,09)	93,98 \pm 128,28; 12,72; (5,96 – 347,72)	47,59 \pm 62,44; 16,09; (2,24 – 209,17)
5. dan	9,25 \pm 10,64; 6,54; (0,65 – 36,47)	134,07 \pm 237,85; 23,80; (2,32 – 671,14)	133,29 \pm 222,34; 37,95; (4,03 – 702,78)

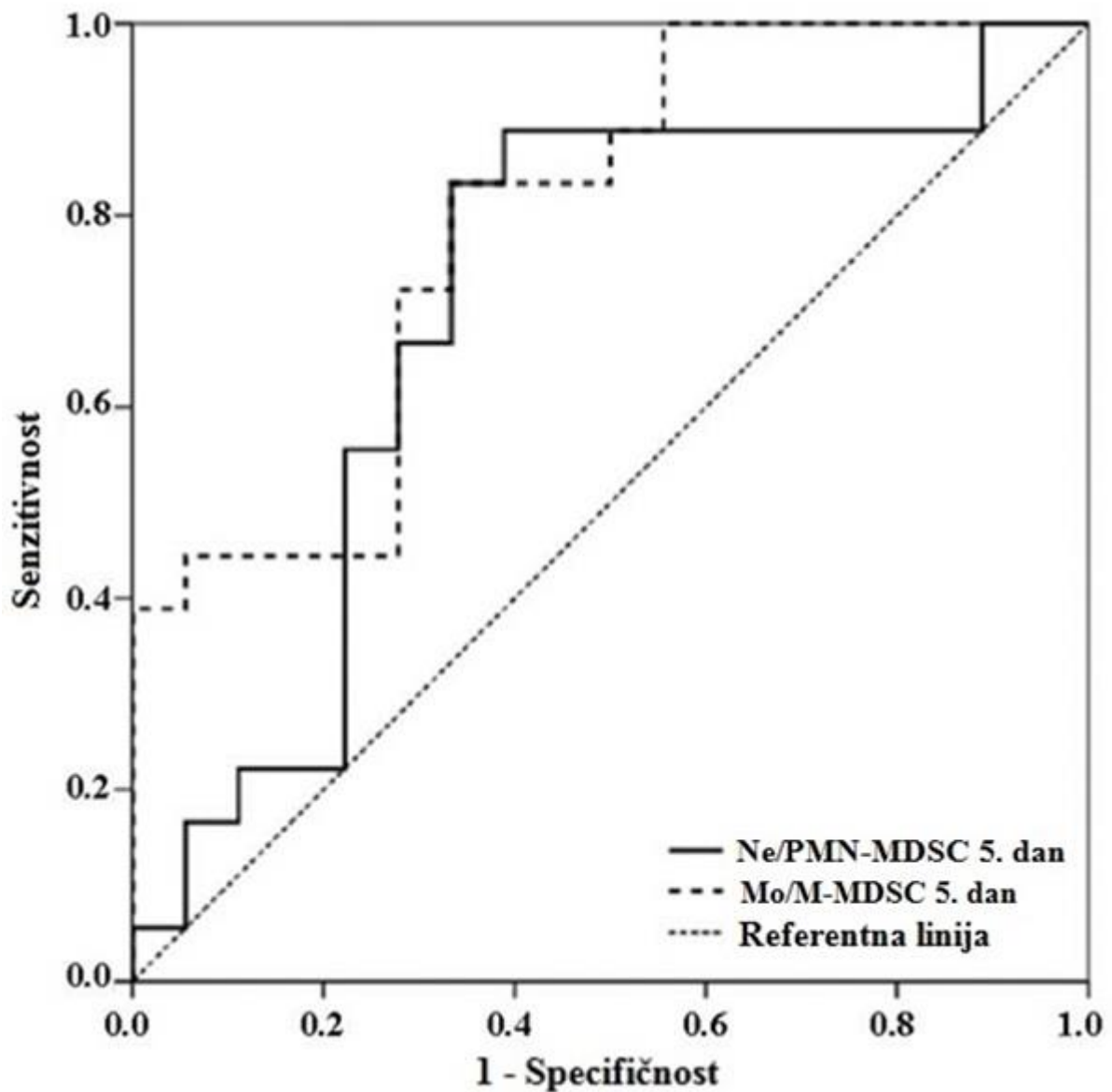
Tabela 21. Odnos Ne/PMN-MDSC i Mo/M-MDSC kod septičnih pacijenata prema prirodi bakterijemije 1. i 5. dana praćenja.
SD – standardna devijacija; M – medijana; min – minimum; max – maksimum.

4.5 Klinička tačnost odnosa Ne/PMN-MDSC i Mo/M-MDSC u predviđanju prirode bakterijemije i ishoda

Ispitivana je klinička tačnost odnosa Ne/PMN-MDSC i Mo/M-MDSC u predviđanju prirode bakterijemije i ishoda. Diskriminativna moć i Ne/PMN-MDSC i Mo/M-MDSC odnosa u predviđanju Gram-pozitivne hemokulture bila je statistički značajna i 1. i 5. dana. Rezultati su prikazani Slikama 14 i 15 i u Tabeli 22.



Slika 14. ROC kriva odnosa Ne/PMN-MDSC i Mo/M-MDSC 1. dana kod pacijenata sa Gram-pozitivnom hemokulturom.



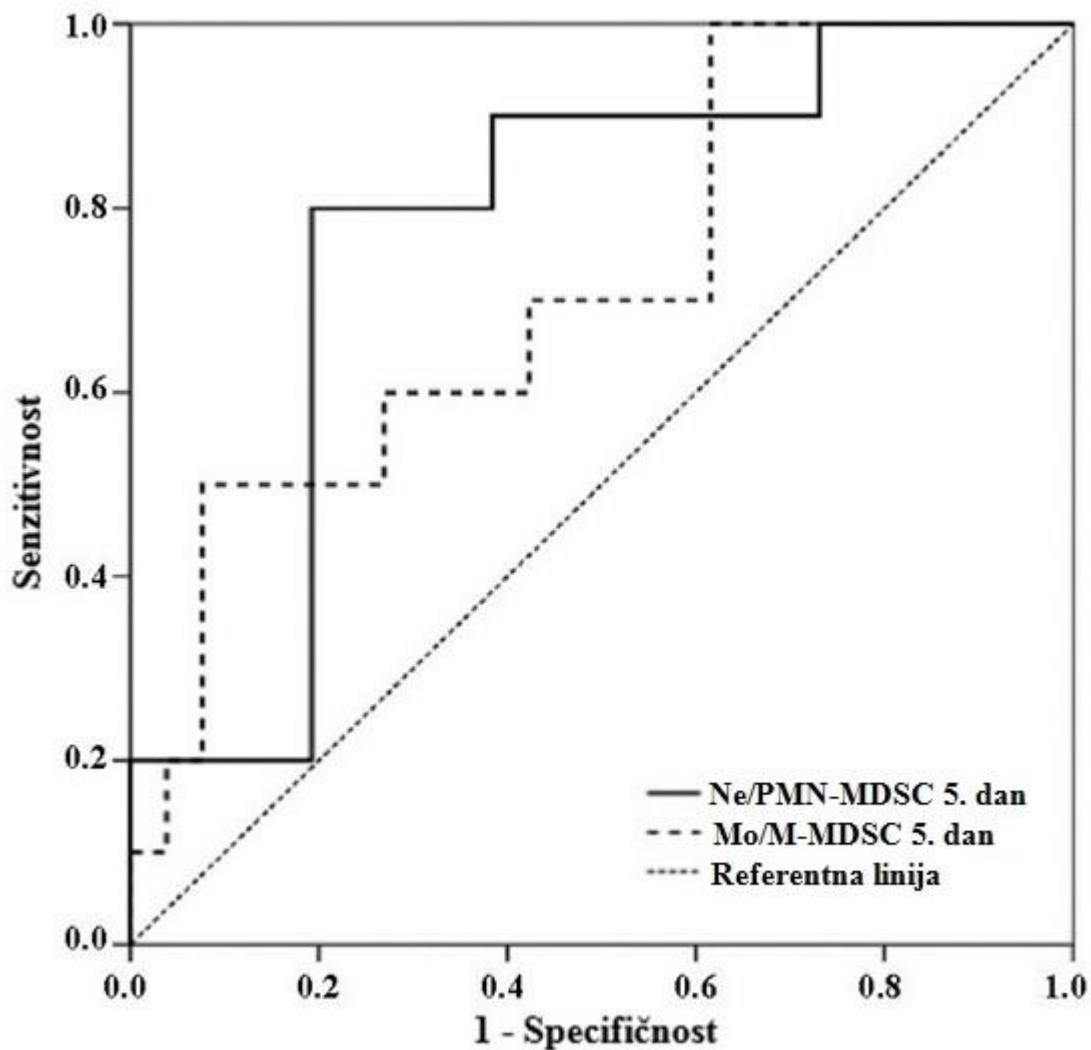
Slika 15. ROC kriva odnosa Ne/PMN-MDSC i Mo/M-MDSC 5. dana kod pacijenata sa Gram-pozitivnom hemokulturom.

Parametar	AUC ROC	p vrednost	95% interval pouzdanosti		Granična vrednost (<i>cut-off</i>)	Senzitivnost (%)	Specifičnost (%)	Youdenov index
			Donja granica	Gornja granica				
Ne/PMN-MDSC 1. dan	0,684	p < 0,05	0,510	0,858	121,86	61,9	84,2	0,46
Mo/M-MDSC 1. dan	0,692	p < 0,05	0,524	0,860	9,98	61,9	78,9	0,41
Ne/PMN-MDSC 5. dan	0,707	p < 0,05	0,527	0,887	185,53	88,9	61,1	0,50
Mo/M-MDSC 5. dan	0,793	p < 0,01	0,648	0,939	13,69	83,3	66,7	0,50

Tabela 22. Klinička tačnost odnosa Ne/PMN-MDSC i Mo/M-MDSC u predviđanju Gram-pozitivne hemokulture 1. i 5. dana praćenja.

Odnosi Ne/PMN-MDSC i Mo/M-MDSC niži od graničnih vrednosti bili su umereno dobri prediktori Gram-pozitivne hemokulture i 1. i 5. dana kod kritično obolelih pacijenata sa sekundarnom sepsom.

Klinička tačnost Ne/PMN-MDSC i Mo/M-MDSC odnosa u predviđanju polimikrobne hemokulture bila je statistički značajna 5. dana. Rezultati su prikazani Slikom 16 i u Tabeli 23.



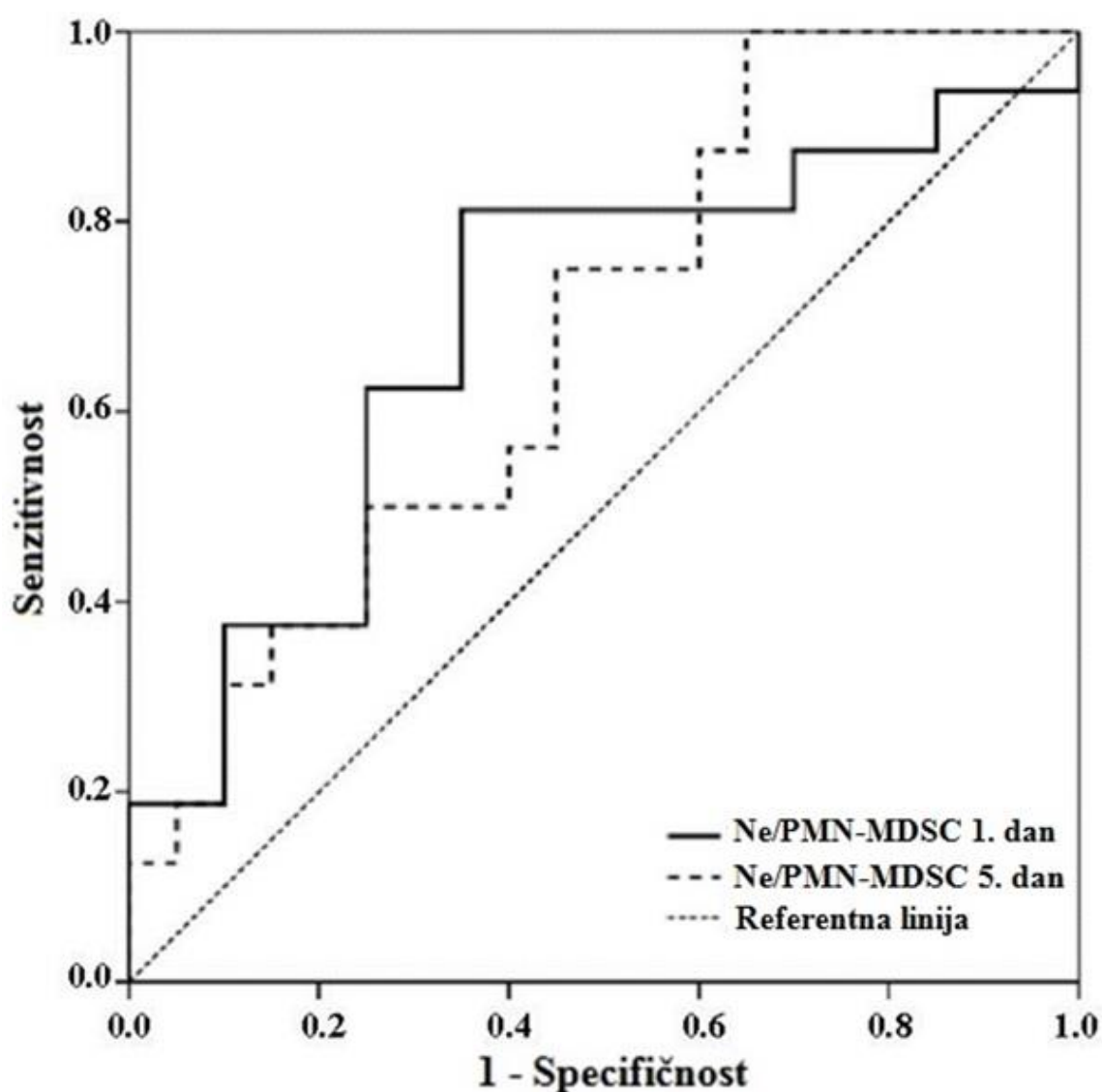
Slika 16. ROC kriva odnosa Ne/PMN-MDSC i Mo/M-MDSC 5. dana kod pacijenata sa polimikrobnom hemokulturom.

Parametar	AUC ROC	p vrednost	95% interval pouzdanosti		Granična vrednost	Senzitivnost (%)	Specifičnost (%)	Youdenov index
			Donja granica	Gornja granica				
Ne/PMN-MDSC 5. dan	0,773	p < 0,01	0,606	0,940	185,53	80,0	81,0	0,61
Mo/M-MDSC 5. dan	0,719	p < 0,05	0,533	0,906	45,64	50,0	92,3	0,42

Tabela 23. Klinička tačnost odnosa Ne/PMN-MDSC i Mo/M-MDSC u predviđanju polimikrobne hemokulture 5. dana praćenja.

Ne/PMN-MDSC i Mo/M-MDSC odnosi viši od respektivnih graničnih vrednosti prediktori su polimikrobne hemokulture 5. dana kod kritično obolelih pacijenata sa sekundarnom sepsom. Ne/PMN-MDSC odnos ima dobru, dok Mo/M-MDSC odnos ima umerenu diskriminativnu moć.

Ispitivana je klinička tačnost oba odnosa u predviđanju smrtnog ishoda. Ne/PMN-MDSC odnos niži od granične vrednosti umeren je prediktor smrtnog ishoda i 1. i 5. dana u ovoj populaciji pacijenata. Diskriminativna moć Mo/M-MDSC u pogledu ishoda nije bila značajna. Rezultati su prikazani Slikom 17 i u Tabeli 24.



Slika 17. ROC kriva odnosa Ne/PMN-MDSC 1. i 5. dana praćenja kod umrlih pacijenata.

Parametar	AUC ROC	p vrednost	95% interval pouzdanosti		Granična vrednost	Senzitivnost (%)	Specifičnost (%)	Youdenov index
			Donja granica	Gornja granica				
Ne/PMN-MDSC 1. dan	0,694	p < 0,05	0,513	0,875	241,53	81,3	65,0	0,46
Ne/PMN-MDSC 5. dan	0,678	p < 0,05	0,504	0,853	262,90	100,0	35,0	0,35

Tabela 24. Klinička tačnost odnosa Ne/PMN-MDSC u predikciji letalnog ishoda 1. i 5. dana praćenja.

4.6 Nije nađena povezanost osnovnih uzroka sekundarne sepse sa akumulacijom MDSC

Osnovni uzroci sekundarne sepse kod naših pacijenata bili su pankreatitis, peritonitis i trauma. Pacijenti sa različitim osnovnim uzrocima sepse smatrani su za posebne grupe i poređene su učestalosti i apsolutni brojevi njihovih PMN-MDSC i M-MDSC. Nije bilo statistički značajnih razlika između ove tri grupe ni 1. ni 5. dana ($p > 0,05$), stoga je ekspanzija MDSC bila povezana sa sekundarnom infekcijom bez obzira na prirodu primarnog insulta (pankreatitis, peritonitis, trauma).

