

ENDOKANABINOIDI ANANDAMID I 2- ARAHIDONOILGLICEROL KAO ČIMBENICI RIZIKA ZA ISHOD SEPSE

Šahinović, Ines

Doctoral thesis / Disertacija

2023

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **Josip Juraj Strossmayer University of Osijek, Faculty of Medicine Osijek / Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Medicinski fakultet Osijek**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:152:181882>

Rights / Prava: [In copyright](#) / [Zaštićeno autorskim pravom.](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2024-09-06**



Repository / Repozitorij:

[Repository of the Faculty of Medicine Osijek](#)



SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU

MEDICINSKI FAKULTET OSIJEK

Ines Šahinović

ENDOKANABINOIDI ANANDAMID I 2-ARAHIDONOILGLICEROL KAO ČIMBENICI
RIZIKA ZA ISHOD SEPSE

Doktorska disertacija

Osijek, 2023.

SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU

MEDICINSKI FAKULTET OSIJEK

Ines Šahinović

ENDOKANABINOIDI ANANDAMID I 2-ARAHIDONOILGLICEROL KAO ČIMBENICI
RIZIKA ZA ISHOD SEPSE

Doktorska disertacija

Osijek, 2023.

Mentor rada: doc.dr.sc. Sanja Mandić, mag.med.biochem., spec.med.biochem.

Komentor rada: doc.dr.sc. Vatroslav Šerić, mag.med.biochem., spec.med.biochem.

Rad ima: 102 stranice

PREDGOVOR

Iako se ovaj put često činio nemogućim, imao i trnja, a ne samo ruža, ne bi došao do svog kraja bez pomoći meni dragih i posebnih ljudi.

Od srca zahvaljujem svojoj mentorici, doc.dr.sc. Sanji Mandić, na svim savjetima, ohrabrenjima, neizmjerne podršci te dostupnosti i uloženom vremenu kada god mi je bilo potrebno.

Zahvaljujem se i komentoru, doc.dr.sc. Vatroslavu Šeriću, na motivaciji i svojoj pomoći pri izradi ovog istraživanja.

Hvala prof.dr.sc. Ljiljani Perić i svim djelatnicima Klinike za infektologiju te Zlatku Majiću, dr.med., i svim djelatnicima Zavoda za pulmologiju i intenzivno liječenje internističkih pacijenata Klinike za unutarnje bolesti. Posebno hvala dr.sc. Damiru Mihiću i Domagoju Loinjaku na suradnji i pomoći.

Veliko hvala mr.sc. Mirjani Fijačko i Jasni Pavela, kao i svim djelatnicima Odjela za imunološku i alergološku dijagnostiku Kliničkog zavoda za laboratorijsku dijagnostiku, za svu podršku i razumijevanje tijekom izrade ove disertacije.

Zahvaljujem svojoj obitelji na beskrajnoj podršci i ljubavi. Hvala na razumijevanju za moje izbivanje i bezuvjetnoj potpori. Zahvalna sam što vas imam. Posebno hvala mojoj majci Mariji i mome ocu koji bi bio ponosan da je još ovdje s nama.

Na posljetku, zahvaljujem se dragom Bogu uz riječi velikog umjetnika Michelangela Buonarroti koje su mi često bile inspiracija:

„Many believe – and I believe – that I have been designated for this work by God. In spite of all, I do not want to give it up. I work out of love for God and I put all my hope in Him.“