5. DISKUSIJA

Sepsa je jedan od vodećih uzroka smrti u JIL širom sveta, a još uvek ne postoji jedinstvena opšteprihvaćena definicija ovog sindroma, niti su u potpunosti rasvetljeni patobiološki mehanizmi koji dovode do njegove pojave. Imunska disfunkcija je česta kod kritično obolelih pacijenata i može uticati na morbiditet i mortalitet, posebno kod teške traume i/ili sepse, pa je uloga imunskih ćelija i medijatora u imunskom odgovoru kod kritično obolelih i dalje predmet istraživanja.^{259,260} Danas se smatra da se u sepsi istovremeno pokreću proinflamatorni i antiinflamatorni odgovori sa poremećenim odgovorom domaćina na infekciju,^{3,16} a da većina pacijenata umire u stanju produžene imunosupresije.^{16,94,121}

Važna komponenta u septičnoj imunosupresiji mogle bi biti supresorske ćelije mijeloidnog porekla (MDSC) koje su intenzivno proučavane u kontekstu različitih malignih bolesti, ali retko i nedovoljno u ljudskoj sepsi. Većina studija je rađena na mišjim modelima sepse, i dok su neke studije pokazale da mišje Gr-1⁺CD11b⁺ MDSC suprimiraju stečenu imunost u modelu polimikrobne sepse i dovode do Th2 polarizacije imunskog odgovora,²¹³ druge su ukazale na ključnu ulogu MDSC kao regulatora urođenog imunskog odgovora, pa čak i na protektivnu ulogu ovih ćelija u polimikrobnoj sepsi.^{205,261}

5.1 Detekcija PMN-MDSC i M-MDSC

Da bismo ispitali da li su vrednosti MDSC povišene u perifernoj krvi pacijenata sa sekundarnom sepsom, te da li koreliraju sa ishodom, vrstom bakterijskog prouzrokovača i osnovnim oboljenjem koje je dovelo do sepse, sproveli smo prospektivnu studiju koja je uključivala 40 pacijenata sa sepsom i/ili septičnim šokom kao posledicama pankreatitisa, peritonitisa i traume. Detektovali smo i odredili učestalost i apsolutni broj MDSC u krvi 1. dana (dan ispunjavanja kriterijuma za sepsu i/ili septični šok i uključivanja u studiju) i 5. dana. Prvi i peti dan su odabrani jer su studije na životinjama pokazale dinamične promene u broju i funkciji MDSC tokom sepse.²¹³ Prema studiji Derivea i saradnika, MDSC prikupljene i 3. i 10. dana inhibirale su proliferaciju T ćelija, međutim, samo su MDSC prikupljene 10. dana mogle da smanje peritonealno oslobađanje citokina, pojačaju eliminaciju bakterija i poboljšaju preživljavanje.²⁶¹ U drugoj studiji, autori su na životinjskom modelu sepse pokazali da je rani adoptivni transfer (3. dana) MDSC iz septičnih u naivne miševe, odmah

nakon cekalnog podvezivanja i punkcije, doveo do porasta proinflatornih citokina, smanjenog peritonealnog rasta bakterija i visoke stope ranog mortaliteta. Za razliku od ranog adoptivnog transfera, kasni transfer MDSC (12. dana) imao je suprotne efekte.²⁶² Stoga, u našoj studiji ćelije koje fenotipski korespondiraju sa MDSC 1. dana odgovaraju ranim MDSC u životinjskom modelu sepse, dok je detekcija MDSC 5. dana izabrana imajući u vidu da je preživljavanje kritično obolelih pacijenata sa sekundarnom sepsom i/ili septičnim šokom do 10. ili 12. dana prilično neizvesno. U ovoj studiji smo se fokusirali na kvantifikovanje MDSC u perifernoj krvi septičnih pacijenata pa stoga nismo sprovodili funkcionalnu analizu.

Analizirali smo uzorke sveže krvi, a u skladu sa studijama koje su pokazale da su i broj i funkcija MDSC, a naročito PMN-MDSC, izrazito osetljivi na procedure zamrzavanja i odmrzavanja.^{263,264} Takođe, Stanojević i saradnici su u studiji sa obolelima od melanoma kože naglasili da je rukovanje uzorcima od velikog značaja tokom detekcije MDSC protočnom citometrijom, i ukazali na prednosti korišćenja svežih liziranih uzoraka periferne krvi za imunofenotipsku analizu.²⁶⁵

MDSC smo definisali kao $\text{Lin}^-(\text{CD3}^-/\text{CD19}^-/\text{CD56}^-)/\text{HLA-DR}^{-/\text{low}}\text{CD11b}^+$ ćelije. Unutar ove ćelijske populacije, PMN-MDSC su definisane kao $\text{CD14}^-\text{CD15}^+$, a M-MDSC kao $\text{CD14}^+\text{CD15}^-$.^{176,265} Za dodatno razlikovanje PMN-MDSC od zrelih neutrofila korišćen je marker CD10,^{266,267} a za razlikovanje od zrelih neutrofila i eozinofila CD16.^{266,268} Stoga je ciljna populacija PMN-MDSC bila CD10^- i imala je nižu i nehomogenu ekspresiju CD11b, CD15 i CD16.²⁶⁹

S obzirom na to da se kod ljudi MDSC zadržavaju u sloju mononuklearnih ćelija periferne krvi (PBMC) na gradijentu gustine,²⁷⁰⁻²⁷² uradili smo komparativnu analizu ćelija iz svežih liziranih uzoraka periferne krvi i ćelija iz mononuklearnog sloja dobijenog centrifugiranjem na gradijentu gustine. Utvrdili smo da se ćelije istog predefinisano fenotipa zadržavaju u PBMC na gradijentu gustine. Nakon potvrde da naše ciljne ćelije imaju izmenjenu flotacijsku gustinu, dalje analize su rađene sa svežim liziranim uzorcima periferne krvi.

Važno je napomenuti da nije lako razlikovati PMN-MDSC od zrelih aktiviranih granulocita i tumor-asociranih neutrofila (TAN) sa N2 protumorskim fenotipom, ne samo imunofenotipski, nego i funkcionalno, a ponekad i morfološki.^{176,273,274} Danas je, takođe, nejasno da li su heterogene PMN-MDSC subpopulacija aktiviranih ili reprogramiranih zrelih ćelija,^{268,273,275} ili su PMN-MDSC posebna granulocitna populacija, na šta je ukazala analiza

transkriptoma naivnih neutrofila, PMN-MDSC i TAN.^{276,277} S obzirom na debatu o plastičnosti i neutrofila i MDSC, zanimljiva je studija u kojoj su Sagiv i saradnici pronašli tri subpopulacije cirkulišućih neutrofila u perifernoj krvi miševa sa tumorom ili indukovanim peritonitisom, kao i kod ljudi sa karcinomom: 'normalne' zrele neutrofile velike gustine (HDN), nezrele PMN-MDSC, i zrele neutrofile male gustine (LDN) koji su se zajedno sa PMN-MDSC zadržavali u PBMC frakciji na gradijentu gustine. Autori su, takođe, pronašli da LDN imaju veće prednje, a podjednako bočno rasipanje u odnosu na HDN, što je ukazivalo na to da su LDN imali manju gustinu od HDN zbog veće zapremine, a ne zbog degranulacije. LDN su, kao i PMN-MDSC, bili imunosupresivni i dobrim delom (40 – 70%) su poticali od HDN koji su menjali fenotip pod uticajem TGF- β . Pokazano je i da LDN, u manjoj meri, mogu da promene gustinu u 'normalnu' veliku.²⁷⁸

Mi smo pretpostavili da bi i heterogene PMN-MDSC mogle menjati gustinu, pa bi analiza svežih liziranih uzoraka periferne krvi imala prednost u odnosu na analizu MDSC iz sloja mononuklearnih ćelija na gradijentu gustine, jer bi otkrila moguće MDSC velike gustine. Ipak, komparativna analiza je pokazala nisku flotacijsku gustinu naših ciljnih ćelija, što je u skladu sa mnogim studijama koje su pokazale imunosupresivni kapacitet ćelija sličnih granulocitima male gustine.^{250,253,270,275}

Za razliku od studije Sagiv i saradnika, u studiji Uhela i saradnika pronađeno je da su LDG kod pacijenata sa sepsom imali manje i prednje i bočno rasipanje u odnosu na HDG, odnosno da su imali i manju veličinu i manju granularnost. Neutrofilna aktivacija i degranulacija potvrđene su i višim nivoom ekspresije markera degranulacije CD35, CD63 i CD66b na LDG u poređenju sa HDG.²⁵³ Da bi ispitali da li se LDG i HDG mogu i fenotipski razlikovati, autori su uporedili CD15⁺ ćelije iz obe frakcije prema nivou ekspresije markera zrelosti CD11b i CD16. LDG su pokazali veći udeo nezrelih CD11b⁻CD16⁻ promijelocita, CD11b⁺CD16⁻ mijelocita i CD11b⁺CD16^{low} metamijelocita, a manji udeo zrelih CD11b⁺CD16^{high} polimorfonukleara u odnosu na HDG. Ovaj nalaz je potvrđen i morfološkom analizom ćelija.²⁵³

Međutim, imajući u vidu da se ekspresija CD16 na zrelim neutrofilima smanjuje nakon aktivacije,²⁶⁶ u našoj studiji smo za razlikovanje PMN-MDSC od zrelih neutrofila, osim CD11b i CD16, koristili i marker CD10 koji se eksprimira samo na zrelim segmentiranim neutrofilima.^{265,266,279} Takođe, u nedavnoj objavljenj studiji, Marini i saradnici su potvrdili

da se CD10 može koristiti kao fenotipski marker za diskriminaciju zrelih od nezrelih neutrofila kod pacijenata sa akutnim i hroničnim inflamatornim stanjima.²⁶⁷

Koristeći sve navedene markere, u krvi pacijenata sa sepsom detektovali smo obe fenotipski korespondirajuće subpopulacije MDSC, i M-MDSC i PMN-MDSC, 1. i 5. dana po uključivanju u studiju. Pored ovoga, opservirali smo i smanjenu ekspresiju HLA-DR na monocitima, što je marker imunoparalize u sepsi.⁹²

5.2 Učestalost i apsolutni brojevi PMN-MDSC i M-MDSC koreliraju sa smrtnim ishodom

Kao što je pomenuto, još nije definitivno razjašnjeno da li su MDSC korisne ili štetne za pacijente sa sepsom i šta odlučuje o tome.²⁸⁰ U eksperimentalnom životinjskom modelu sepse Delano i saradnici su pokazali da se Gr-1⁺CD11b⁺ MDSC akumuliraju u kostnoj srži i perifernim limfnim organima kod miševa tokom polimikrobne sepse, te da doprinose supresiji T-ćelija koja se viđa nakon sepse, kao i Th2 polarizaciji imunskog odgovora.²¹³ Na osnovu opservacija Delanove grupe pretpostavljalo se da je MDSC populacija štetna za septičnog domaćina. Iznenadjuće, blokada ekspanzije MDSC korišćenjem gemcitabina ili anti-Gr-1 antitela, u cilju poboljšanja preživljavanja septičnih miševa, dovela je do neočekivanog, dramatično pogoršanog ishoda. Ovo smanjeno preživljavanje septičnih miševa delimično je objašnjeno neselektivnom aktivnišću gemcitabina i anti-Gr-1 antitela, pa ipak, povoljan efekat blokade MDSC nije postignut.¹⁷³ U studiji Sandera i saradnika, adoptivni transfer MDSC smanjio je mortalitet septičnih miševa koji su imali deficit gp130-STAT3 signalizacije u jetri, inače neophodne za kontrolu sistemske inflamacije, te mobilizaciju i akumulaciju MDSC u tkivima.²⁰⁵ Poboľšano preživljavanje septičnih miševa nakon adoptivnog transfera kasnih MDSC zabeleženo je i u drugim studijama.^{261,262}

Gore navedeni dokazi mogu navesti na pomisao da je akumulacija MDSC korisna za septičnog domaćina. Ali, kao što su naglasili Cuenca i saradnici, te Delano i saradnici, funkcija i uloga MDSC u sepsi ne mogu se ovako pojednostaviti.^{173,213} I dalje postoji kompleksan odnos između uticaja MDSC na težinu sepse i preživljavanje s jedne strane i kinetike njihove akumulacije u sepsi s druge.

Mi smo detektovali značajno veće relativne vrednosti PMN-MDSC kod umrlih i 1. i 5. dana praćenja u odnosu na preživjele. Razlika u učestalosti PMN-MDSC između preživjelih i umrlih bila je najizraženija 5. dana, statistički veoma značajna ($p < 0,01$). Apsolutni broj PMN-MDSC 5. dana takođe je bio značajno veći kod umrlih u odnosu na preživjele. Relativne vrednosti M-MDSC bile su značajno veće 5. dana u odnosu na 1. dan unutar grupa preživjelih i umrlih, ali je samo 5. dana učestalost M-MDSC u grupi umrlih bila značajno veća od učestalosti u grupi preživjelih.

Prvog dana nijedna varijabla nije bila nezavisan prediktor smrtnog ishoda. Međutim, 5. dana SOFA skor i učestalost PMN-MDSC bili su nezavisni prediktori smrtnog ishoda. Ovo je potvrđeno analizom ROC krive koja je otkrila dobru diskriminativnu moć učestalosti PMN-MDSC 5. dana u predviđanju smrtnog ishoda (AUC ROC 0,758), dok su apsolutni broj PMN-MDSC i učestalost M-MDSC bili prihvatljivi prediktori smrtnog ishoda (AUC ROC 0,692 i 0,699, respektivno). Takođe, analiza Spearmanovog koeficijenta korelacije ρ pokazala je da je najснаžnija statistički značajna pozitivna korelacija postojala između učestalosti PMN-MDSC 5. dana i smrtnog ishoda, u odnosu na druge ispitivane prediktore.

Slično ovome, u životinjskom modelu sepse Cuenca i saradnici nisu našli nikakve promene u broju $CD11b^+Gr-1^+$ u slezini ili perifernim limfnim čvorovima u prva 24 časa nakon sepse. Prvu ekspanziju $CD11b^+Gr-1^+$ ćelija pronašli su u slezini i perifernim limfnim čvorovima tek nakon 3-5 dana, uz kontinuirani porast njihove koncentracije u narednih 10-14 dana.¹⁷³ Svi podaci u vezi s porastom MDSC u sepsi u skladu su sa teorijom po kojoj se imunski odgovor domaćina na sepsu karakteriše inicijalnom hiperinflamatornom fazom koja evoluirala u narednim danima u produženu imunosupresivnu fazu.⁸⁴ Brudecka i saradnici takođe su dokumentovali postepeni porast $Gr-1^+CD11b^+$ nakon indukcije polimikrobne sepse kod miševa, sa dramatičnom ekspanzijom ovih ćelija nezrelog fenotipa u kasnoj sepsi. Njihovi nalazi podržavaju mišljenje da MDSC doprinose sekundarnoj, imunosupresivnoj fazi sepse. Ovi istraživači jasno su pokazali da $Gr-1^+CD11b^+$ ćelije kasne sepse imaju imunosupresivne sposobnosti. Naime, pokazali su da je adoptivni transfer $Gr-1^+CD11b^+$ ćelija iz kostne srži miševa koji su bili u 12. danu sepse u naivne miševe, odmah nakon indukcije sepse cecalnim podvezivanjem i punkcijom, značajno poboljšao preživljavanje rane sepse. Pored ovoga, nivoi IL-10 i TGF- β bili su značajno viši kod miševa koji su primili $Gr-1^+CD11b^+$ ćelije iz miševa u 12. danu sepse, nego kod miševa koji su primili fiziološki rastvor ili ćelije iz miševa koji su bili u 3. danu sepse.²⁶²

S obzirom na to da većina informacija o biologiji MDSC potiče iz studija na mišjim modelima bolesti, na ovom mestu je potrebno naglasiti da se u poslednjih nekoliko godina u naučnoj zajednici debatuje o tome koliko dobro mišji modeli oponašaju ljudske bolesti, a posebno teška inflamatorna stanja, poput traume, opekotina i sepse. Iako su se i ranije razmatrala ograničenja mišjeg modela sepse, obnovljena i žustra debata počela je nakon objavljivanja studije Seoka i saradnika koja je poredila mišji i ljudski transkriptom u akutnim inflamatornim stanjima.²⁸¹ Istraživači su pronašli da genomski odgovori u mišjim modelima loše koreliraju i unutar vrste i sa genomskim odgovorima kod ljudi sa akutnom inflamacijom (trauma, opekotine, endotoksemija), dok je ekspresija gena kod ljudi bila veoma konzistentna uprkos velikoj heterogenosti populacije.²⁸¹ U odgovoru na ovaj rad, ukazano je i na ograničenja i na prednosti izučavanja mišjih modela inflamatornih bolesti.^{282–284} U ograničenja, između ostalog spadaju fundamentalne razlike između vrsta, uključujući razlike u urođenoj i stečenoj imunosti; razlike među sojevima miševa korišćenih u eksperimentima, a posebno upotreba miševa visoke srodnosti (inbred); različiti modeli mišje sepse; upotreba miševa koji po starosti odgovaraju tinejdžerima, a ne starijoj populaciji koju najčešće pogađa sepsa; vremensko nepodudaranje odgovora na insult kod miševa i ljudi – kod miševa je odgovor mnogo brži, a vreme potrebno da se nivo ekspresije gena vrati na normalan nivo meri se danima, dok se kod ljudi sepsa razvija nekoliko sati ili dana, a do normalizacije ekspresije gena dolazi mesecima, pa i godinama kasnije; heterogenost ljudske populacije i prisustvo komorbiditeta i/ili komplikacija sepse kod pacijenata što se teško može reprodukovati kod miševa; rutinska primena antibiotika, i naročito, suportivnih mera u JIL od kojih su neke neizvodljive na miševima itd.^{282–284} U svemu navedenom treba tražiti moguće razloge za uočene diskrepance između uloge MDSC u mišjim modelima sepse i ljudskoj sepsi.