Posvećeno mojim roditeljima i svim mojim profesorima

SADRŽAJ

1. UVOD.....	1
1.1. DEFINICIJA SEPSE	1
1.1.1. Promjene kriterija za dijagnozu sepse	1
1.2. PATOFIZIOLOGIJA SEPSE I SEPTIČNOG ŠOKA.....	4
1.2.1. Proupalna faza sepse.....	4
1.2.2. Imunosupresivna faza sepse	6
1.2.3. Septični šok	7
1.3. UPOTREBA VAZOPRESORA U SEPSI.....	9
1.4. UPOTREBA INVAZIVNE MEHANIČKE VENTILACIJE U SEPSI.....	11
1.5. BIOKEMIJSKI BILJEZI UPALE	13
1.5.1. C-reaktivni protein.....	13
1.5.2. Prokalcitonin.....	14
1.5.3. Interleukin-6	14
1.5.4. Leukociti.....	15
1.6. ENDOKANABINOIDNI SUSTAV	16
1.6.1. Endokanabinoidi.....	16
1.6.2. Kanabinoidni receptori	18
1.6.3. Endokanabinoidi u sepsi.....	20
2. HIPOTEZA	22
3. CILJEVI.....	23
4. ISPITANICI I METODE.....	24
4.1. USTROJ STUDIJE	24
4.2. ISPITANICI	24
4.3. METODE	26
4.3.1. Podatci iz medicinske dokumentacije	26
4.3.2. Određivanje endokanabinoida i interleukina.....	30
4.4. STATISTIČKE METODE	33
5. REZULTATI	35
5.1. OPIS OSNOVNIH ZNAČAJKI ISPITANIKA	35
5.2. ISHOD 1: ISHOD LIJEČENJA OBOLJELIH OD SEPSE	41

5.2.1. Prognozička točnost endokanabinoida u razlikovanju ishoda liječenja sepse i krivulja preživljenja	42
5.2.2. Analiza čimbenika rizika za smrtni ishod sepse	43
5.3. ISHOD 2A: RAZVOJ SEPTIČNOG ŠOKA	46
5.3.1. Prognoza razvoja septičnog šoka	48
5.3.2. Analiza čimbenika rizika za razvoj septičnog šoka	49
5.4. ISHOD 2B: POTREBA ZA INVAZIVNOM MEHANIČKOM VENTILACIJOM	51
5.4.1. Prognoza potrebe za invazivnom mehaničkom ventilacijom	53
5.4.2. Analiza čimbenika rizika za upotrebu invazivne mehaničke ventilacije u liječenju sepse	54
5.5. ISHOD 2C: POTREBA ZA TERAPIJOM VAZOPRESORIMA	58
5.5.1. Prognoza potrebe za vazoaktivnom terapijom u sepsi	60
5.5.2. Analiza čimbenika rizika za upotrebu vazoaktivne potpore u liječenju sepse	62
6. RASPRAVA	66
6.1. OPĆA OBILJEŽJA ISPITANIKA	66
6.2. RAZLIKE BILJEGA MJERENIH PO PRIJEMU I OTPUSTU S LIJEČENJA	67
6.3. ISHOD 1: ISHOD LIJEČENJA OBOLJELIH OD SEPSE	68
6.4. ISHOD 2A: RAZVOJ SEPTIČNOG ŠOKA	71
6.5. ISHOD 2B: POTREBA ZA INVAZIVNOM MEHANIČKOM VENTILACIJOM	73
6.6. ISHOD 2C: POTREBA ZA TERAPIJOM VAZOPRESORIMA	76
6.7. OGRANIČENJA I PRIJEDLOZI BUDUĆIH ISTRAŽIVANJA	78
7. ZAKLJUČCI	81
8. SAŽETAK	82
9. SUMMARY	83
10. LITERATURA	85
11. ŽIVOTOPIS	99

POPIS KRATICA

2-AG – 2-arahidonoilglicerol

aPTV – aktivirano parcijalno tromboplastinsko vrijeme

AraG – N-arahidonoilglicin

AraS – N-arahidonoilserin

ARDS – akutni respiratorni distress sindrom (engl. *Acute Respiratory Distress Syndrom*)

AUC – površina ispod krivulje prognostičke točnosti (engl. *Area Under the Curve*)

AVP – arginin vazopresin

BSA – goveđi serumski albumin (engl. *Bovine Serum Albumin*)

CB1R – kanabinoidni receptor 1 (engl. *Cannabinoid receptor 1*)

CB2R – kanabinoidni receptor 2 (engl. *Cannabinoid receptor 2*)

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

COX-2 – ciklooksigenaza-2 (engl. *Cyclooxygenase-2*)

CRP – C-reaktivni protein

DAG – diacilglicerol

DAGL – diacilglicerol lipaza

DAMP – molekularni obrasci oštećenog tkiva (engl. *Damage-associated molecular pattern*)

DIK – diseminirana intravaskularna koagulopatija

ECS – endokanabinoidni sustav (engl. *Endocannabinoid System*)

EDTA – etilendiaminotetraoctena kiselina

FAAH – hidrolaza amida masnih kiselina (engl. *Fatty Acid Amide Hydrolase*)