U jednoj od trenutno retkih objavljenih studija koje ispituju ulogu MDSC u ljudskoj sepsi, Mathias i saradnici fokusirali su se na pacijente koji će da razviju PICS nakon sepse, dominantan klinički fenotip kod pacijenata u JIL, za koje je sadašnja terapija neefikasna.²⁵² Ispitali su da li je za imunski odgovor u hroničnoj sepsi ključna ekspanzija MDSC, kao integralni deo 'urgentne mijelopoeze' usmerene na očuvanje urođene imunosti. U studiju su uključili pacijente sa teškom sepsom i septičnim šokom, a krv je prikupljena u prvih 12 sati od dijagnoze teške sepse/septičnog šoka, i nadalje u određenim vremenskim intervalima do 28. dana. Ispitivane su CD14⁺ M-MDSC i CD14⁻CD15⁺ PMN-MDSC unutar CD33⁺CD11b⁺HLA-DR^{-low} populacije, a urađene su i funkcionalne i genomske analize.

MDSC su bile funkcionalno imunosupresivne, dok su smanjena ekspresija HLA gena i ushodna regulacija gena arginaze 1 bile u skladu sa obrascem istovremene niske inflamacije i imunosupresije, što odgovara PICS-u. Pronašli su da su perzistentno visoki procenti MDSC veoma prediktivni u pogledu lošeg funkcionalnog statusa pri otpustu i da su pacijenti sa takvim nalazom imali veću verovatnoću dobijanja bar jedne nozokomijalne infekcije. I ova grupa je, kao i naša, pokazala da vrednosti MDSC rastu akutno u sepsi i septičnom šoku. Pacijenti sa ranim mortalitetom (7. dan) imali su najveće procenete MDSC već u prvih 12 i 24 sata u odnosu na pacijente sa preživljavanjem dužim od 14 dana, a zatim su procenti MDSC naglo opadali do smrti. Procenti PMN-MDSC bili su značajno povišeni u svim vremenskim presecima kod pacijenata koji su boravili u JIL duže od 14 dana.²⁵² Ovi rezultati su slični našem nalazu da su veće vrednosti MDSC udružene sa nepovoljnim ishodom.

Uhel i saradnici su pronašli značajno povišene vrednosti M-MDSC kod septičnih pacijenata, ali i kod pacijenata u JIL koji nisu imali sepsu, dok su povišene vrednosti PMN-MDSC bile specifične za septične pacijente i perzistirale su najmanje 14 dana. Visok inicijalni udeo PMN-MDSC u sloju mononuklearnih ćelija na gustinskom gradijentu bio je, za razliku od M-MDSC, udružen sa većim rizikom od naknadnog razvoja nozokomijalnih infekcija. Za razliku od nas, ovi autori nisu pronašli statistički značajnu povezanost između vrednosti MDSC i preživljavanja/umiranja.²⁵³

Zanimljivo je da je studija Geya i saradnika koja je ispitivala nehirurške kritično obolele pacijente u JIL bez traume, koji u vreme uključivanja u studiju nisu imali tešku sepsu ni septični šok, pokazala veoma značajan porast procenta $CD14^+HLA-DR^{-/low}$ M-MDSC i dramatičan porast $Lin^-CD14^-CD33^+HLA-DR^-$ PMN-MDSC u poređenju sa zdravim osobama.²⁸⁵ PMN-MDSC su ekspimirale visoke nivoe arginaze 1. Autori su uporedili PMN-MDSC navedenog fenotipa sa $CD15^+CD14^+HLA-DR^-$ ćelijama i utvrdili da te dve populacije visoko koreliraju. Takođe, pacijenti sa visokim nivoom $CD15^+CD14^+HLA-DR^-$ PMN-MDSC na prijemu imali su povećan rizik od umiranja u prvih 7 dana od uključivanja u studiju, dok su rezultati za $Lin^-CD14^-CD33^+HLA-DR^-$ ćelije bili na granici statističke značajnosti. Takođe, u ovoj grupi pacijenata PMN-MDSC nisu bile povezane sa nozokomijalnim infekcijama u prvih 7 dana boravka u internističkoj JIL, pa su autori zaključili da nema striktno povezanosti PMN-MDSC sa infekcijama.²⁸⁵

Darcy i saradnici su iz krvi septičnih pacijenata izolovali 'interfazne neutrofile', tj. neutrofile koji se izdvajaju na gradijentu gustine zajedno sa mononuklearnim ćelijama. Ove ćelije nisu nađene u krvi bolničke kontrolne grupe, nego samo kod pacijenata sa sepsom. S obzirom na to da su pokazali da interfazni neutrofilni dovode do supresije proliferacije i funkcije T ćelija i to aktivnošću arginaze, autori su zaključili da su ove ćelije neutrofilne MDSC. Takođe su pokazali da su vrednosti neutrofilnih MDSC bile značajno povišene kod pacijenata sa septičnim šokom u odnosu na septične pacijente bez šoka, i da su dovodile do kontinuirane imunopresije u trajanju od barem 7 dana kod pacijenata sa septičnim šokom.²⁵⁰

Na osnovu navedenih nalaza, čini se da je porast vrednosti M-MDSC kod kritično obolelih pacijenata nespecifična reakcija do koje dolazi bez obzira na vrstu primarnog insulta, a da je porast vrednosti PMN-MDSC/LDG nešto specifičniji za sepsu. Ipak, direktno poređenje navedenih studija s našom studijom je otežano zbog razlika u ispitivanim kohortama, različitih mera ishoda, vremena uzimanja uzoraka, vrste sprovedenih analiza i izbora različitih markera za fenotipsku karakterizaciju MDSC, a naročito PMN-MDSC.

5.3 Obe glavne subpopulacije MDSC značajno se akumuliraju u Gram-pozitivnoj sepsi

Na ekspanziju i aktivaciju MDSC, kao dela imunskog odgovora, utiče nekoliko različitih faktora, uključujući infektivne agense.^{156,166,286} Čini se da postoji razlika između Gram-pozitivne i Gram-negativne sepse, na primer u pogledu citokinskog profila.^{287,288} Takođe je pokazano da različiti tipovi mikroorganizama mogu da indukuju specifične podvrste MDSC delujući preko različitih tipova receptora (npr. TLR), sa različitim uticajem na ishod bolesti.

166

Veoma zanimljiva studija Janolsove i saradnika pokazala je predominantnu akumulaciju tipičnih PMN-MDSC (CD14⁻HLA-DR⁻CD15^{+/low}CD11b⁺CD33⁺) i posebno CD14^{low} PMN-MDSC kod pacijenata sa Gram-pozitivnom sepsom. Takođe su pokazali da su CD14^{low} PMN-MDSC značajno moćniji supresori T-ćelijske proliferacije ako su izolovane iz pacijenata sa Gram-pozitivnom sepsom u odnosu na pacijente sa Gram-negativnom sepsom, kao i da mehanizam supresije zavisi od proizvodnje ROS. Morfološka analiza je pokazala da su CD14^{low} PMN-MDSC izolovane iz pacijenata sa Gram-pozitivnom sepsom i septičnim šokom heterogena populacija sa velikim brojem blastnih ćelija, za razliku od istih ćelija

izolovanih iz pacijenata sa Gram-negativnom sepsom koje su morfološki bile slične zrelim PMN, uz prisustvo tipičnih PMN-MDSC sa prstenastim jedrom. S druge strane, udeo tipičnih $CD14^+HLA-DR^{-/low}$ M-MDSC u odnosu na ukupne mononuklearne ćelije bio je značajno povišen u krvi pacijenata sa Gram-negativnom sepsom. Kad je analiziran procenat M-MDSC u ukupnoj $CD14^+$ monocitnoj populaciji, nađeno je da je on značajno povišen i u Gram-pozitivnoj i u Gram-negativnoj sepsi.²⁵¹ Nalazi Janolsove i saradnika ukazuju na to da različiti tipovi bakterija mogu uticati na mijeloidni odgovor septičnog domaćina, i u skladu s tim na nastanak specifičnih podvrsta MDSC koje bi, osim što se morfološki razlikuju, mogle imati i različite funkcije.

U našoj studiji, 5. dana smo pronašli značajno veću učestalost i apsolutni broj i PMN-MDSC i M-MDSC kod pacijenata sa Gram-pozitivnom sepsom u odnosu na pacijente sa polimikrobnom sepsom, pri čemu je apsolutni broj PMN-MDSC u Gram-pozitivnoj sepsi dosegao statistički veoma značajnu razliku u odnosu na apsolutni broj PMN-MDSC u polimikrobnoj sepsi ($p < 0,01$). Takođe, grupa sa Gram-pozitivnom sepsom imala je značajno veći apsolutni broj obe subpopulacije MDSC u odnosu na pacijente sa Gram-negativnom sepsom ($p < 0,05$). Multivarijabilnom logističkom regresionom analizom varijabli 5. dana utvrđeno je da je apsolutni broj M-MDSC nezavisan prediktor Gram-pozitivne sepse. Analiza Spearmanovog koeficijenta korelacije ρ potvrdila je da su 5. dana postojale statistički značajne pozitivne korelacije između učestalosti i apsolutnog broja obe subpopulacije MDSC i Gram-pozitivne sepse. Moguće objašnjenje ovih razlika može ležati u osnovnom razumevanju ekspanzije MDSC koja se viđa u malignim bolestima i produženim infekcijama.^{156,289} Brza reakcija kostne srži u odgovoru na Gram-negativne, a moguće i polimikrobne infektivne prouzrokovaoče možda ne ostavlja dovoljno vremena za dejstvo različitih proinflatornih faktora na mijeloidne prekursore u različitim stadijumima sazrevanja čime bi ih aktivirali/konvertovali u imunosupresivne ćelije. Suprotno ovome, Gram-pozitivni infektivni agensi, indolentniji u pogledu akutnog inflamatornog odgovora, mogli bi dovesti do produžene izloženosti kostne srži dejstvu proinflatornih faktora kreirajući okolinu koja pogoduje akumulaciji MDSC.²⁹⁰ Pored ovoga, u našoj studiji nije nađena značajna razlika u akumulaciji MDSC između pacijenata sa različitim osnovnim uzrocima sekundarne sepse (pankreatitis, peritonitis ili trauma) što govori u prilog veće važnosti kauzalnog infektivnog agensa u nastanku MDSC nego vrste primarnog insulta koji dovodi do sekundarne sepse.

Uhel i saradnici su uradili analizu transkriptoma periferne krvi 29 pacijenata sa sepsom i 15 zdravih donora. U drugu kohortu su uključili 94 pacijenta sa sepsom, 11 pacijenata u JIL uparenih po težini bolesti i 67 zdravih donora za protočno citometrijsku i funkcionalnu analizu da bi razjasnili fenotip, supresivnu aktivnost, poreklo i klinički značaj MDSC kod pacijenata sa sepsom.²⁵³ Njihovi rezultati su pokazali da su MDSC glavni činioci u sepsom indukovanoj imunosupresiji. Pokazali su da kod septičnih pacijenata dolazi do povećane ekspresije gena povezanih sa regrutovanjem i supresivnom funkcijom MDSC (MMP8, MMP9, ARG1, S100A8, S100A9, S100A12, PD-L1, IL-4R, IL-10, MyD88, ADAM17 i dr.), kao i smanjene ekspresije gena udruženih sa inflamatornim odgovorom (CD4, CD8, CD3, IL-8, IL-6 i dr.). Ekspresija dva ključna parametra MDSC, ARG1 i S100A9, pozitivno je i značajno korelirala sa brojem granulocita, dok je obrnuto i značajno korelirala sa brojem limfocita. U krvi septičnih pacijenata nađene su značajno povišene vrednosti monocita (uglavnom CD14⁺⁺CD16⁺ podtipa), CD14⁺HLA-DR^{-low} M-MDSC i CD14⁻CD15⁺ PMN-MDSC/LDG, kao i porast broja cirkulišućih zrelih i nezrelih granulocita. Porast PMN-MDSC bio je specifičan za septične pacijente u odnosu na pacijente bez sepse i predviđao je razvoj nozokomijalnih infekcija. Autori su nadalje pokazali da su CD14⁺ monociti (koji su takođe i HLA-DR^{-low}) i CD15⁺ LDG iz septičnih pacijenata suprimirali proliferaciju T-ćelija *in vitro* te da ih treba smatrati za MDSC u sepsi. Takođe, našli su da su ključni proizvođači arginaze 1 u sepsi PMN-MDSC/LDG. Suprotno našim rezultatima, ovi istraživači nisu pronašli povezanost PMN-MDSC sa Gram-prebojavanjem uzročnog mikroorganizma, ali su pronašli veći broj CD14⁺HLA-DR^{-low} monocita kod pacijenata sa Gram-negativnom sepsom.²⁵³

5.4 Odnosi Ne/PMN-MDSC i Mo/M-MDSC u predikciji prirode bakterijemije i ishoda

Istraživanja MDSC u različitim tumorima i mišjim modelima sepse ukazala su na veliku fenotipsku i funkcionalnu plastičnost ovih ćelija u odgovoru na uslove u inflamatornom miljeu. Studije sa MDSC izolovanim iz miševa sa sepsom ili tumorima pokazale su da ove ćelije zadržavaju sposobnost diferentovanja u DC ili makrofage, pa i u zrele neutrofile u odgovarajućim *in vitro* i *in vivo* uslovima.^{213,291,292}

Osim MDSC, i zreli monociti i granulociti u sepsi pokazuju promene u funkciji i fenotipu.^{250,251,253,293} Na primer, 'interfazni neutrofile' koje su Darcy i saradnici detektovali samo kod

septičnih pacijenata, morfološki su bili mešavina zrelih i nezrelih (štapićastih) neutrofila, a fenotipski su odgovarali zrelim neutrofilima (visoka ekspresija CD66b, CD15, CD11b, CD45RO; intermedijarna ekspresija CD16; niska ili odsutna ekspresija CD33, HLA-DR, CD14, CD62L i dr.). Autori su smatrali da bi ove ćelije mogle biti hiperaktivirani, degranulirani zreli granulociti, ali da se, s obzirom na supresivnu funkciju, mogu smatrati za neutrofilne MDSC.²⁵⁰ Janolsova i saradnici su našli i tipične CD14⁻ PMN-MDSC i CD14^{low} PMN-MDSC/LDG kod pacijenata sa sepsom,²⁵¹ dok su Uhel i saradnici, između ostalog, pronašli i veoma značajan porast CD14⁺⁺CD16⁺ monocita kod septičnih pacijenata u odnosu na zdravu kontrolu, bez značajne razlike u broju klasičnih CD14⁺CD16⁻ monocita između ove dve grupe.²⁵³

Ove nalaze je teško objasniti time da je porast MDSC u sepsi, a pogotovo M-MDSC, isključivo posledica urgentne mijelopoeze praćene oslobađanjem nezrelih mijeloidnih ćelija iz kostne srži u krv. Predloženo je da bi do ekspanzije MDSC moglo doći i reprogramiranjem ili aktiviranjem postojećih monocita i granulocita, jer je odnos zrelih ćelija prema MDSC veoma dinamičan i plastičan.^{173,268,273,277,294–297} Oba mehanizma mogla bi funkcionisati istovremeno jer nisu uzajamno isključiva. Treća mogućnost za nastanak MDSC bila bi ekstramedularna hematopoeza, međutim ovaj mehanizam nastanka MDSC kod ljudi u sepsi nije ispitan.^{173,268,273} Predložena je i mogućnost postojanja supresivne granulopoeze pod uticajem G-CSF,²⁶⁸ ali ovaj mehanizam nastanka MDSC kod ljudi je trenutno u domenu spekulacija.

U skladu s ovim, analizirali smo odnos monocita prema M-MDSC i neutrofila prema PMN-MDSC za svakog pojedinačnog pacijenta i u obe vremenske tačke (1. i 5. dan). Kod svih pacijenata sa sepsom u našoj studiji došlo je do smanjenja odnosa Ne/PMN-MDSC i porasta odnosa Mo/M-MDSC u periodu od 1. do 5. dana. Međutim, stratifikacija pacijenata prema tipu bakterijske kulture pokazala je značajne razlike. Pacijenti sa Gram-pozitivnom sepsom pokazali su značajno smanjenje odnosa Ne/PMN-MDSC i manje izraženo smanjenje odnosa Mo/M-MDSC od 1. do 5. dana. Iako je kod pacijenata sa Gram-negativnom sepsom takođe došlo do značajnog smanjenja odnosa Ne/PMN-MDSC, broj njihovih monocita je porastao u poređenju sa detektovanim brojem M-MDSC. Suprotno obema navedenim grupama, kod pacijenata sa polimikrobnom hemokulturom 5. dana je došlo do porasta i Ne/PMN-MDSC i Mo/M-MDSC odnosa. Sve ovo ukazuje na to da su tipovi bakterijskih prouzrokovaca u sepsi

značajno povezani sa određenim profilom MDSC, dinamikom njihove promene i njihovim odnosom prema odgovarajućim zrelim ćelijama.

Odnosi Ne/PMN-MDSC i Mo/M-MDSC niži od graničnih vrednosti su umereno dobri prediktori Gram-pozitivne sepse i 1. i 5. dana kod kritično obolelih pacijenata sa sekundarnom sepsom, a najveću prediktivnu vrednost ima odnos Mo/M-MDSC 5. dana (AUC ROC 0,793). Takođe, odnosi Ne/PMN-MDSC i Mo/M-MDSC 5. dana, viši od graničnih vrednosti, umereno su dobri prediktori polimikrobne sepse. I konačno, u našoj studiji je smanjenje odnosa Ne/PMN-MDSC ispod graničnih vrednosti bilo udruženo sa lošim ishodom i 1. i 5. dana kod kritično obolelih pacijenata sa sekundarnom sepsom.

Bergenfelzova i saradnici su pokazali da kod obolelih od karcinoma dojke sistemske M-MDSC nastaju iz monocita i da njihov broj korelira sa progresijom bolesti.²⁹⁸ Dodatno, opservirali su značajan porast monocita sa izmenjenim fenotipom i u kontrolnoj grupi pacijenata sa sepsom. Ovi monociti su pokazivali CD14⁺HLA-DR^{low/-} fenotip, koji je specifičan za M-MDSC, a koji je već dokumentovan u nekoliko ranijih studija sa septičnim pacijentima tokom kompenzatornog antiinflamatornog odgovora (CARS).^{295,296,299,300} Profilisanje genske ekspresije pružilo je dodatne dokaze da su ove populacije monocita (uključujući i M-MDSC) bile slično imunosupresivne i u karcinomu dojke i kod pacijenata sa sepsom (posebno u antiinflamatornoj fazi), u odnosu na nalaze u grupi sa tuberkulozom (hroničnoj lokalnoj infekciji) i zdravoj kontrolnoj grupi.²⁹⁸ Monociti iz grupe sa ranim karcinomom dojke inhibirali su proliferaciju T ćelija i proizvodili su slične nivoe IL-1 β , IL-6, IL-8 i TNF kao i monociti iz grupe sa metastazama, ukazujući na to da do promene u funkciji monocita dolazi rano tokom bolesti, čak i pre promene površinskog fenotipa. Dalje, pacijenti sa sepsom imali su značajno više ukupnih CD14⁺ ćelija, klasičnih CD14⁺⁺CD16⁻ monocita, CD14⁺⁺CD16⁺ intermedijarnih monocita i CD14⁺CD16⁺⁺ neklasičnih monocita u odnosu na pacijente sa ranim ili metastatskim karcinomom dojke i zdravu kontrolnu grupu, sa povećanim odnosom CD16⁺/CD16⁻ monocita. Autori su zaključili da su imunosupresivni monociti indukovani rano tokom rasta i progresije tumora, odnosno da tumor utiče na monocite mnogo pre njihove ekstrasvazacije u tumorsko tkivo i sticanja površinskog fenotipa tipičnog za M-MDSC.²⁹⁸ Na osnovu opservacije sličnih fenotipskih i molekularnih nalaza kod pacijenata sa karcinomom dojke i sepsom, pretpostavili smo da bi progresija sepse mogla da dovede do reprogramiranja monocita i granulocita na isti način.

Proces reprogramiranja nije redak događaj i mogao bi da ima fiziološke implikacije. Zhao i saradnici su pokazali da ljudske ekstravilozne trofoblastne ćelije efikasno menjaju program diferencijacije u monocitima, indukujući njihovo sazrevanje u pravcu tolerogenih dendritskih ćelija (DC). U prisustvu ovih trofoblastima indukovanih DC monocitnog porekla proliferacija CD4⁺ T-ćelija bila je smanjena, dok je procenat Foxp3⁺CD25⁺CD4⁺ T_{reg} bio povećan.³⁰¹ Sama sepsa indukuje brojne promene u funkcijama monocita. Shalova i saradnici su pokazali da u monocitima pacijenata sa Gram-negativnom sepsom dolazi do značajne ushodne regulacije gena povezanih s inflamacijom (IL-1β, IL-6, CCL3, CCL5), ali takođe i gena povezanih sa remodelovanjem tkiva i zarastanjem rana (VEGF, MMP). Zanimljivo je da su septični monociti imali i veću ekspresiju antiinflamatornog IL-10 istovremeno sa povećanom ekspresijom proinflamatornih citokina i hemokina. Međutim, transkriptomski odgovor septičnih monocita na endotoksin *ex vivo* bio je izmenjen. Došlo je do nishodne regulacije proinflamatornih gena i pojedinih gena značajnih za prezentaciju antigena. Međutim, geni značajni za fagocitozu i antimikrobnu aktivnost bili su i dalje inducibilni ili slabije suprimirani. Autori su pronašli da je HIF-1α bio specifično ushodno regulisan u monocitima septičnih pacijenata, ali ne i u kontrolnim monocitima. Pokazali su da HIF-1α, preko indukcije ekspresije gena IRAK3, negativno reguliše aktivaciju monocita putem TLR, dovodeći do smanjenog proinflamatornog odgovora septičnih monocita na endotoksin, što je poznato kao endotoksinska tolerancija. Takođe, delujući direktno tj. nezavisno od gena IRAK3, aktivacija HIF-1α pojačava antimikrobnu i fagocitnu funkciju septičnih monocita, kao i njihovu sposobnost reparacije tkiva.³⁰² Iako ova studija nije ispitivala MDSC, autori su zaključili da je HIF-1a važan regulator reprogramiranja monocita u pravcu imunosupresivnog fenotipa kod pacijenata sa sepsom.

5.5 Imunomodulatorna terapija sepse

Aktuelna definicija sepse naglašava da je u ovom životno ugrožavajućem sindromu 'poremećena regulacija odgovora domaćina na infekciju'.³ Ni posle tri decenije od prvih kliničkih ispitivanja potencijalnih imunomodulatornih terapija, nemamo nijednu novu registrovanu adjuktivnu terapiju ili meru kojom bismo uticali na ponovno uspostavljanje imunske homeostaze kod septičnih pacijenata.³⁰³ Arsenal kojim trenutno raspolažemo u borbi protiv sepse (antibiotici, kontrola izvora infekcije, mere podrške organima i sistemima organa) omogućava da većina pacijenata danas preživi ranu hiperinflamatornu fazu sepse.

Međutim, značajan deo preživelih pacijenata ima produžen tok bolesti sa komplikacijama koje ukazuju na postojanje perzistentne inflamacije, imunosupresije i katabolizma (PICS).²⁵⁴ Drugačije rečeno, jedan deo pacijenata bi mogao imati koristi od antiinflamatorne terapije, a drugi od imunostimulatorne. Izazov leži u identifikaciji pravih kandidata za odgovarajuću imunomodulatornu terapiju, s obzirom na to da danas nemamo pouzdane markere koji će precizno ukazati na fazu sepse u kojoj se pacijenti nalaze.^{303,304} Trenutno su, kao markeri inflamacije, u široj kliničkoj upotrebi C-reaktivni protein i prokalcitonin, a važan pokazatelj sepsom indukovane imunosupresije je limfopenija. Međutim, nijedan od ovih markera nije pouzdan u demarkiranju hiperinflamatorne od imunosupresivne faze sepse. Među markerima koji se trenutno ispituju, najviše obećava ekspresija HLA-DR na cirkulišućim monocitima, jer niska ekspresija HLA-DR ukazuje na imunoparalizu.^{254,305}

Prema dostupnim podacima, u toku je više kliničkih studija koje ispituju nove imunoadjuvantne terapije.³⁰³⁻³⁰⁵ Uskoro se očekuju rezultati ispitivanja GM-CSF, IL-7 i anti-PD-L1. Faktor rasta GM-CSF je u fazi 3 kliničkih ispitivanja na pacijentima sa teškom sepsom i septičnim šokom koji imaju imunosupresiju udruženu sa sepsom (NCT02361528). Biomarker koji se koristi za vođenje terapije je HLA-DR sa vrednostima ispod 8000 antitela/ćeliji. Mera ishoda je najmanje jedna infekcija stečena u JIL tokom 28 dana ili pri otpustu. Završena je i faza 2 kliničkog ispitivanja IL-7 na pacijentima sa sepsom (NCT02640807). Biomarker je limfopenija (apsolutni broj limfocita ≤ 900 ćelija/mm³), a primarna mera ishoda je normalizacija broja limfocita. I konačno, završena je i 1. faza kliničkog ispitivanja anti-PD-L1 na pacijentima sa teškom sepsom i septičnim šokom (NCT02960854), čiji je cilj da se ispituju bezbednost, tolerabilnost i farmakokinetika ovog inhibitora imunskih kontrolnih tačaka.^{304,305}

Nadamo se da ćemo u skoroj budućnosti imati i preciznije imunomarkere i efikasnu imunoadjuvantnu terapiju barem za neke subpopulacije pacijenta.

6. ZAKLJUČAK

Još uvek nije u potpunosti rasvetljena uloga MDSC u različitim kliničkim kontekstima, naročito u sepsi gde su istovremeno pokrenuti i proinflamatorni i antiinflamatorni odgovori. U ovoj studiji pokazujemo da se subpopulacije koje korespondiraju sa MDSC mogu fenotipski identifikovati u uzorcima pune krvi septičnih pacijenata, te da su njihova povećana učestalost i apsolutni broj povezani sa lošim ishodom. Što se tiče relativne kinetike, pronašli smo da je i kod preživelih i kod umrlih trajanje sepse od 1. do 5. dana bilo praćeno porastom vrednosti obe ispitivane subpopulacije MDSC. Pronašli smo da Gram-pozitivni infektivni agensi snažno indukuju nastanak MDSC u sepsi. Takođe, u našoj studiji osnovni uzroci sekundarne sepse nisu uticali na akumulaciju MDSC. Iako su MDSC korelirale sa lošim ishodom, ne mogu se izvući čvrsti zaključci o kauzalnoj povezanosti između ekspanzije i akumulacije MDSC, s jedne strane, i lošeg ishoda, s druge. Ekspanzija MDSC mogla bi biti posledica dejstva snažnog insulta koji je istovremeno sa pokretanjem hiperinflamatornog odgovora pokrenuo i snažan antiinflamatorni odgovor, što je pokušaj imunskog sistema da uspostavi homeostazu. Neophodne su multicentrične studije sa većim brojem pacijenata za dalje istraživanje ovih intrigantnih ćelija.

7. LITERATURA

1. Vincent J-L, Marshall JC, Namendys-Silva SA, et al. Assessment of the worldwide burden of critical illness: the intensive care over nations (ICON) audit. *Lancet Respir Med.* 2014;2(5):380-386. doi:10.1016/S2213-2600(14)70061-X
2. Torio CM, Moore BJ. *National Inpatient Hospital Costs: The Most Expensive Conditions by Payer, 2013: Statistical Brief #204.* Vol 204.; 2016. doi:10.1377/hlthaff.2015.1194.3
3. Singer M, Deutschman CS, Seymour CW, et al. The Third International Consensus Definitions for Sepsis and Septic Shock (Sepsis-3). *JAMA.* 2016;315(8):801-810. doi:10.1001/jama.2016.0287
4. Mira JC, Gentile LF, Mathias BJ, et al. Sepsis Pathophysiology, Chronic Critical Illness, and Persistent Inflammation-Immunosuppression and Catabolism Syndrome. *Crit Care Med.* 2017;45(2):253-262. doi:10.1097/CCM.0000000000002074
5. Bone RC, Balk RA, Cerra FB, et al. American College of Chest Physicians/Society of Critical Care Medicine Consensus Conference: definitions for sepsis and organ failure and guidelines for the use of innovative therapies in sepsis. *Crit Care Med.* 1992;20(6):864-874. doi:10.1378/chest.101.6.1644
6. Levy MM, Fink MP, Marshall JC, et al. 2001 SCCM/ESICM/ACCP/ATS/SIS International Sepsis Definitions Conference. *Crit Care Med.* 2003;31(4):1250-1256. doi:10.1097/01.CCM.0000050454.01978.3B
7. Vincent J-L. Dear SIRS, I'm sorry to say that I don't like you. *Crit Care Med.* 1997;25(2):372-374. doi:10.1097/00003246-199702000-00029
8. Abraham E, Matthay M a, Dinarello C a, 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):232-235. doi:10.1097/00003246-200001000-00039
9. Poeze M, Ramsay G, Gerlach H, Rubulotta F, Levy M. An international sepsis survey: a study of doctors' knowledge and perception about sepsis. *Crit Care.* 2004;8(6):R409-13. doi:10.1186/cc2959
10. 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. doi:10.1097/CCM.0b013e31827e83af
11. Slade E, Tamber PS, Vincent J-L. The Surviving Sepsis Campaign: raising awareness to reduce mortality. *Crit Care.* 2003;7(1):1-2. doi:10.1186/cc1876

12. Dellinger RP, Carlet JM, Masur H, et al. Surviving Sepsis Campaign guidelines for management of severe sepsis and septic shock. *Intensive Care Med.* 2004;30(4):536-555. doi:10.1007/s00134-004-2210-z
13. Dellinger RP, Levy MM, Carlet JM, et al. Surviving Sepsis Campaign: international guidelines for management of severe sepsis and septic shock: 2008. *Intensive Care Med.* 2008;34(1):17-60. doi:10.1007/s00134-007-0934-2
14. Rhodes A, Evans LE, Alhazzani W, et al. Surviving Sepsis Campaign: International Guidelines for Management of Sepsis and Septic Shock: 2016. *Crit Care Med.* 2017;45(3):486-552. doi:10.1097/CCM.0000000000002255
15. Vincent J-L, Opal SM, Marshall JC, Tracey KJ. Sepsis definitions: time for change. *Lancet (London, England).* 2013;381(9868):774-775. doi:10.1016/S0140-6736(12)61815-7
16. Hotchkiss RS, Monneret G, Payen D. Sepsis-induced immunosuppression: from cellular dysfunctions to immunotherapy. *Nat Rev Immunol.* 2013;13(12):862-874. doi:10.1038/nri3552
17. Kaukonen K-M, Bailey M, Pilcher D, Cooper DJ, Bellomo R. Systemic Inflammatory Response Syndrome Criteria in Defining Severe Sepsis. *N Engl J Med.* 2015;372(17):1629-1638. doi:10.1056/NEJMoa1415236
18. Seymour CW, Liu VX, Iwashyna TJ, et al. Assessment of Clinical Criteria for Sepsis: For the Third International Consensus Definitions for Sepsis and Septic Shock (Sepsis-3). *JAMA.* 2016;315(8):762-774. doi:10.1001/jama.2016.0288
19. Fleischmann C, Scherag A, Adhikari NKJ, et al. Assessment of Global Incidence and Mortality of Hospital-treated Sepsis. Current Estimates and Limitations. *Am J Respir Crit Care Med.* 2016;193(3):259-272. doi:10.1164/rccm.201504-0781OC
20. Kempker JA, Martin GS. The Changing Epidemiology and Definitions of Sepsis. *Clin Chest Med.* 2016;37(2):165-179. doi:10.1016/j.ccm.2016.01.002
21. Stoller J, Halpin L, Weis M, et al. Epidemiology of severe sepsis: 2008-2012. *J Crit Care.* 2016;31(1):58-62. doi:10.1016/j.jcrc.2015.09.034
22. Vincent J-L, Lefrant J-Y, Kotfis K, et al. Comparison of European ICU patients in 2012 (ICON) versus 2002 (SOAP). *Intensive Care Med.* 2018;44(3):337-344. doi:10.1007/s00134-017-5043-2
23. Stevenson EK, Rubenstein AR, Radin GT, Wiener RS, Walkey AJ. Two decades of mortality trends among patients with severe sepsis: a comparative meta-analysis. *Crit Care Med.* 2014;42(3):625-631. doi:10.1097/CCM.0000000000000026
24. Zimmerman JE, Kramer AA, Knaus WA. Changes in hospital mortality for United States intensive care unit admissions from 1988 to 2012. *Crit Care.* 2013;17(2):R81. doi:10.1186/cc12695

25. Martin GS, Mannino DM, Moss M. The effect of age on the development and outcome of adult sepsis. *Crit Care Med.* 2006;34(1):15-21. doi:10.1097/01.CCM.0000194535.82812.BA
26. Girard TD, Opal SM, Ely EW. Insights into Severe Sepsis in Older Patients: From Epidemiology to Evidence-Based Management. *Clin Infect Dis.* 2005;40(5):719-727. doi:10.1086/427876
27. Gruver AL, Hudson LL, Sempowski GD. Immunosenescence of ageing. *J Pathol.* 2007;211(2):144-156. doi:10.1002/path.2104
28. Mayr FB, Yende S, Angus DC. Epidemiology of severe sepsis. *Virulence.* 2014;5(1):4-11. doi:10.4161/viru.27372
29. Vincent J, Rello J, Marshall J, et al. International study of the prevalence and outcomes of infection in intensive care units. *JAMA.* 2009;302(21):2323-2329. doi:10.1001/jama.2009.1754
30. Vincent JL, Sakr Y, Sprung CL, et al. Sepsis in European intensive care units: Results of the SOAP study. *Crit Care Med.* 2006;34(2):344-353. doi:10.1097/01.CCM.0000194725.48928.3A
31. Phua J, Ngerng W, See K, et al. Characteristics and outcomes of culture-negative versus culture-positive severe sepsis. *Crit Care.* 2013;17(5):R202. doi:10.1186/cc12896
32. Gupta S, Sakhuja A, Kumar G, McGrath E, Nanchal RS, Kashani KB. Culture-Negative Severe Sepsis: Nationwide Trends and Outcomes. *Chest.* 2016;150(6):1251-1259. doi:10.1016/j.chest.2016.08.1460
33. Takeuchi O, Akira S. Pattern Recognition Receptors and Inflammation. *Cell.* 2010;140(6):805-820. doi:10.1016/j.cell.2010.01.022
34. Matzinger P. The danger model: A renewed sense of self. *Science (80-).* 2002;296(5566):301-305. doi:10.1126/science.1071059
35. Bianchi ME. DAMPs, PAMPs and alarmins: all we need to know about danger. *J Leukoc Biol.* 2006;81(1):1-5. doi:10.1189/jlb.0306164
36. Abbas AK, Lichtman AH, Pillai S. *Osnovna Imunologija: Funkcionisanje I Poremećaji Imunskog Sistema.* 4. izdanje. Beograd: Data Status; 2013.
37. Delano MJ, Ward PA. The immune system's role in sepsis progression, resolution, and long-term outcome. *Immunol Rev.* 2016;274(1):330-353. doi:10.1111/imr.12499
38. Xiao W, Mindrinos MN, Seok J, et al. A genomic storm in critically injured humans. *J Exp Med.* 2011;208(13):2581-2590. doi:10.1084/jem.20111354
39. Bone RC, Grodzin CJ, Balk RA. Sepsis: a new hypothesis for pathogenesis of the disease process. *Chest.* 1997;112(1):235-243. doi:10.1378/chest.112.1.235