FABP1 - protein-1 koji veže masne kiseline (engl. *Fatty acid-binding protein 1*)

GCS – Glasgowska skala kome (engl. *Glasgow coma scale*)

GPC – obitelj receptora vezanih s G-proteinima (engl. *G-protein coupled receptor*)

GPR – Orphan receptori vezani s G-proteinima (engl. *Orphan G protein-coupled receptor*)

Hsp70 - protein toplinskog šoka 70 (engl. *Heat shock protein 70*)

IL – interleukin

IMV – invazivna mehanička ventilacija

IFN- γ – interferon γ

JIL – jedinica intenzivnog liječenja

LOX – lipooksigenaza (engl. *Lipoxygenase*)

MCHC – srednja stanična koncentracija hemoglobina u eritrocitima (engl. *Mean Cellular Hemoglobin Concentration*)

miRNA – mikro ribonukleinska kiselina (engl. *micro Ribonucleic Acid*)

MODS – višestruko zatajenje organa (engl. *Multiple Organ Dysfunction Syndrom*).

MRSA - meticilin-rezistentni *Staphylococcus aureus*

NAE – N-acetilamini

NAPE – N-acil-fosfatidil-etanolamin (engl. *N-acyl-phosphatidil-ethanolamine*)

NAPE-PLD - N-acil-fosfatidil-etanolamin specifična fosfolipaza D (engl. *N-acyl-phosphatidil-ethanolamine specific phospholipase D*)

NO – dušikov (II) oksid

NOS – sintaza dušikovog (II) oksida (engl. *Nitro-oxid synthasis*)

OEA - oleiletanolamid

PAMP - molekularni obrasci patogena (engl. *Pathogen-associated Molecular Patterns*)

PBS – fosfatni pufer (engl. *Phosphate Buffered Saline*)

PCT - prokalcitonin

PEA - palmitoiletanolamid

PMX - polimiksin

PPAR α – receptor α aktiviran proliferatorima peroksisoma (engl. *Peroxisome proliferator-activated receptor α*)

PV – protrombinsko vrijeme

RNS – reaktivni dušikovi spojevi (engl. *Reactive Nitrogen Species*)

ROS – reaktivni kiskovi spojevi (engl. *Reactive Oxygen Species*)

qSOFA - brzi sustav bodovanja zatajenja organa (engl. *quick Sequential Organ Failure Assessment*)

SIRS - sindrom sistemskog upalnog odgovora (engl. *Systemic Inflammatory Response Syndrome*)

sO₂ – saturacija hemoglobina kisikom

SOFA - sustav bodovanja zatajenja organa (engl. *Sequential Organ Failure Assessment*)

SŽS – središnji živčani sustav

TF – tkivni čimbenik (engl. *Tissue Factor*)

TGF- β – transformirajući čimbenik rasta β (engl. *Transforming Growth Factor- β*)

THC - Δ^9 -tetrahidrokanabinol (engl. *Δ^9 -tetrahydrocannabinol*)

TMB - 3,3',5,5'-tetrametilbenzidin

TNF- α – čimbenik nekroze tumora (engl. *Tumor Necrosis Factor α*)

Treg – regulatorni limfociti T

TRPV1 – vaniloidni receptori (engl. *Transient receptor potential vanilloid 1 channel*)