40. Fullerton JN, Gilroy DW. Resolution of inflammation: A new therapeutic frontier. *Nat Rev Drug Discov.* 2016;15(8):551-567. doi:10.1038/nrd.2016.39
41. Epstein FH, Dinarello CA. Interleukin-1 and the Pathogenesis of the Acute-Phase Response. *N Engl J Med.* 1984;311(22):1413-1418. doi:10.1056/NEJM198411293112205
42. Auron PE, Webb AC, Rosenwasser LJ, et al. Nucleotide sequence of human monocyte interleukin 1 precursor cDNA. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1984;81(24):7907-7911. doi:10.1073/pnas.81.24.7907
43. March CJ, Mosley B, Larsen A, et al. Cloning, sequence and expression of two distinct human interleukin-1 complementary DNAs. *Nature.* 1985;315(6021):641-647. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2989698?dopt=abstract%5Cnpapers3://publication/uuid/EBD6566D-7971-46E9-9C9A-9C9A7C2C824C>.
44. Beutler B, Milsark IW, Cerami AC. Passive immunization against cachectin/tumor necrosis factor protects mice from lethal effect of endotoxin. *Science.* 1985;229(4716):869-871. doi:10.1126/SCIENCE.3895437
45. Okusawa S, Gelfand JA, Ikejima T, Connolly RJ, Dinarello CA. Interleukin 1 induces a shock-like state in rabbits. Synergism with tumor necrosis factor and the effect of cyclooxygenase inhibition. *J Clin Invest.* 1988;81(4):1162-1172. doi:10.1172/JCI113431
46. Michie HR, Manogue KR, Spriggs DR, et al. Detection of circulating tumor necrosis factor after endotoxin administration. *N Engl J Med.* 1988;318(23):1481-1486. doi:10.1056/NEJM198806093182301
47. Hesse DG, Tracey KJ, Fong Y, et al. Cytokine appearance in human endotoxemia and primate bacteremia. *Surg Gynecol Obstet.* 1988;166(2):147-153. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3122336>.
48. Cannon JG, Tompkins RG, Gelfand JA, et al. Circulating interleukin-1 and tumor necrosis factor in septic shock and experimental endotoxin fever. *J Infect Dis.* 1990;161(1):79-84. doi:10.1093/infdis/161.1.79
49. Bauer J, Lengyel G, Bauer TM, Acs G, Gerok W. Regulation of interleukin-6 receptor expression in human monocytes and hepatocytes. *FEBS Lett.* 1989;249(1):27-30. doi:10.1016/0014-5793(89)80008-0
50. Aikawa N. [Cytokine storm in the pathogenesis of multiple organ dysfunction syndrome associated with surgical insults]. *Nihon Geka Gakkai Zasshi.* 1996;97(9):771-777. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8940690>.
51. Van Zee KJ, Kohno T, Fischer E, Rock CS, Moldawer LL, Lowry SF. Tumor necrosis factor soluble receptors circulate during experimental and clinical inflammation and can protect against excessive tumor necrosis factor alpha in vitro and in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1992;89(11):4845-4849. doi:10.1073/pnas.89.11.4845

52. Ertel W, Scholl FA, Gallati H, Bonaccio M, Schildberg FW, Trentz O. Increased release of soluble tumor necrosis factor receptors into blood during clinical sepsis. *Arch Surg*. 1994;129(12):1330-6-7. doi:10.1001/archsurg.1994.01420360120017
53. Marchant A, Goldman M, Devière J, Byl B, Vincent JL, Groote D De. Interleukin-10 production during septicaemia. *Lancet*. 1994;343(8899):707-708. doi:10.1016/S0140-6736(94)91584-9
54. Gårdlund B, Sjölin J, Nilsson A, Roll M, Wickerts CJ, Wretling B. Plasma levels of cytokines in primary septic shock in humans: correlation with disease severity. *J Infect Dis*. 1995;172(1):296-301. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7797935>.
55. Dunn DL, Ferguson RM. Immunotherapy of gram-negative bacterial sepsis: enhanced survival in a guinea pig model by use of rabbit antiserum to *Escherichia coli* J5. *Surgery*. 1982;92(2):212-219. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7048594>.
56. Feeley TW, Minty BD, Scudder CM, Jones JG, Royston D, Teng NN. The effect of human antiendotoxin monoclonal antibodies on endotoxin-induced lung injury in the rat. *Am Rev Respir Dis*. 1987;135(3):665-670. doi:10.1164/arrd.1987.135.3.665
57. Dunn DL, Bogard WC, Cerra FB. Efficacy of type-specific and cross-reactive murine monoclonal antibodies directed against endotoxin during experimental sepsis. *Surgery*. 1985;98(2):283-290. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3895540>.
58. Tracey KJ, Fong Y, Hesse DG, et al. Anti-cachectin/TNF monoclonal antibodies prevent septic shock during lethal bacteraemia. *Nature*. 1987;330(6149):662-664. doi:10.1038/330662a0
59. Alexander HR, Doherty GM, Buresh CM, Venzon DJ, Norton JA. A recombinant human receptor antagonist to interleukin 1 improves survival after lethal endotoxemia in mice. *J Exp Med*. 1991;173(4):1029-1032. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1826127> <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC2190820>.
60. Wakabayashi G, Gelfand JA, Burke JF, Thompson RC, Dinarello CA. A specific receptor antagonist for interleukin 1 prevents *Escherichia coli*-induced shock in rabbits. *FASEB J*. 1991;5(3):338-343. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1825816>.
61. Fischer E, Marano MA, Van Zee KJ, et al. Interleukin-1 receptor blockade improves survival and hemodynamic performance in *Escherichia coli* septic shock, but fails to alter host responses to sublethal endotoxemia. *J Clin Invest*. 1992;89(5):1551-1557. doi:10.1172/JCI115748
62. Baumgartner JD, Glauser MP, McCutchan JA, et al. Prevention of gram-negative shock and death in surgical patients by antibody to endotoxin core glycolipid. *Lancet (London, England)*. 1985;2(8446):59-63. doi:10.1016/S0140-6736(85)90176-X
63. Greenman RL, Schein RM, Martin MA, et al. A controlled clinical trial of E5 murine monoclonal IgM antibody to endotoxin in the treatment of gram-negative sepsis. The XOMA Sepsis Study Group. *JAMA*. 1991;266(8):1097-1102.

- doi:10.1001/jama.1991.03470080067031
64. Ziegler EJ, Fisher CJ, Sprung CL, et al. Treatment of gram-negative bacteremia and septic shock with HA-1A human monoclonal antibody against endotoxin. A randomized, double-blind, placebo-controlled trial. The HA-1A Sepsis Study Group. *N Engl J Med.* 1991;324(7):429-436. doi:10.1056/NEJM199102143240701
 65. Greenberg RN, Wilson KM, Kunz AY, Wedel NI, Gorelick KJ. Observations using antiendotoxin antibody (E5) as adjuvant therapy in humans with suspected, serious, gram-negative sepsis. *Crit Care Med.* 1992;20(6):730-735. doi:10.1097/00003246-199206000-00005
 66. Fisher CJ, Opal SM, Dhainaut JF, et al. Influence of an anti-tumor necrosis factor monoclonal antibody on cytokine levels in patients with sepsis. The CB0006 Sepsis Syndrome Study Group. *Crit Care Med.* 1993;21(3):318-327. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8440099>.
 67. Calandra T, Glauser MP, Schellekens J, Verhoef J. Treatment of Gram-Negative Septic Shock with Human IgG Antibody to Escherichia coli J5: A Prospective, Double-Blind, Randomized Trial. *J Infect Dis.* 1988;158(2):312-319. doi:10.1093/infdis/158.2.312
 68. McCloskey R V, Straube RC, Sanders C, Smith SM, Smith CR. Treatment of septic shock with human monoclonal antibody HA-1A. A randomized, double-blind, placebo-controlled trial. CHESSE Trial Study Group. *Ann Intern Med.* 1994;121(1):1-5. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=8198341.
 69. Willatts SM, Radford S, Leitermann M. Effect of the antiendotoxin agent, taurolidine, in the treatment of sepsis syndrome: a placebo-controlled, double-blind trial. *Crit Care Med.* 1995;23(6):1033-1039. doi:10.1097/00003246-199506000-00007
 70. Cohen J, Carlet J. INTERSEPT: an international, multicenter, placebo-controlled trial of monoclonal antibody to human tumor necrosis factor-alpha in patients with sepsis. International Sepsis Trial Study Group. *Crit Care Med.* 1996;24(9):1431-1440. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8797612>.
 71. Opal SM, Fisher CJ, Dhainaut JF, et al. Confirmatory interleukin-1 receptor antagonist trial in severe sepsis: a phase III, randomized, double-blind, placebo-controlled, multicenter trial. The Interleukin-1 Receptor Antagonist Sepsis Investigator Group. *Crit Care Med.* 1997;25(7):1115-1124. doi:10.1097/00003246-199707000-00010
 72. Abraham E, Anzueto A, Gutierrez G, et al. Double-blind randomised controlled trial of monoclonal antibody to human tumour necrosis factor in treatment of septic shock. NORASEPT II Study Group. *Lancet (London, England).* 1998;351(9107):929-933. doi:10.1016/S0140-6736(05)60602-2
 73. Angus DC, Birmingham MC, Balk RA, et al. E5 murine monoclonal antiendotoxin antibody in gram-negative sepsis: a randomized controlled trial. E5 Study Investigators. *JAMA.* 2000;283(13):1723-1730.

- <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10755499><http://jama.jamanetwork.com/data/Journals/JAMA/4730/JCE90038.pdf>.
74. Reinhart K, Menges T, Gardlund B, et al. Randomized, placebo-controlled trial of the anti-tumor necrosis factor antibody fragment afelimomab in hyperinflammatory response during severe sepsis: The RAMSES Study. *Crit Care Med.* 2001;29(4):765-769. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11373466>.
 75. Abraham E, Laterre PF, Garbino J, et al. Lenercept (p55 tumor necrosis factor receptor fusion protein) in severe sepsis and early septic shock: a randomized, double-blind, placebo-controlled, multicenter phase III trial with 1,342 patients. *Crit Care Med.* 2001;29(3):503-510. doi:10.1097/00003246-200103000-00006
 76. Albertson TE, Panacek EA, MacArthur RD, et al. Multicenter evaluation of a human monoclonal antibody to Enterobacteriaceae common antigen in patients with Gram-negative sepsis. *Crit Care Med.* 2003;31(2):419-427. doi:10.1097/01.CCM.0000045564.51812.3F
 77. Fisher CJ, Agosti JM, Opal SM, et al. Treatment of septic shock with the tumor necrosis factor receptor:Fc fusion protein. The Soluble TNF Receptor Sepsis Study Group. *N Engl J Med.* 1996;334(26):1697-1702. doi:10.1056/NEJM199606273342603
 78. Natanson C, Hoffman WD, Suffredini AF, Eichacker PQ, Danner RL. Selected treatment strategies for septic shock based on proposed mechanisms of pathogenesis. *Ann Intern Med.* 1994;120(9):771-783. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8147551>.
 79. Michie HR. The value of animal models in the development of new drugs for the treatment of the sepsis syndrome. *J Antimicrob Chemother.* 1998;41 Suppl A:47-49. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9511086>.
 80. Chaudry IH. Sepsis: Lessons learned in the last century and future directions. In: *Archives of Surgery.* Vol 134. ; 1999:922-929. doi:10.1001/archsurg.134.9.922
 81. Opal SM, Cross AS. Clinical trials for severe sepsis. Past failures, and future hopes. *Infect Dis Clin North Am.* 1999;13(2):285-97, vii. doi:10.1016/S0891-5520(05)70075-1
 82. Munoz C, Carlet J, Fitting C, Misset B, Blériot JP, Cavaillon JM. Dysregulation of in vitro cytokine production by monocytes during sepsis. *J Clin Invest.* 1991;88(5):1747-1754. doi:10.1172/JCI115493
 83. Ertel W, Kremer JP, Kenney J, et al. Downregulation of proinflammatory cytokine release in whole blood from septic patients. *Blood.* 1995;85(5):1341-1347. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7858264>.
 84. 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(3):260-268. doi:10.1016/S1473-3099(13)70001-X

85. van Dissel JT, van Langevelde P, Westendorp RG, Kwappenberg K, Frölich M. Anti-inflammatory cytokine profile and mortality in febrile patients. *Lancet*. 1998;351(9107):950-953. doi:10.1016/S0140-6736(05)60606-X
86. Gogos CA, Drosou E, Bassaris HP, Skoutelis A. Pro- versus anti-inflammatory cytokine profile in patients with severe sepsis: a marker for prognosis and future therapeutic options. *J Infect Dis*. 2000;181(1):176-180. doi:10.1086/315214
87. Kellum JA, Kong L, Fink MP, et al. Understanding the inflammatory cytokine response in pneumonia and sepsis: results of the Genetic and Inflammatory Markers of Sepsis (GenIMS) Study. *Arch Intern Med*. 2007;167(15):1655-1663. doi:10.1001/archinte.167.15.1655
88. Tamayo E, Fernández A, Almansa R, et al. Pro- and anti-inflammatory responses are regulated simultaneously from the first moments of septic shock. *Eur Cytokine Netw*. 2011;22(2):82-87. doi:10.1684/ecn.2011.0281
89. Novotny AR, Reim D, Assfalg V, et al. Mixed antagonist response and sepsis severity-dependent dysbalance of pro- and anti-inflammatory responses at the onset of postoperative sepsis. *Immunobiology*. 2012;217(6):616-621. doi:10.1016/j.imbio.2011.10.019
90. Alberti C, Brun-Buisson C, Burchardi H, et al. Epidemiology of sepsis and infection in ICU patients from an international multicentre cohort study. *Intensive Care Med*. 2002;28(2):108-121. doi:10.1007/s00134-001-1143-z
91. Hotchkiss RS, Karl IE. The pathophysiology and treatment of sepsis. *N Engl J Med*. 2003;348(2):138-150. doi:10.1056/NEJMra021333
92. Hamers L, Kox M, Pickkers P. Sepsis-induced immunoparalysis: Mechanisms, markers, and treatment options. *Minerva Anesthesiol*. 2015;81(4):426-439.
93. Meakins JL, Pietsch JB, Bubenick O, et al. Delayed hypersensitivity: indicator of acquired failure of host defenses in sepsis and trauma. *Ann Surg*. 1977;186(3):241-250. doi:10.1097/00000658-197709000-00002
94. Torgersen C, Moser P, Luckner G, et al. Macroscopic postmortem findings in 235 surgical intensive care patients with sepsis. *Anesth Analg*. 2009;108(6):1841-1847. doi:10.1213/ane.0b013e318195e11d
95. Lucas S. The autopsy pathology of sepsis-related death. *Curr Diagnostic Pathol*. 2007;13(5):375-388. doi:10.1016/j.cdip.2007.06.001
96. Takasu O, Gaut JP, Watanabe E, et al. Mechanisms of cardiac and renal dysfunction in patients dying of sepsis. *Am J Respir Crit Care Med*. 2013;187(5):509-517. doi:10.1164/rccm.201211-1983OC
97. Brealey D, Brand M, Hargreaves I, et al. Association between mitochondrial dysfunction and severity and outcome of septic shock. *Lancet*. 2002;360(9328):219-223. doi:10.1016/S0140-6736(02)09459-X