POPIS TABLICA

Tablica 1.1.	Promjene kriterija za definiciju sepse i septičnog šoka	2
Tablica 1.2.	Raspodjela adrenergičkih receptora u organizmu i učinci njihove stimulacije	10
Tablica 1.3.	Načini izvedbe invazivne mehaničke ventilacije	12
Tablica 4.1.	Izračun qSOFA sustava bodovanja	27
Tablica 4.2.	Izračun SOFA sustava bodovanja	27
Tablica 4.3.	Vrednovanje stanja svijesti prema Glasgowskoj skali kome (GCS)	28
Tablica 4.4.	Metode određivanja parametara acidobaznog statusa	28
Tablica 4.5.	Metode određivanja biokemijskih parametara	29
Tablica 4.6.	Metode određivanja koagulacijskih parametara	30
Tablica 5.1.	Simptomi težine upalnog stanja mjereni po prijemu na liječenje	36
Tablica 5.2.	Pridružene bolesti u skupinama preživjelih i preminulih ispitanika oboljelih od sepse	37
Tablica 5.3.	Razlike u koncentraciji parametara mjerenih u krvi ispitanika oboljelih od sepse s ishodom preživljenja po prijemu i po otpustu s liječenja.....	38
Tablica 5.4.	Povezanost endokanabinoida, proupalnih i protuupalnih biljega po prijemu na liječenje ispitanika s ishodom preživljenja	39
Tablica 5.5.	Povezanost endokanabinoida, proupalnih i protuupalnih biljega po otpustu s liječenja ispitanika s ishodom preživljenja	39
Tablica 5.6.	Osnovne značajke ispitanika oboljelih od sepse s obzirom na ishod liječenja	41
Tablica 5.7.	Povezanost endokanabinoida, proupalnih i protuupalnih biljega ispitanika u smrtnom ishodu liječenja sepse	42
Tablica 5.8.	Analiza ranih čimbenika rizika za 28-dnevno preživljenje oboljelih od sepse	45
Tablica 5.9.	Osnovna obilježja ispitanika oboljelih od sepse koji su razvili septični šok	47
Tablica 5.10.	Prognostička točnost endokanabinoida anandamida i 2-AG, proupalnih i protuupalnih biljega u ranom razlikovanju septičnih ispitanika koji će razviti septični šok	49
Tablica 5.11.	Analiza ranih čimbenika rizika za razvoj septičnog šoka	50
Tablica 5.12.	Osnovne značajke ispitanika oboljelih od sepse s obzirom na potrebu za invazivnom mehaničkom ventilacijom	52

Tablica 5.13.	Povezanost koncentracije endokanabinoida, proupalnih i protuupalnih biljega po prijemu ispitanika koji tijekom liječenja nisu trebali invazivnu mehaničku ventilaciju	53
Tablica 5.14.	Prognostička točnost endokanabinoida i biljega upale u razlikovanju potrebe za uvođenjem IMV u liječenje oboljelih od sepse	54
Tablica 5.15.	Analiza ranih čimbenika rizika za potrebu uvođenja invazivne mehaničke ventilacije bolesnicima oboljelim od sepse	55
Tablica 5.16.	Vrijednost modela logističke regresijske analize u razlikovanju potrebe za invazivnom mehaničkom ventilacijom oboljelih od sepse	57
Tablica 5.17.	Osnovne značajke ispitanika oboljelih od sepse ovisno o potrebi za vazoaktivnom terapijom	59
Tablica 5.18.	Prognostička točnost endokanabinoida, proupalnih i protuupalnih biljega u razlikovanju pacijenata sa i bez potrebe za vazoaktivnom terapijom u liječenju sepse	62
Tablica 5.19.	Analiza ranih čimbenika rizika za potrebom uvođenja vazoaktivne potpore u liječenje oboljelih od sepse.....	63
Tablica 5.20.	Vrijednost modela logističke regresijske analize u razlikovanju potrebe za uvođenjem vazoaktivne potpore oboljelima od sepse	65

POPIS SLIKA

Slika 1.1.	Promjene na endotelu krvnih žila u upali	5
Slika 1.2.	Razvoj imunosupresivne faze sepse	6
Slika 1.3.	Struktura endokanabinoida anandamida i 2-arahidonoilglicerola.....	17
Slika 1.4.	Rasprostranjenost kanabinoidnih receptora u organizmu	19
Slika 4.1.	Algoritam uključenja ispitanika u istraživanje	25
Slika 5.1.	Patogeni izolirani iz tjelesnih tekućina ispitanika oboljelih od sepse	36
Slika 5.2.	Povezanost endokanabinoida anandamida i 2-AG prema ishodu liječenja	40
Slika 5.3.	Rezultati analize krivulje osjetljivosti prediktivne vrijednosti anandamida u prognozi smrtnog ishoda oboljelih od sepse	43
Slika 5.4.	Krivulja 28-dnevnog preživljenja tijekom hospitalizacije oboljelih od sepse prema graničnoj vrijednosti endokanabinoida anandamida >7.16 µg/L	44
Slika 5.5.	Povezanost endokanabinoida anandamida i 2-arahidonoilglicerola u skupini sa septičnim šokom (A) i skupini ispitanika bez septičnog šoka (B)	48
Slika 5.6.	Povezanost endokanabinoida anandamida i 2-arahidonoilglicerola ovisno o ishodu potrebe invazivne mehaničke ventilacije	53
Slika 5.7.	Rezultati analize krivulje osjetljivosti prognostičke točnosti regresijskog modela A u razlikovanju oboljelih od sepse koji su trebali invazivnu mehaničku ventilaciju	57
Slika 5.8.	Povezanost endokanabinoida anandamida i 2-arahidonoilglicerola ovisno o potrebi za vazoaktivnom terapijom	60
Slika 5.9.	Rezultati analize krivulje osjetljivosti endokanabinoida anandamida (A) i 2-arahidonoilglicerola (B) te biljega upale interleukina-6 (C) i interleukina-10 (D) u razlikovanju potrebe za vazoaktivnom potporom u liječenju hipotenzije u sepsi	61
Slika 5.10.	Rezultati analize krivulje osjetljivosti prognostičke točnosti regresijskog modela A u razlikovanju oboljelih od sepse koji su trebali vazoaktivnu terapiju	64

1. UVOD

1.1. Definicija sepse

Korijen riječi sepsa potječe od grčke riječi *sepo*, što znači propadati ili truniti. U medicinskom kontekstu sepsa se prvi puta spominje u pjesmama grčkog pjesnika Homera prije 2700 godina te kasnije u radovima Hipokrata i Galena (1). Prema Trećem međunarodnom sporazumu o definiciji sepse i septičnog šoka (Sepsis-3) iz 2016. godine, sepsa je definirana kao po život opasan poremećaj funkcije organa, nastao zbog nekontroliranog odgovora organizma na infekciju.

Svjetska zdravstvena organizacija prepoznala je sepsu kao globalni zdravstveni prioritet upravo zbog velike stope smrtnosti oboljelih i nedostatka specifične i ciljane terapije (2). Iako je danas mnogo toga poznato o mehanizmu razvoja i napredovanja sepse, incidencija ove bolesti je u porastu. Procjenjuje se da godišnje od sepse oboli 49 milijuna ljudi u svijetu, a 11 milijuna smrti povezuje se sa sepsom, što čini oko 20% svih smrti u svijetu (3-4). Glavni uzroci povećane incidencije sepse su porast otpornosti mikroorganizama na antibiotike i sve veća starost populacije s popratnim kroničnim bolestima i terapijama.

Najčešći uzrok sepse su bakterijske infekcije, međutim pozitivna hemokultura može se naći tek kod 15-30% oboljelih od sepse (5). Najveći rizik za razvoj infekcije je u sustavima organa koji su izloženi okolini poput dišnog, mokraćnog i gastrointestinalnog sustava.

1.1.1. Promjene kriterija za dijagnozu sepse

Iako je sepsa jasno prepoznata kao globalni problem i veliki je broj istraživanja s ciljem boljeg razumijevanja patofiziologije sepse, ova je složena bolest i dalje izazov. Dugo se razumijevanje sepse temeljilo samo na pretjeranom odgovoru organizma na upalu, ali danas se zna da se radi o mnogo složenijem poremećaju, koji je rezultat intenzivnog upalnog odgovora i imunosupresije te nemogućnosti ponovne uspostave njihove ravnoteže. Kriteriji za potvrdu dijagnoze sepse mijenjali su se u zadnjih 30 godina (tablica 1.1).