98. Rudiger A, Singer M. Mechanisms of sepsis-induced cardiac dysfunction. *Crit Care Med.* 2007;35(6):1599-1608. doi:10.1097/01.CCM.0000266683.64081.02
99. Singer M. The role of mitochondrial dysfunction in sepsis-induced multi-organ failure. *Virulence.* 2014;5(1):66-72. doi:10.4161/viru.26907
100. Sun A, Netzer G, Small DS, et al. Association between Index Hospitalization and Hospital Readmission in Sepsis Survivors. *Crit Care Med.* 2016;44(3):478-487. doi:10.1097/CCM.0000000000001464
101. van Vught LA, Klein Klouwenberg PMC, Spitoni C, et al. Incidence, Risk Factors, and Attributable Mortality of Secondary Infections in the Intensive Care Unit After Admission for Sepsis. *JAMA.* 2016;315(14):1469-1479. doi:10.1001/jama.2016.2691
102. Walton AH, Muenzer JT, Rasche D, et al. Reactivation of multiple viruses in patients with sepsis. *PLoS One.* 2014;9(6). doi:10.1371/journal.pone.0098819
103. Weighardt H, Heidecke CD, Emmanuilidis K, et al. Sepsis after major visceral surgery is associated with sustained and interferon-gamma-resistant defects of monocyte cytokine production. *Surgery.* 2000;127(3):309-315. doi:10.1067/msy.2000.104118
104. Lin RY, Astiz ME, Saxon JC, Saha DC, Rackow EC. Relationships between plasma cytokine concentrations and leukocyte functional antigen expression in patients with sepsis. *Crit Care Med.* 1994;22(10):1595-1602. doi:7924371
105. Astiz M, Saha D, Lustbader D, Lin R, Rackow E. Monocyte response to bacterial toxins, expression of cell surface receptors, and release of anti-inflammatory cytokines during sepsis. *J Lab Clin Med.* 1996;128(6):594-600. doi:10.1016/S0022-2143(96)90132-8
106. Landelle C, Lepape A, Voirin N, et al. Low monocyte human leukocyte antigen-DR is independently associated with nosocomial infections after septic shock. *Intensive Care Med.* 2010;36(11):1859-1866. doi:10.1007/s00134-010-1962-x
107. Monneret G, Finck ME, Venet F, et al. The anti-inflammatory response dominates after septic shock: Association of low monocyte HLA-DR expression and high interleukin-10 concentration. *Immunol Lett.* 2004;95(2):193-198. doi:10.1016/j.imlet.2004.07.009
108. Monneret G, Lepape A, Voirin N, et al. Persisting low monocyte human leukocyte antigen-DR expression predicts mortality in septic shock. *Intensive Care Med.* 2006;32(8):1175-1183. doi:10.1007/s00134-006-0204-8
109. Tschaikowsky K, Hedwig-Geissing M, Schiele A, Bremer F, Schywalsky M, Schüttler J. Coincidence of pro- and anti-inflammatory responses in the early phase of severe sepsis: Longitudinal study of mononuclear histocompatibility leukocyte antigen-DR expression, procalcitonin, C-reactive protein, and changes in T-cell subsets in septic and p. *Crit Care Med.* 2002;30(5):1015-1023. doi:10.1097/00003246-200205000-00010

110. Döcke WD, Randow F, Syrbe U, et al. Monocyte deactivation in septic patients: restoration by IFN-gamma treatment. *Nat Med.* 1997;3(6):678-681. doi:10.1038/nm0697-678
111. Meisel C, Schefold JC, Pschowski R, et al. Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor to reverse sepsis-associated immunosuppression: a double-blind, randomized, placebo-controlled multicenter trial. *Am J Respir Crit Care Med.* 2009;180(7):640-648. doi:10.1164/rccm.200903-0363OC
112. Manjuck J, Saha DC, Astiz M, Eales LJ, Rackow EC. Decreased response to recall antigens is associated with depressed costimulatory receptor expression in septic critically ill patients. *J Lab Clin Med.* 2000;135(2):153-160. doi:10.1067/mlc.2000.104306
113. Zhang Y, Li J, Lou J, et al. Upregulation of programmed death-1 on T cells and programmed death ligand-1 on monocytes in septic shock patients. *Crit Care.* 2011;15(1). doi:10.1186/cc10059
114. Guignant C, Lepape A, Huang X, et al. Programmed death-1 levels correlate with increased mortality, nosocomial infection and immune dysfunctions in septic shock patients. *Crit Care.* 2011;15(2):R99. doi:10.1186/cc10112
115. Guisset O, Dilhuydy MS, Thiébaud R, et al. Decrease in circulating dendritic cells predicts fatal outcome in septic shock. *Intensive Care Med.* 2007;33(1):148-152. doi:10.1007/s00134-006-0436-7
116. Poehlmann H, Schefold JC, Zuckermann-Becker H, Volk H-D, Meisel C. Phenotype changes and impaired function of dendritic cell subsets in patients with sepsis: a prospective observational analysis. *Crit Care.* 2009;13(4):R119. doi:10.1186/cc7969
117. Riccardi F, Della Porta MG, Rovati B, et al. Flow cytometric analysis of peripheral blood dendritic cells in patients with severe sepsis. *Cytom Part B Clin Cytom.* 2011;80B(1):14-21. doi:10.1002/cyto.b.20540
118. Grimaldi D, Louis S, Pène F, et al. Profound and persistent decrease of circulating dendritic cells is associated with ICU-acquired infection in patients with septic shock. *Intensive Care Med.* 2011;37(9):1438-1446. doi:10.1007/s00134-011-2306-1
119. Hotchkiss RS, Tinsley KW, Swanson PE, et al. Sepsis-induced apoptosis causes progressive profound depletion of B and CD4+ T lymphocytes in humans. *J Immunol.* 2001;166(11):6952-6963. doi:10.4049/jimmunol.166.11.6952
120. Hotchkiss RS, Tinsley KW, Swanson PE, et al. Depletion of dendritic cells, but not macrophages, in patients with sepsis. *J Immunol.* 2002;168(5):2493-2500. doi:10.4049/jimmunol.168.5.2493
121. Boomer JS, To K, Chang KC, et al. Immunosuppression in Patients Who Die of Sepsis and Multiple Organ Failure. *JAMA.* 2011;306(23):2594. doi:10.1001/jama.2011.1829
122. Monneret G, Venet F, Pachot A, Lepape A. Monitoring immune dysfunctions in the

- septic patient: a new skin for the old ceremony. *Mol Med.* 2008;14(1-2):64-78. doi:10.2119/2007-00102.Monneret
123. Roth G, Moser B, Krenn C, et al. Susceptibility to programmed cell death in T-lymphocytes from septic patients: A mechanism for lymphopenia and Th2 predominance. *Biochem Biophys Res Commun.* 2003;308(4):840-846. doi:10.1016/S0006-291X(03)01482-7
 124. Wu H-P, Chung K, Lin C-Y, Jiang B-Y, Chuang D-Y, Liu Y-C. Associations of T helper 1, 2, 17 and regulatory T lymphocytes with mortality in severe sepsis. *Inflamm Res.* 2013;62(8):751-763. doi:10.1007/s00011-013-0630-3
 125. Ferguson NR, Galley HF, Webster NR. T helper cell subset ratios in patients with severe sepsis. *Intensive Care Med.* 1999;25(1):106-109. doi:10.1007/s001340050795
 126. Wu HP, Shih CC, Lin CY, Hua CC, Chuang DY. Serial increase of IL-12 response and human leukocyte antigen-DR expression in severe sepsis survivors. *Crit Care.* 2011;15(5). doi:10.1186/cc10464
 127. Stanilova SA, Karakolev ZT, Dimov GS, et al. High interleukin 12 and low interleukin 10 production after in vitro stimulation detected in sepsis survivors. *Intensive Care Med.* 2005;31(3):401-407. doi:10.1007/s00134-005-2575-7
 128. Heidecke CD, Hensler T, Weighardt H, et al. Selective defects of T lymphocyte function in patients with lethal intraabdominal infection. *Am J Surg.* 1999;178(4):288-292. doi:10.1016/S0002-9610(99)00183-X
 129. Crespo J, Sun H, Welling TH, Tian Z, Zou W. T cell anergy, exhaustion, senescence, and stemness in the tumor microenvironment. *Curr Opin Immunol.* 2013;25(2):214-221. doi:10.1016/j.coi.2012.12.003
 130. Macián F, Im SH, García-Cózar FJ, Rao A. T-cell anergy. *Curr Opin Immunol.* 2004;16(2):209-216. doi:10.1016/j.coi.2004.01.013
 131. Hotchkiss RS, Swanson PE, Freeman BD, et al. Apoptotic cell death in patients with sepsis, shock, and multiple organ dysfunction. *Crit Care Med.* 1999;27(7):1230-1251. doi:10.1097/00003246-199907000-00002
 132. Hotchkiss RS, Osmon SB, Chang KC, Wagner TH, Coopersmith CM, Karl IE. Accelerated Lymphocyte Death in Sepsis Occurs by both the Death Receptor and Mitochondrial Pathways. *J Immunol.* 2005;174(8):5110-5118. doi:10.4049/jimmunol.174.8.5110
 133. Le Tulzo Y, Pangault C, Gacouin A, et al. Early circulating lymphocyte apoptosis in human septic shock is associated with poor outcome. *Shock.* 2002;18(6):487-494. doi:10.1097/00024382-200212000-00001
 134. Voll RE, Herrmann M, Roth EA, Stach C, Kalden JR, Girkontaite I. Immunosuppressive effects of apoptotic cells. *Nature.* 1997;390(6658):350-351. doi:10.1038/37022

135. Barker RN, Erwig L, Pearce WP, Devine a, Rees a J. Differential effects of necrotic or apoptotic cell uptake on antigen presentation by macrophages. *Pathobiology*. 1999;67(5-6):302-305. doi:10.1159/000028085
136. Brahmandam P, Inoue S, Unsinger J, Chang KC, McDunn JE, Hotchkiss RS. Delayed administration of anti-PD-1 antibody reverses immune dysfunction and improves survival during sepsis. *J Leukoc Biol*. 2010;88(2):233-240. doi:10.1189/jlb.0110037
137. Yi JS, Cox MA, Zajac AJ. T-cell exhaustion: Characteristics, causes and conversion. *Immunology*. 2010;129(4):474-481. doi:10.1111/j.1365-2567.2010.03255.x
138. Wherry EJ, Kurachi M. Molecular and cellular insights into T cell exhaustion. *Nat Rev Immunol*. 2015;15(8):486-499. doi:10.1038/nri3862
139. Lang KS, Recher M, Navarini AA, et al. Inverse correlation between IL-7 receptor expression and CD8 T cell exhaustion during persistent antigen stimulation. *Eur J Immunol*. 2005;35(3):738-745. doi:10.1002/eji.200425828
140. Sakaguchi S, Sakaguchi N, Asano M, Itoh M, Toda M. Immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor alpha-chains (CD25). Breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases. *J Immunol*. 1995;155(3):1151-1164. doi:10.4049/jimmunol.171.1.417
141. Venet F, Chung C-S, Monneret G, et al. Regulatory T cell populations in sepsis and trauma. *J Leukoc Biol*. 2008;83(3):523-535. doi:10.1189/jlb.0607371
142. Abbas AK, Benoist C, Bluestone JA, et al. Regulatory T cells: Recommendations to simplify the nomenclature. *Nat Immunol*. 2013;14(4):307-308. doi:10.1038/ni.2554
143. Venet F, Chung C-S, Kherouf H, et al. Increased circulating regulatory T cells (CD4+CD25+CD127-) contribute to lymphocyte anergy in septic shock patients. *Intensive Care Med*. 2009;35(4):678-686. doi:10.1007/s00134-008-1337-8
144. Hori S, Nomura T, Sakaguchi S. Control of regulatory T cell development by the transcription factor Foxp3. *Science*. 2003;299(5609):1057-1061. doi:10.1126/science.1079490
145. Groux H, O'Garra A, Bigler M, et al. A CD4+ T-cell subset inhibits antigen-specific T-cell responses and prevents colitis. *Nature*. 1997;389(6652):737-742. doi:10.1038/39614
146. Roncarolo M, Bacchetta R, Bordignon C, Narula S, Levings M. Type 1 T regulatory cells. *Immunol Rev*. 2001;182(II):68-79. doi:10.1034/j.1600-065X.2001.1820105.x
147. Adeegbe DO, Nishikawa H. Natural and induced T regulatory cells in cancer. *Front Immunol*. 2013;4(JUL). doi:10.3389/fimmu.2013.00190
148. Fehérvári Z, Sakaguchi S. CD4+ Tregs and immune control. *J Clin Invest*. 2004;114(9):1209-1217. doi:10.1172/JCI200423395

149. Kretschmer K, Apostolou I, Hawiger D, Khazaie K, Nussenzweig MC, von Boehmer H. Inducing and expanding regulatory T cell populations by foreign antigen. *Nat Immunol.* 2005;6(12):1219-1227. doi:10.1038/ni1265
150. Monneret G, Debard A-L, Venet F, et al. Marked elevation of human circulating CD4+CD25+ regulatory T cells in sepsis-induced immunoparalysis. *Crit Care Med.* 2003;31(7):2068-2071. doi:10.1097/01.CCM.0000069345.78884.0F
151. Venet F, Pachot A, Debard AL, et al. Increased percentage of CD4+CD25+ regulatory T cells during septic shock is due to the decrease of CD4+CD25- lymphocytes. *Crit Care Med.* 2004;32(11):2329-2331. doi:10.1097/01.CCM.0000145999.42971.4B
152. Tiemessen MM, Jagger AL, Evans HG, Van Herwijnen MJC, John S, Taams LS. CD4+CD25+Foxp3+ regulatory T cells induce alternative activation of human monocytes/macrophages. *PNAS.* 2007;104:19446-19451. doi:10.1073/pnas.0706832104
153. Leng FY, Liu JL, Liu ZJ, Yin JY, Qu HP. Increased proportion of CD4+CD25+Foxp3+ regulatory T cells during early-stage sepsis in ICU patients. *J Microbiol Immunol Infect.* 2013;46(5):338-344. doi:10.1016/j.jmii.2012.06.012
154. Lee C-R, Kwak Y, Yang T, et al. Myeloid-Derived Suppressor Cells Are Controlled by Regulatory T Cells via TGF- β during Murine Colitis. *Cell Rep.* 2016;17(12):3219-3232. doi:10.1016/j.celrep.2016.11.062
155. Gabrilovich DI, Bronte V, Chen S, et al. The terminology issue for myeloid-derived suppressor cells. *Cancer Res.* 2007;67(1):425; author reply 426. doi:10.1158/0008-5472.CAN-06-3037
156. Gabrilovich DI, Nagaraj S. Myeloid-derived suppressor cells as regulators of the immune system. *Nat Rev Immunol.* 2009;9(3):162-174. doi:10.1038/nri2506
157. Young MR, Newby M, Wepsic HT. Hematopoiesis and suppressor bone marrow cells in mice bearing large metastatic Lewis lung carcinoma tumors. *Cancer Res.* 1987;47(1):100-105. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2947676>.
158. Tsuchiya Y, Igarashi M, Suzuki R, Kumagai K. Production of colony-stimulating factor by tumor cells and the factor-mediated induction of suppressor cells. *J Immunol.* 1988;141(2):699-708. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2968407>.
159. Young MR, Wright MA. Myelopoiesis-associated immune suppressor cells in mice bearing metastatic Lewis lung carcinoma tumors: gamma interferon plus tumor necrosis factor alpha synergistically reduces immune suppressor and tumor growth-promoting activities of bone marrow cells. *Cancer Res.* 1992;52(22):6335-6340. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1423279>.
160. Pak S, Wright M a, Matthews JP, Collins SL, Petruzzelli GJ, Young MR. Mechanisms of immune suppression in patients with head and neck cancer: presence of CD34(+) cells which suppress immune functions within cancers that secrete granulocyte-macrophage colony-stimulating factor. *Clin Cancer Res.* 1995;1(1):95-

103. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9815891>.
161. Oseroff A, Okada S, Strober S. Natural suppressor (NS) cells found in the spleen of neonatal mice and adult mice given total lymphoid irradiation (TLI) express the null surface phenotype. *J Immunol.* 1984;132(1):101-110. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6228575>.
162. Brooks-Kaiser JC, Bourque LA, Hoskin DW. Heterogeneity of splenic natural suppressor cells induced in mice by treatment with cyclophosphamide. *Immunopharmacology.* 1993;25(2):117-129. doi:10.1016/0162-3109(93)90015-I
163. Lee MY, Rosse C. Depletion of lymphocyte subpopulations in primary and secondary lymphoid organs of mice by a transplanted granulocytosis-inducing mammary carcinoma. *Cancer Res.* 1982;42(4):1255-1260. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7060002>.
164. Talmadge JE, Gabrilovich DI. History of myeloid-derived suppressor cells. *Nat Rev Cancer.* 2013;13(10):739-752. doi:10.1038/nrc3581
165. Greten TF, Manns MP, Korangy F. Myeloid derived suppressor cells in human diseases. *Int Immunopharmacol.* 2011;11(7):802-807. doi:10.1016/j.intimp.2011.01.003
166. Ost M, Singh A, Peschel A, Mehling R, Rieber N, Hartl D. Myeloid-Derived Suppressor Cells in Bacterial Infections. *Front Cell Infect Microbiol.* 2016;6(March):37. doi:10.3389/fcimb.2016.00037
167. Matsumura T, Kobayashi K, Ato M. Myeloid-derived Suppressor Cells (MDSCs) and their related Cell Subpopulations. In: *The Research and Biology of Cancer I*. iConcept Press; 2013.
168. Yang R, Roden RBS. The Terminology Issue for Myeloid-Derived Suppressor Cells. *Cancer Res.* 2007;67(1):426-426. doi:10.1158/0008-5472.CAN-06-3630
169. Bronte V, Apolloni E, Cabrelle A, et al. Identification of a CD11b+/Gr-1+/CD31+ myeloid progenitor capable of activating or suppressing CD8+ T cells. *Blood.* 2000;96(12):3838-3846. doi:10.1097/OPX.0b013e3182540562.The
170. Gabrilovich DI, Velders MP, Sotomayor EM, Kast WM. Mechanism of Immune Dysfunction in Cancer Mediated by Immature Gr-1+ Myeloid Cells. *J Immunol.* 2001;166(9):5398-5406. doi:10.4049/jimmunol.166.9.5398
171. Kusmartsev S, Nefedova Y, Yoder D, Gabrilovich DI. Antigen-Specific Inhibition of CD8+ T Cell Response by Immature Myeloid Cells in Cancer Is Mediated by Reactive Oxygen Species. *J Immunol.* 2004;172(2):989-999. doi:10.4049/jimmunol.172.2.989
172. Peranzoni E, Zilio S, Marigo I, et al. Myeloid-derived suppressor cell heterogeneity and subset definition. *Curr Opin Immunol.* 2010;22(2):238-244. doi:10.1016/j.coi.2010.01.021