Tablica 1.1. Promjene kriterija za definiciju sepse i septičnog šoka

Sepsis-1 (1991) (6)	Sepsis-2 (2001) (7)	Sepsis-3 (2016) (8)
<p>SIRS kriteriji: Temperatura $>38^{\circ}\text{C}$ / $<36^{\circ}\text{C}$ Otkucaji srca > 90 otk/min Brzina disanja >20 udaha/min ili $\text{pCO}_2 < 32$ mmHg Leukociti $>12 \times 10^9/\text{L}$ / $<4 \times 10^9/\text{L}$</p> <p>Sepsa</p> <p>Kriterij dijagnoze: - pozitivna dva ili više SIRS kriterija.</p> <p>Teška sepsa</p> <p>Kriterij dijagnoze: - sepsa kod koje se javlja poremećaj funkcije organa, hipoperfuzija ili hipotenzija. Hipoperfuzija može uključivati, iako nije obavezan kriterij, laktacidozu, oliguriju ili akutnu promjenu mentalnog stanja.</p> <p>Septični šok</p> <p>Kriterij dijagnoze: - teška sepsa sa hipotenzijom koja ne reagira na nadomjestak tekućine i vazoaktivnu terapiju.</p>	<p>Dijagnoza sepse se postavlja ukoliko je dokazana ili se sumnja na infekciju te je zadovoljen neki od slijedećih proširenih SIRS kriterija:</p> <p>Klinički biljezi: Temperatura $>38^{\circ}\text{C}/<36^{\circ}\text{C}$ Otkucaji srca > 90 otk/min / $>2\text{SD}$ iznad normalne vrijednosti za dob Brzina disanja >30 udaha/min Promijenjeno mentalno stanje Edemi</p> <p>Upalni biljezi: Leukociti $>12 \times 10^9/\text{L}$ / $<4 \times 10^9/\text{L}$ / normalan broj leukocita $s >10\%$ nezrelih stanica CRP $>2\text{SD}$ iznad normalne vrijednosti PCT $>2\text{SD}$ iznad normalne vrijednosti</p> <p>Hemodinamski biljezi: Hipotenzija (sistolički tlak <90 mmHg, MAP <70 mmHg ili pad sistoličkog tlaka za >40 mmHg) Srčani indeks $>3,5 \text{ min}^{-1}\text{m}^{-2}$ Arterijska hipoksija $\text{PaO}_2/\text{FiO}_2 <300$ Akutna oligurija $<0,5 \text{ mL/kg h}$ Kreatinin $\geq 44 \mu\text{mol/L}$ Poremećaj zgrušavanja krvi PV-INR $>1,5$ ili aPTV >60 sec Ileus Trombocitopenija $<100 \times 10^9/\text{L}$ Hiperbilirubinemija $>70 \mu\text{mol/L}$</p> <p>Biljezi perfuzije tkiva: Laktat $> 3 \text{ mmol/L}$ Smanjeno kapilarno punjenje</p>	<p>Rano prepoznavanje sepse</p> <p>Pozitivan qSOFA – rizik da bolesnik kod kojeg je postavljena sumnja ima infekciju i veći rizik za razvoj sepse i smrtni ishod</p> <p>qSOFA kriteriji: - promijenjeni mentalni status (GCS < 15) - sistolički krvni tlak <100 mmHg - broj udaha $> 22/\text{min}$</p> <p>Sepsa</p> <p>Klinički kriteriji: - sumnja ili dokaz infekcije; - akutni porast SOFA sustava bodovanja ≥ 2</p> <p>Septični šok</p> <p>Klinički kriteriji: Sepsa s tvrdokornom hipotenzijom koja zahtjeva upotrebu terapije vazopresorima da bi MAP ≥ 65 mmHg i laktat >2 mmol/L uz odgovarajući nadomjestak tekućine.</p>

Kratice: SIRS, sindrom sistemskog upalnog odgovora; pCO_2 , parcijalni tlak ugljičnog monoksida u arterijskoj krvi; CRP, C-reaktivni protein; PCT, prokalcitonin; MAP, srednji arterijski tlak; $\text{PaO}_2/\text{FiO}_2$, omjer parcijalnog tlaka kisika i udjela kisika u udahnutoj smjesi plinova kod potpomognutog disanja; PV-INR, protrombinsko vrijeme izraženo kao internacionalni normalizirani omjer; aPTV, aktivirano parcijalno tromboplastinsko vrijeme, qSOFA ljestvica (engl. *quick Sequential Organ Failure Assessment*); SOFA ljestvica (engl. *Sequential Organ Failure Assessment*)

Prema prvoj definiciji iz 1991. godine, sepsa je definirana kao prisutnost dvaju ili više kriterija sindroma sistemskog upalnog odgovora (engl. *Systemic Inflammatory Response Syndrome, SIRS*), uz potvrdu ili sumnju na infekciju. U slučaju poremećaja funkcije više organa te prisutnosti smanjene prokrvljenosti i hipotenzije, postavljala se dijagnoza teške sepse. Dijagnoza septičnog šoka postavljala se ukoliko, uz kriterije teške sepse, hipotenzija ne odgovara na nadomjestak tekućine i terapiju vazoaktivnim lijekovima.

2001. godine Sepsis-2 smjernice jasnije su definirale kriterije koji omogućuju prepoznavanje SIRS sindroma. Svakodnevni klinički rad i iskustva pokazala su nedovoljnu specifičnost i osjetljivost SIRS kriterija u prepoznavanju sepse, što je zahtijevalo preispitivanje i promjenu smjernica. Zbog velike osjetljivosti SIRS kriterija, dijelu pacijenata krivo je postavljena dijagnoza sepse (9-10).

Nove smjernice za prepoznavanje sepse objavila je „Kampanja preživljenja sepse“ (engl. *Surviving Sepsis Campaign*), koju je činio tim stručnjaka iz Europe i Sjedinjenih Američkih Država. Za ocjenu poremećaja funkcije organa smjernice preporučaju izračun promjene vrijednosti SOFA sustava bodovanja (engl. *Sequential Organ Failure Assessment*). Promjena od dva i više boda povezuje se s porastom rizika za smrtni ishod od 10%. Ovaj sustav bodovanja prvenstveno je razvijen za procjenu prognoze smrtnog ishoda, ali omogućuje i ocjenu funkcije i oštećenja organa. Pojedinačno se boduje funkcija pluća, jetre i bubrega te funkcija krvožilnog sustava, sustava zgrušavanja krvi i neurološki status bolesnika. Raspon mogućih bodova kreće se od 0 do 24. U jedinicama hitnog prijema za brzo prepoznavanje pacijenata sa sumnjom na infekciju i većim rizikom za razvoj sepse i smrtni ishod, smjernice preporučaju upotrebu qSOFA sustava bodovanja (engl. *quick Sequential Organ Failure Assessment*). qSOFA uključuje samo tri klinička parametra: snižen srednji arterijski tlak, MAP (engl. *Mean arterial pressure*), ubrzano disanje i promjenu neurološkog statusa. Najveći broj bodova je 3. Veliko istraživanje Seymoura i sur. pokazalo je da u populaciji bolesnika s infekcijom primljenih na odjele za hitan prijem, qSOFA ima veću prognostičku vrijednost od SOFA sustava bodovanja (AUC 0.81; 0.80-0.82 za qSOFA te AUC 0.79; 0.78-0.80 za SOFA, $p < 0.001$). Bolesnici sa 2 ili više qSOFA bodova imali su 3-14 puta veći rizik za smrtni ishod (11).

1.2. Patofiziologija sepse i septičnog šoka

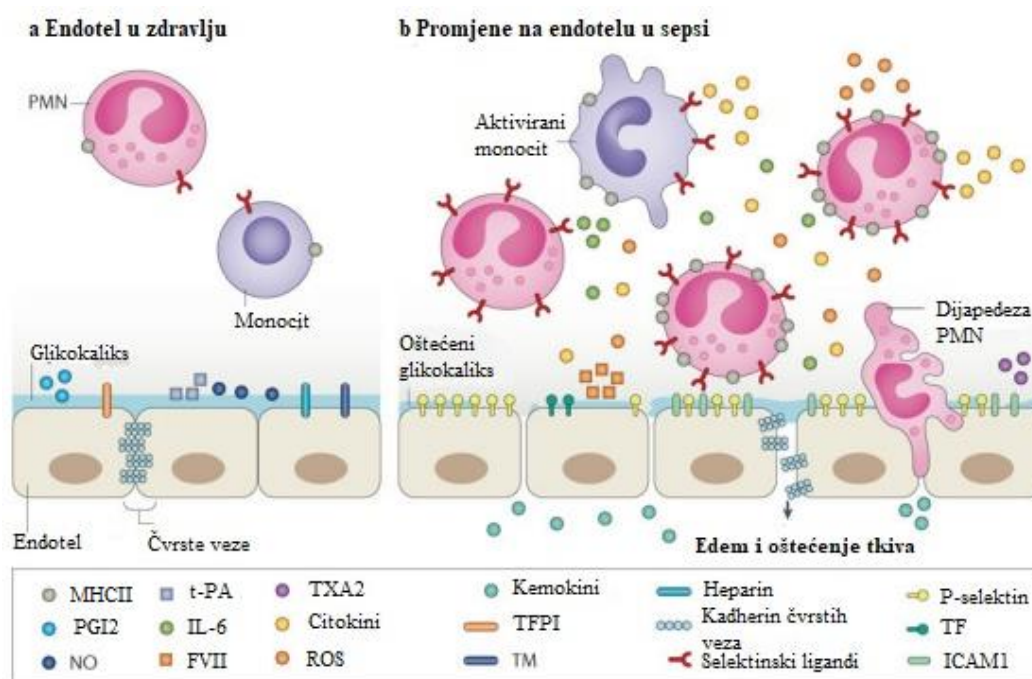
Nakon prolaska sluznica i zaštitnih barijera organizma, uzročnik upale se prvo susreće sa stanicama urođene imunosti poput leukocita, makrofaga i dendritičkih stanica. Njihova je glavna zadaća lokalna zaštita od prodora neželjenih uzročnika infekcije. U većini slučajeva usklađena aktivacija stanica urođene imunosti, sustava zgrušavanja krvi i kontrole upalnog procesa lokaliziraju upalu i uklanjaju patogen iz organizma. Ovakav kontrolirano aktiviran upalni odgovor sprječava oštećenje tkiva i omogućuje brzo uspostavljanje homeostaze, nakon uklanjanja patogenog uzročnika.