173. Cuenca AG, Delano MJ, Kelly-Scumpia KM, et al. A paradoxical role for myeloid-derived suppressor cells in sepsis and trauma. *Mol Med.* 2011;17(3-4):281-292. doi:10.2119/molmed.2010.00178
174. Movahedi K, Guilliams M, Van den Bossche J, et al. Identification of discrete tumor-induced myeloid-derived suppressor cell subpopulations with distinct T cell-suppressive activity. *Blood.* 2008;111(8):4233-4244. doi:10.1182/blood-2007-07-099226
175. Youn J-I, Nagaraj S, Collazo M, Gabrilovich DI. Subsets of myeloid-derived suppressor cells in tumor-bearing mice. *J Immunol.* 2008;181(8):5791-5802. doi:10.4049/jimmunol.181.8.5791
176. Bronte V, Brandau S, Chen SH, et al. Recommendations for myeloid-derived suppressor cell nomenclature and characterization standards. *Nat Commun.* 2016;7. doi:10.1038/ncomms12150
177. Condamine T, Dominguez GA, Youn J-I, et al. Lectin-type oxidized LDL receptor-1 distinguishes population of human polymorphonuclear myeloid-derived suppressor cells in cancer patients. *Sci Immunol.* 2016;1(2):aaf8943-aaf8943. doi:10.1126/sciimmunol.aaf8943
178. Veglia F, Perego M, Gabrilovich D. Myeloid-derived suppressor cells coming of age. *Nat Immunol.* 2018;19(2):108-119. doi:10.1038/s41590-017-0022-x
179. Delano MJ, Kelly-Scumpia KM, Thayer TC, et al. Neutrophil mobilization from the bone marrow during polymicrobial sepsis is dependent on CXCL12 signaling. *J Immunol.* 2011;187(2):911-918. doi:10.4049/jimmunol.1100588
180. Furze RC, Rankin SM. Neutrophil mobilization and clearance in the bone marrow. *Immunology.* 2008;125(3):281-288. doi:10.1111/j.1365-2567.2008.02950.x
181. Boettcher S, Ziegler P, Schmid MA, et al. Cutting Edge: LPS-Induced Emergency Myelopoiesis Depends on TLR4-Expressing Nonhematopoietic Cells. *J Immunol.* 2012;188(12):5824-5828. doi:10.4049/jimmunol.1103253
182. Boettcher S, Gerosa RC, Radpour R, et al. Endothelial cells translate pathogen signals into G-CSF-driven emergency granulopoiesis. *Blood.* 2014;124(9):1393-1403. doi:10.1182/blood-2014-04-570762
183. Ueda Y, Kondo M, Kelsoe G. Inflammation and the reciprocal production of granulocytes and lymphocytes in bone marrow. *J Exp Med.* 2005;201(11):1771-1780. doi:10.1084/jem.20041419
184. Glasser L, Fiederlein RL. Functional differentiation of normal human neutrophils. *Blood.* 1987;69(3):937-944. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3814822>.
185. Ueda Y, Yang K, Foster SJ, Kondo M, Kelsoe G. Inflammation controls B lymphopoiesis by regulating chemokine CXCL12 expression. *J Exp Med.* 2004;199(1):47-58. doi:10.1084/jem.20031104

186. Scumpia PO, Kelly-Scumpia KM, Delano MJ, et al. Cutting edge: bacterial infection induces hematopoietic stem and progenitor cell expansion in the absence of TLR signaling. *J Immunol.* 2010;184(5):2247-2251. doi:10.4049/jimmunol.0903652
187. Basu S, Hodgson G, Zhang H-H, Katz M, Quilici C, Dunn AR. “Emergency” granulopoiesis in G-CSF-deficient mice in response to *Candida albicans* infection. *Blood.* 2000;95(12):3725-3733. <http://www.bloodjournal.org/bloodjournal/95/12/3725.full.pdf>.
188. Condamine T, Mastio J, Gabrilovich DI. Transcriptional regulation of myeloid-derived suppressor cells. *J Leukoc Biol.* 2015;98(6):913-922. doi:10.1189/jlb.4RI0515-204R
189. Condamine T, Gabrilovich DI. Molecular mechanisms regulating myeloid-derived suppressor cell differentiation and function. *Trends Immunol.* 2011;32(1):19-25. doi:10.1016/j.it.2010.10.002
190. Ribechini E, Hutchinson JA, Hergovits S, et al. Novel GM-CSF signals via IFN- γ R/IRF-1 and AKT/mTOR license monocytes for suppressor function. *Blood Adv.* 2017;1(14):947-960. doi:10.1182/bloodadvances.2017006858
191. Heike T, Nakahata T. Ex vivo expansion of hematopoietic stem cells by cytokines. *Biochim Biophys Acta - Mol Cell Res.* 2002;1592(3):313-321. doi:10.1016/S0167-4889(02)00324-5
192. Panopoulos AD, Watowich SS. Granulocyte colony-stimulating factor: molecular mechanisms of action during steady state and “emergency” hematopoiesis. *Cytokine.* 2008;42(3):277-288. doi:10.1016/j.cyto.2008.03.002
193. Zhou Z, French DL, Ma G, et al. Development and function of myeloid-derived suppressor cells generated from mouse embryonic and hematopoietic stem cells. *Stem Cells.* 2010;28(3):620-632. doi:10.1002/stem.301
194. Gabrilovich D, Ishida T, Oyama T, et al. Vascular endothelial growth factor inhibits the development of dendritic cells and dramatically affects the differentiation of multiple hematopoietic lineages in vivo. *Blood.* 1998;92(11):4150-4166. doi:1998 92:4150-4166
195. Casacuberta-Serra S, Parés M, Golbano A, Coves E, Espejo C, Barquinero J. Myeloid-derived suppressor cells can be efficiently generated from human hematopoietic progenitors and peripheral blood monocytes. *Immunol Cell Biol.* 2017;95(6):538-548. doi:10.1038/icb.2017.4
196. Lee CR, Lee W, Cho SK, Park SG. Characterization of multiple cytokine combinations and TGF- β on differentiation and functions of myeloid-derived suppressor cells. *Int J Mol Sci.* 2018;19(3). doi:10.3390/ijms19030869
197. Bunt SK, Clements VK, Hanson EM, Sinha P, Ostrand-Rosenberg S. Inflammation enhances myeloid-derived suppressor cell cross-talk by signaling through Toll-like receptor 4. *J Leukoc Biol.* 2009;85(6):996-1004. doi:10.1189/jlb.0708446

198. Lechner MG, Liebertz DJ, Epstein AL. Characterization of cytokine-induced myeloid-derived suppressor cells from normal human peripheral blood mononuclear cells. *J Immunol.* 2010;185(4):2273-2284. doi:10.4049/jimmunol.1000901
199. Hu X, Li B, Li X, et al. Transmembrane TNF- α promotes suppressive activities of myeloid-derived suppressor cells via TNFR2. *J Immunol.* 2014;192(3):1320-1331. doi:10.4049/jimmunol.1203195
200. Greifenberg V, Ribechini E, Rössner S, Lutz MB. Myeloid-derived suppressor cell activation by combined LPS and IFN- γ treatment impairs DC development. *Eur J Immunol.* 2009;39(10):2865-2876. doi:10.1002/eji.200939486
201. Cheng P, Corzo CA, Luetsteke N, et al. Inhibition of dendritic cell differentiation and accumulation of myeloid-derived suppressor cells in cancer is regulated by S100A9 protein. *J Exp Med.* 2008;205(10):2235-2249. doi:10.1084/jem.20080132
202. Dai J, Kumbhare A, Youssef D, McCall CE, El Gazzar M. Intracellular S100A9 Promotes Myeloid-Derived Suppressor Cells during Late Sepsis. *Front Immunol.* 2017;8(NOV):1565. doi:10.3389/fimmu.2017.01565
203. Sinha P, Okoro C, Foell D, Freeze HH, Ostrand-Rosenberg S, Srikrishna G. Proinflammatory S100 proteins regulate the accumulation of myeloid-derived suppressor cells. *J Immunol.* 2008;181(7):4666-4675. doi:10.4049/jimmunol.181.7.4666
204. Schindler C, Levy DE, Decker T. JAK-STAT signaling: From interferons to cytokines. *J Biol Chem.* 2007;282(28):20059-20063. doi:10.1074/jbc.R700016200
205. Sander LE, Sackett SD, Dierssen U, et al. Hepatic acute-phase proteins control innate immune responses during infection by promoting myeloid-derived suppressor cell function. *J Exp Med.* 2010;207(7):1453-1464. doi:10.1084/jem.20091474
206. de Koning JP, Soede-Bobok AA, Ward AC, et al. STAT3-mediated differentiation and survival of myeloid cells in response to granulocyte colony-stimulating factor: role for the cyclin-dependent kinase inhibitor p27Kip1. *Oncogene.* 2000;19(29):3290-3298. doi:10.1038/sj.onc.1203627
207. McClure C, Brudecki L, Ferguson DA, et al. MicroRNA 21 (miR-21) and miR-181b couple with NFI-A to generate myeloid-derived suppressor cells and promote immunosuppression in late sepsis. *Infect Immun.* 2014;82(9):3816-3825. doi:10.1128/IAI.01495-14
208. Dai J, Kumbhare A, Youssef D, Yao ZQ, McCall CE, El Gazzar M. Expression of C/EBP β in myeloid progenitors during sepsis promotes immunosuppression. *Mol Immunol.* 2017;91(September):165-172. doi:10.1016/j.molimm.2017.09.008
209. Martinez-Moczygemba M, Huston DP. Biology of common beta receptor-signaling cytokines: IL-3, IL-5, and GM-CSF. *J Allergy Clin Immunol.* 2003;112(4):653-65; quiz 666. doi:10.1016/S0091

210. Dai J, Kumbhare A, Williams DA, et al. Nfia deletion in myeloid cells blocks expansion of myeloid-derived suppressor cells during sepsis. *Innate Immun.* 2018;24(1):54-65. doi:10.1177/1753425917742956
211. Hoesel B, Schmid JA. The complexity of NF- κ B signaling in inflammation and cancer. *Mol Cancer.* 2013;12(1):86. doi:10.1186/1476-4598-12-86
212. Sinha P, Clements VK, Ostrand-Rosenberg S. Reduction of Myeloid-Derived Suppressor Cells and Induction of M1 Macrophages Facilitate the Rejection of Established Metastatic Disease. *J Immunol.* 2005;174(2):636-645. doi:10.4049/jimmunol.174.2.636
213. Delano MJ, Scumpia PO, Weinstein JS, et al. MyD88-dependent expansion of an immature GR-1(+)CD11b(+) population induces T cell suppression and Th2 polarization in sepsis. *J Exp Med.* 2007;204(6):1463-1474. doi:10.1084/jem.20062602
214. Sinha P, Clements VK, Ostrand-Rosenberg S. Interleukin-13-regulated M2 macrophages in combination with myeloid suppressor cells block immune surveillance against metastasis. *Cancer Res.* 2005;65(24):11743-11751. doi:10.1158/0008-5472.CAN-05-0045
215. Böger RH, Bode-Böger SM. The Clinical Pharmacology of L-Arginine. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 2001;41:79-99. doi:10.1146/annurev.pharmtox.41.1.79
216. Rodriguez PC, Zea AH, DeSalvo J, et al. L-Arginine Consumption by Macrophages Modulates the Expression of CD3 Chain in T Lymphocytes. *J Immunol.* 2003;171(3):1232-1239. doi:10.4049/jimmunol.171.3.1232
217. Tripathi P. Nitric oxide and the immune response. *Indian J Biochem Biophys.* 2007;44(October):310-319. doi:10.1038/ni1001-907
218. Rodriguez PC, Zea AH, Culotta KS, Zabaleta J, Ochoa JB, Ochoa AC. Regulation of T cell receptor CD3zeta chain expression by L-arginine. *J Biol Chem.* 2002;277(24):21123-21129. doi:10.1074/jbc.M110675200
219. Ochoa AC, Zea AH, Hernandez C, Rodriguez PC. Arginase, prostaglandins, and myeloid-derived suppressor cells in renal cell carcinoma. In: *Clinical Cancer Research.* Vol 13. ; 2007. doi:10.1158/1078-0432.CCR-06-2197
220. Sauer H, Wartenberg M, Hescheler J. Reactive oxygen species as intracellular messengers during cell growth and differentiation. *Cell Physiol Biochem.* 2001;11(4):173-186. doi:47804
221. Xia Y, Zweier JL. Superoxide and peroxynitrite generation from inducible nitric oxide synthase in macrophages. *Proc Natl Acad Sci.* 1997;94(13):6954-6958. doi:10.1073/pnas.94.13.6954
222. Nagaraj S, Gupta K, Pisarev V, et al. Altered recognition of antigen is a mechanism of CD8+T cell tolerance in cancer. *Nat Med.* 2007;13(7):828-835. doi:10.1038/nm1609

223. Huang B, Pan PY, Li Q, et al. Gr-1+CD115+immature myeloid suppressor cells mediate the development of tumor-induced T regulatory cells and T-cell anergy in tumor-bearing host. *Cancer Res.* 2006;66(2):1123-1131. doi:10.1158/0008-5472.CAN-05-1299
224. Serafini P, Mgebroff S, Noonan K, Borrello I. Myeloid-derived suppressor cells promote cross-tolerance in B-cell lymphoma by expanding regulatory T cells. *Cancer Res.* 2008;68(13):5439-5449. doi:10.1158/0008-5472.CAN-07-6621
225. Srivastava MK, Sinha P, Clements VK, Rodriguez P, Ostrand-Rosenberg S. Myeloid-derived suppressor cells inhibit T-cell activation by depleting cystine and cysteine. *Cancer Res.* 2010;70(1):68-77. doi:10.1158/0008-5472.CAN-09-2587
226. Angelini G, Gardella S, Ardy M, et al. Antigen-presenting dendritic cells provide the reducing extracellular microenvironment required for T lymphocyte activation. *Proc Natl Acad Sci.* 2002;99(3):1491-1496. doi:10.1073/pnas.022630299
227. Hanson EM, Clements VK, Sinha P, Ilkovitch D, Ostrand-Rosenberg S. Myeloid-derived suppressor cells down-regulate L-selectin expression on CD4+ and CD8+ T cells. *J Immunol.* 2009;183(2):937-944. doi:10.4049/jimmunol.0804253
228. Tedder TF, Steeber DA, Pizcueta P. L-selectin-deficient mice have impaired leukocyte recruitment into inflammatory sites. *J Exp Med.* 1995;181(6):2259-2264. doi:10.1084/jem.181.6.2259
229. Sinha P, Clements VK, Bunt SK, Albelda SM, Ostrand-Rosenberg S. Cross-talk between myeloid-derived suppressor cells and macrophages subverts tumor immunity toward a type 2 response. *J Immunol.* 2007;179(2):977-983. doi:179/2/977 [pii]
230. Geiger R, Rieckmann JC, Wolf T, et al. L-Arginine Modulates T Cell Metabolism and Enhances Survival and Anti-tumor Activity. *Cell.* 2016;167(3):829-842.e13. doi:10.1016/j.cell.2016.09.031
231. Li H, Han Y, Guo Q, Zhang M, Cao X. Cancer-expanded myeloid-derived suppressor cells induce anergy of NK cells through membrane-bound TGF-beta 1. *J Immunol.* 2009;182(1):240-249. doi:182/1/240 [pii]
232. Zhu J, Huang X, Yang Y. Myeloid-derived suppressor cells regulate natural killer cell response to adenovirus-mediated gene transfer. *J Virol.* 2012;86(24):13689-13696. doi:10.1128/JVI.01595-12 [pii]
233. Freeman GJ, Long AJ, Iwai Y, et al. Engagement of the Pd-1 Immunoinhibitory Receptor by a Novel B7 Family Member Leads to Negative Regulation of Lymphocyte Activation. *J Exp Med.* 2000;192(7):1027-1034. doi:10.1084/jem.192.7.1027
234. Noman MZ, Desantis G, Janji B, et al. PD-L1 is a novel direct target of HIF-1 α , and its blockade under hypoxia enhanced MDSC-mediated T cell activation. *J Exp Med.* 2014;211(5):781-790. doi:10.1084/jem.20131916
235. Marchioni A, Fantini R, Antenora F, Clini E, Fabbri L. Chronic critical illness: the

- price of survival. *Eur J Clin Invest.* 2015;45(12):1341-1349. doi:10.1111/eci.12547
236. Carson SS. Definitions and epidemiology of the chronically critically ill. *Respir Care.* 2012;57(6):848-56-8. doi:10.4187/respcare.01736
237. Nelson JE, Cox CE, Hope AA, Carson SS. Chronic critical illness. *Am J Respir Crit Care Med.* 2010;182(4):446-454. doi:10.1164/rccm.201002-0210CI
238. Kahn JM, Le T, Angus DC, et al. The epidemiology of chronic critical illness in the United States. *Crit Care Med.* 2015;43(2):282-287. doi:10.1097/CCM.0000000000000710
239. Scheinhorn DJ, Hassenpflug MS, Votto JJ, et al. Post-ICU Mechanical Ventilation at 23 Long-term Care Hospitals. *Chest.* 2007;131(1):85-93. doi:10.1378/chest.06-1081
240. Cox CE, Carson SS, Lindquist JH, Olsen MK, Govert JA, Chelluri L. Differences in one-year health outcomes and resource utilization by definition of prolonged mechanical ventilation: A prospective cohort study. *Crit Care.* 2007;11. doi:10.1186/cc5667
241. Unroe M, Kahn JM, Carson SS, et al. One-year trajectories of care and resource utilization for recipients of prolonged mechanical ventilation: A cohort study. *Ann Intern Med.* 2010;153(3):167-175. doi:10.7326/0003-4819-153-3-201008030-00007
242. Gentile LF, Cuenca AG, Efron PA, et al. Persistent inflammation and immunosuppression: a common syndrome and new horizon for surgical intensive care. *J Trauma Acute Care Surg.* 2012;72(6):1491-1501. doi:10.1097/TA.0b013e318256e000
243. Iwashyna TJ, Ely EW, Smith DM, Langa KM. Long-term cognitive impairment and functional disability among survivors of severe sepsis. *JAMA.* 2010;304(16):1787-1794. doi:10.1001/jama.2010.1553
244. Winters BD, Eberlein M, Leung J, Needham DM, Pronovost PJ, Sevransky JE. Long-term mortality and quality of life in sepsis: A systematic review. *Crit Care Med.* 2010;38(5):1276-1283. doi:10.1097/CCM.0b013e3181d8cc1d
245. Wang HE, Szychowski JM, Griffin R, Safford MM, Shapiro NI, Howard G. Long-term mortality after community-acquired sepsis: a longitudinal population-based cohort study. *BMJ Open.* 2014;4(1):e004283. doi:10.1136/bmjopen-2013-004283
246. Karlsson S, Ruokonen E, Varpula T, Ala-Kokko TI, Pettilä V. Long-term outcome and quality-adjusted life years after severe sepsis. *Crit Care Med.* 2009;37(4):1268-1274. doi:10.1097/CCM.0b013e31819c13ac
247. Hawkins RB, Raymond SL, Stortz JA, et al. Chronic Critical Illness and the Persistent Inflammation, Immunosuppression, and Catabolism Syndrome. *Front Immunol.* 2018;9:1511. doi:10.3389/fimmu.2018.01511
248. Powers SK, Wiggs MP, Sollanek KJ, Smuder AJ. Ventilator-induced diaphragm

- dysfunction: cause and effect. *AJP Regul Integr Comp Physiol*. 2013;305(5):R464-R477. doi:10.1152/ajpregu.00231.2013
249. Schepens T, Verbrugghe W, Dams K, Corthouts B, Parizel PM, Jorens PG. The course of diaphragm atrophy in ventilated patients assessed with ultrasound: a longitudinal cohort study. *Crit Care*. 2015;19:422. doi:10.1186/s13054-015-1141-0
250. Darcy CJ, Minigo G, Piera KA, et al. Neutrophils with myeloid derived suppressor function deplete arginine and constrain T cell function in septic shock patients. *Crit Care*. 2014;18(4):R163. doi:10.1186/cc14003
251. Janols H, Bergenfelz C, Allaoui R, et al. A high frequency of MDSCs in sepsis patients, with the granulocytic subtype dominating in gram-positive cases. *J Leukoc Biol*. 2014;96(5):685-693. doi:10.1189/jlb.5HI0214-074R
252. Mathias B, Delmas AL, Ozrazgat-Baslanti T, et al. Human myeloid-derived suppressor cells are associated with chronic immune suppression after severe sepsis/septic shock. *Ann Surg*. 2017;265(4):827-834. doi:10.1097/SLA.0000000000001783
253. Uhel F, Azzaoui I, Grégoire M, et al. Early expansion of circulating granulocytic myeloid-derived suppressor cells predicts development of nosocomial infections in patients with sepsis. *Am J Respir Crit Care Med*. 2017;196(3):315-327. doi:10.1164/rccm.201606-1143OC
254. Stortz JA, Murphy TJ, Raymond SL, et al. Evidence for persistent immune suppression in patients who develop chronic critical illness after sepsis. In: *Shock*. Vol 49. ; 2018:249-258. doi:10.1097/SHK.0000000000000981
255. Deutschman CS, Tracey KJ. Sepsis: Current dogma and new perspectives. *Immunity*. 2014;40(4):463-475. doi:10.1016/j.immuni.2014.04.001
256. Moreno R, Vincent JL, Matos R, et al. The use of maximum SOFA score to quantify organ dysfunction/failure in intensive care. Results of a prospective, multicentre study. Working Group on Sepsis related Problems of the ESICM. *Intensive Care Med*. 1999;25(7):686-696. doi:10.1007/s001340050931
257. Le Gall JR, Lemeshow S, Saulnier F. A new Simplified Acute Physiology Score (SAPS II) based on a European/North American multicenter study. *JAMA*. 1993;270(24):2957-2963. doi:10.1001/jama.1993.03510240069035
258. Knaus WA, Draper EA, Wagner DP, Zimmerman JE. APACHE II: a severity of disease classification system. *Crit Care Med*. 1985;13(10):818-829. doi:10.1097/00003246-198510000-00009
259. Surbatovic M, Veljovic M, Jevdjic J, Popovic N, Djordjevic D, Radakovic S. Immunoinflammatory response in critically ill patients: severe sepsis and/or trauma. *Mediators Inflamm*. 2013;2013:362793. doi:10.1155/2013/362793
260. Surbatovic M, Vojvodic D, Khan W. Immune Response in Critically Ill Patients. *Mediators Inflamm*. 2018;2018:1-3. doi:10.1155/2018/9524315

261. Derive M, Bouazza Y, Alauzet C, Gibot S. Myeloid-derived suppressor cells control microbial sepsis. *Intensive Care Med.* 2012;38(6):1040-1049. doi:10.1007/s00134-012-2574-4
262. Brudecki L, Ferguson DA, McCall CE, El Gazzar M. Myeloid-Derived Suppressor Cells Evolve during Sepsis and Can Enhance or Attenuate the Systemic Inflammatory Response. Bäumlér AJ, ed. *Infect Immun.* 2012;80(6):2026-2034. doi:10.1128/IAI.00239-12
263. Kotsakis A, Harasymczuk M, Schilling B, Georgoulías V, Argiris A, Whiteside TL. Myeloid-derived suppressor cell measurements in fresh and cryopreserved blood samples. *J Immunol Methods.* 2012;381(1-2):14-22. doi:10.1016/j.jim.2012.04.004
264. Trellakis S, Bruderek K, Hütte J, et al. Granulocytic myeloid-derived suppressor cells are cryosensitive and their frequency does not correlate with serum concentrations of colony-stimulating factors in head and neck cancer. *Innate Immun.* 2013;19(3):328-336. doi:10.1177/1753425912463618
265. Stanojevic I, Miller K, Kandolf-Sekulovic L, et al. A subpopulation that may correspond to granulocytic myeloid-derived suppressor cells reflects the clinical stage and progression of cutaneous melanoma. *Int Immunol.* 2016;28(2):87-97. doi:10.1093/intimm/dxv053
266. Elghetany MT. Surface Antigen Changes during Normal Neutrophilic Development: A Critical Review. *Blood Cells, Mol Dis.* 2002;28(2):260-274. doi:10.1006/bcmd.2002.0513
267. Marini O, Costa S, Bevilacqua D, et al. Mature CD10+and immature CD10-neutrophils present in G-CSF-treated donors display opposite effects on T cells. *Blood.* 2017;129(10):1343-1356. doi:10.1182/blood-2016-04-713206
268. Pillay J, Tak T, Kamp VM, Koenderman L. Immune suppression by neutrophils and granulocytic myeloid-derived suppressor cells: Similarities and differences. *Cell Mol Life Sci.* 2013;70(20):3813-3827. doi:10.1007/s00018-013-1286-4
269. Stanojevic I, Djukic M, Vojvodic D. Authors' reply to "Granulocytic myeloid-derived suppressor cells in peripheral blood of patients with cutaneous melanoma." *Int Immunol.* December 2015:dxv078. doi:10.1093/intimm/dxv078
270. Schmielau J, Finn OJ. Activated granulocytes and granulocyte-derived hydrogen peroxide are the underlying mechanism of suppression of T-cell function in advanced cancer patients. *Cancer Res.* 2001;61(12):4756-4760. doi:10.1158/0008-5472.can-04-0465
271. Zea AH, Rodriguez PC, Atkins MB, et al. Arginase-producing myeloid suppressor cells in renal cell carcinoma patients: A mechanism of tumor evasion. *Cancer Res.* 2005;65(8):3044-3048. doi:10.1158/0008-5472.CAN-04-4505
272. Youn J-I, Gabrilovich DI. The biology of myeloid-derived suppressor cells: the blessing and the curse of morphological and functional heterogeneity. *Eur J Immunol.*

- 2010;40(11):2969-2975. doi:10.1002/eji.201040895.The
273. Millrud CR, Bergenfelz C, Leandersson K. On the origin of myeloid-derived suppressor cells. *Oncotarget*. 2017;8(2). doi:10.18632/oncotarget.12278
274. Fridlender ZG, Sun J, Kim S, et al. Polarization of Tumor-Associated Neutrophil Phenotype by TGF- β : "N1" versus "N2" TAN. *Cancer Cell*. 2009;16(3):183-194. doi:10.1016/j.ccr.2009.06.017
275. Rodriguez PC, Ernstoff MS, Hernandez C, et al. Arginase I-producing myeloid-derived suppressor cells in renal cell carcinoma are a subpopulation of activated granulocytes. *Cancer Res*. 2009;69(4):1553-1560. doi:10.1158/0008-5472.CAN-08-1921
276. Ostrand-Rosenberg S, Fenselau C. Myeloid-Derived Suppressor Cells: Immune-Suppressive Cells That Impair Antitumor Immunity and Are Sculpted by Their Environment. *J Immunol*. 2018;200(2):422-431. doi:10.4049/jimmunol.1701019
277. Fridlender ZG, Sun J, Mishalian I, et al. Transcriptomic analysis comparing tumor-associated neutrophils with granulocytic myeloid-derived suppressor cells and normal neutrophils. *PLoS One*. 2012;7(2). doi:10.1371/journal.pone.0031524
278. Sagiv JY, Michaeli J, Assi S, et al. Phenotypic diversity and plasticity in circulating neutrophil subpopulations in cancer. *Cell Rep*. 2015;10(4):562-574. doi:10.1016/j.celrep.2014.12.039
279. Cossman J, Neckers L, Leonard W, Greene W. Polymorphonuclear neutrophils express the common acute lymphoblastic antigen. *J Exp Med*. 1983;157(March):1064-1069. doi:10.1084/jem.157.3.1064
280. Cuenca AG, Moldawer LL. Myeloid-derived suppressor cells in sepsis: friend or foe? *Intensive Care Med*. 2012;38(6):928-930. doi:10.1007/s00134-012-2575-3
281. Seok J, Warren HS, Cuenca AG, et al. Genomic responses in mouse models poorly mimic human inflammatory diseases. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2013;110(9):3507-3512. doi:10.1073/pnas.1222878110
282. Osuchowski MF, Remick DG, Lederer JA, et al. Abandon the mouse research ship? Not just yet! *Shock*. 2014;41(6):463-475. doi:10.1097/SHK.0000000000000153
283. Efron PA, Mohr AM, Moore FA, Moldawer LL. The future of murine sepsis and trauma research models. *J Leukoc Biol*. 2015;98(6):945-952. doi:10.1189/jlb.5MR0315-127R
284. Stortz JA, Raymond SL, Mira JC, Lyle L. ML, Mohr AM, Efron PA. Murine models of sepsis and trauma: Can We bridge the gap? *ILAR J*. 2017;58(1):90-105. doi:10.1093/ilar/ilx007
285. Gey A, Tadie JM, Caumont-Prim A, et al. Granulocytic myeloid-derived suppressor cells inversely correlate with plasma arginine and overall survival in critically ill

- patients. *Clin Exp Immunol.* 2015;180(2):280-288. doi:10.1111/cei.12567
286. Ribechini E, Greifenberg V, Sandwick S, Lutz MB. Subsets, expansion and activation of myeloid-derived suppressor cells. *Med Microbiol Immunol.* 2010;199(3):273-281. doi:10.1007/s00430-010-0151-4
287. Surbatovic M, Popovic N, Vojvodic D, et al. Cytokine profile in severe gram- positive and gram-negative abdominal sepsis. *Sci Rep.* 2015;5:11355. doi:10.1038/srep11355
288. Minejima E, Bensman J, She RC, et al. A Dysregulated Balance of Proinflammatory and Anti-Inflammatory Host Cytokine Response Early during Therapy Predicts Persistence and Mortality in Staphylococcus aureus Bacteremia. *Crit Care Med.* 2016;44(4):671-679. doi:10.1097/CCM.0000000000001465
289. Hotchkiss RS, Moldawer LL. Parallels between cancer and infectious disease. *N Engl J Med.* 2014;371(4):380-383. doi:10.1056/NEJMcibr1404664
290. Gabrilovich DI. Editorial: The intricacy of choice: can bacteria decide what type of myeloid cells to stimulate? *J Leukoc Biol.* 2014;96(5):671-674. doi:10.1189/jlb.4CE0514-271R
291. Kusmartsev S, Cheng F, Yu B, et al. All-trans-retinoic acid eliminates immature myeloid cells from tumor-bearing mice and improves the effect of vaccination. *Cancer Res.* 2003;63(15):4441-4449.
292. Youn J-I, Collazo M, Shalova IN, Biswas SK, Gabrilovich DI. Characterization of the nature of granulocytic myeloid-derived suppressor cells in tumor-bearing mice. *J Leukoc Biol.* 2012;91(1):167-181. doi:10.1189/jlb.0311177
293. Fingerle G, Pforte A, Passlick B, Blumenstein M, Strobel M, Ziegler-Heitbrock HWL. The novel subset of CD14+/CD16+ blood monocytes is expanded in sepsis patients. *Blood.* 1993;82(10):3170-3176. doi:7693040
294. Biswas SK, Lopez-Collazo E. Endotoxin tolerance: new mechanisms, molecules and clinical significance. *Trends Immunol.* 2009;30(10):475-487. doi:10.1016/j.it.2009.07.009
295. Porta C, Rimoldi M, Raes G, et al. Tolerance and M2 (alternative) macrophage polarization are related processes orchestrated by p50 nuclear factor kappaB. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2009;106(35):14978-14983. doi:10.1073/pnas.0809784106
296. Pena OM, Pistolic J, Raj D, Fjell CD, Hancock REW. Endotoxin tolerance represents a distinctive state of alternative polarization (M2) in human mononuclear cells. *J Immunol.* 2011;186(12):7243-7254. doi:10.4049/jimmunol.1001952
297. Pillay J, Kamp VM, Van Hoffen E, et al. A subset of neutrophils in human systemic inflammation inhibits T cell responses through Mac-1. *J Clin Invest.* 2012;122(1):327-336. doi:10.1172/JCI57990
298. Bergenfelz C, Larsson A-M, von Stedingk K, et al. Systemic Monocytic-MDSCs Are

- Generated from Monocytes and Correlate with Disease Progression in Breast Cancer Patients. *PLoS One*. 2015;10(5):e0127028. doi:10.1371/journal.pone.0127028
299. Xu P, Lou J-S, Ren Y, Miao C-H, Deng X. Gene expression profiling reveals the defining features of monocytes from septic patients with compensatory anti-inflammatory response syndrome. *J Infect*. 2012;65(5):380-391. doi:10.1016/j.jinf.2012.08.001
300. Mages J, Dietrich H, Lang R. A genome-wide analysis of LPS tolerance in macrophages. *Immunobiology*. 2007;212(9-10):723-737. doi:10.1016/j.imbio.2007.09.015
301. Zhao L, Shao Q, Zhang Y, et al. Human monocytes undergo functional re-programming during differentiation to dendritic cell mediated by human extravillous trophoblasts. *Sci Rep*. 2016;6:20409. doi:10.1038/srep20409
302. Shalova IN, Lim JY, Chittezhath M, et al. Human monocytes undergo functional re-programming during sepsis mediated by hypoxia-inducible factor-1 α . *Immunity*. 2015;42(3):484-498. doi:10.1016/j.immuni.2015.02.001
303. van Ton AMP, Kox M, Abdo WF, Pickkers P. Precision immunotherapy for sepsis. *Front Immunol*. 2018;9(SEP). doi:10.3389/fimmu.2018.01926
304. Venet F, Rimmelé T, Monneret G. Management of Sepsis-Induced Immunosuppression. *Crit Care Clin*. 2018;34(1):97-106. doi:10.1016/j.ccc.2017.08.007
305. Davies R, O'Dea K, Gordon A. Immune therapy in sepsis: Are we ready to try again? *J Intensive Care Soc*. April 2018:175114371876540. doi:10.1177/1751143718765407