Međutim, zbog oslabljene ili neusklađene reakcije urođenog imunološkog sustava, patogen se nastavlja razmnožavati uzrokujući značajno oštećenje tkiva i daljnju aktivaciju proupalnih stanica. Oštećenjem endotela krvnih žila, uzročnik infekcije prodire u krvotok, što upalni proces čini sustavnim. Nekontrolirani sustavni upalni proces postaje opasan i štetan za organizam i razvija se stanje sepse. Sepsa je karakterizirana početnom intenzivnom proupalnom fazom čiji je cilj ukloniti uzročnika upale. Pretjerana aktivacija proupalnih stanica, bez istovremene ravnotežne aktivacije kontrolnih mehanizama, nadjačava mehanizme popravka i oporavka. Kako se iscrpljuju proupalni elementi imunološkog sustava, jača njegov imunosupresivni učinak. Faza imunosupresije utišava upalu, međutim, ukoliko uzročnik infekcije nije uklonjen i oštećenje tkiva je opsežno, dolazi do istovremenog zatajenja funkcije više organa. Mehanizmi oporavka i zacjeljenja oštećenog tkiva nemoćni su osigurati oporavak te imunosupresivna faza sepse često završava smrtnim ishodom (12).

1.2.1. Proupalna faza sepse

U proupalnoj fazi sepse aktivira se veliki broj proupalnih stanica. Molekularni obrasci s površine patogena, PAMP (engl. *Pathogen Associated Molecular Patterns*) i iz oštećenog tkiva, DAMP (engl. *Damage-associated molecular pattern*) aktiviraju površinske i unutarstanične receptore na aktiviranim proupalnim stanicama (13). Nakon aktivacije receptora pokreću se unutarstanični signalni putovi koji rezultiraju premještanjem transkripcijskih čimbenika u jezgru, aktivacijom gena ključnih za pokretanje upalnog procesa i oslobađanje proupalnih citokina poput interleukina-1 β , IL-1 β , interleukina-6, IL-6, čimbenika nekroze tumora α , TNF- α i interferona. Aktivacija proupalnih stanica urođenog imunološkog sustava i oslobođeni citokini pokreću istovremenu aktivaciju sustava kompleksa komplementa, endotelnih stanica krvnih žila i sustava zgrušavanja krvi.

Poremećaj cjelovitosti i funkcije endotelnih stanica ključan je trenutak u patofiziogenezi sepse. Promjena citoskeleta omogućuje aktiviranim leukocitima da procesom dijapedeze prođu između endotelnih stanica u tkiva na mjesto razvoja upale (14). Sami leukociti i trombociti, razgrađene veze između endotelnih stanica, oslobođeni proupalni medijatori i reaktivni kisikovi spojevi, ROS, oštećuju cjelovitost endotelne barijere. U izvanstanični prostor se gube intravaskularni proteini i plazma što uzrokuje edem tkiva (slika 1.1). Oštećenje endotela krvnih žila procesom upale rezultira izlaganjem tkivnog čimbenika, TF, koji je glavni pokretač sustava zgrušavanja. Oslobođeni TF pokreće kaskadnu reakciju aktivacije čimbenika zgrušavanja koji



Slika 1.1. Promjene na endotelu krvnih žila u upali

(prilagođeno prema Hotchkiss i sur. (12))

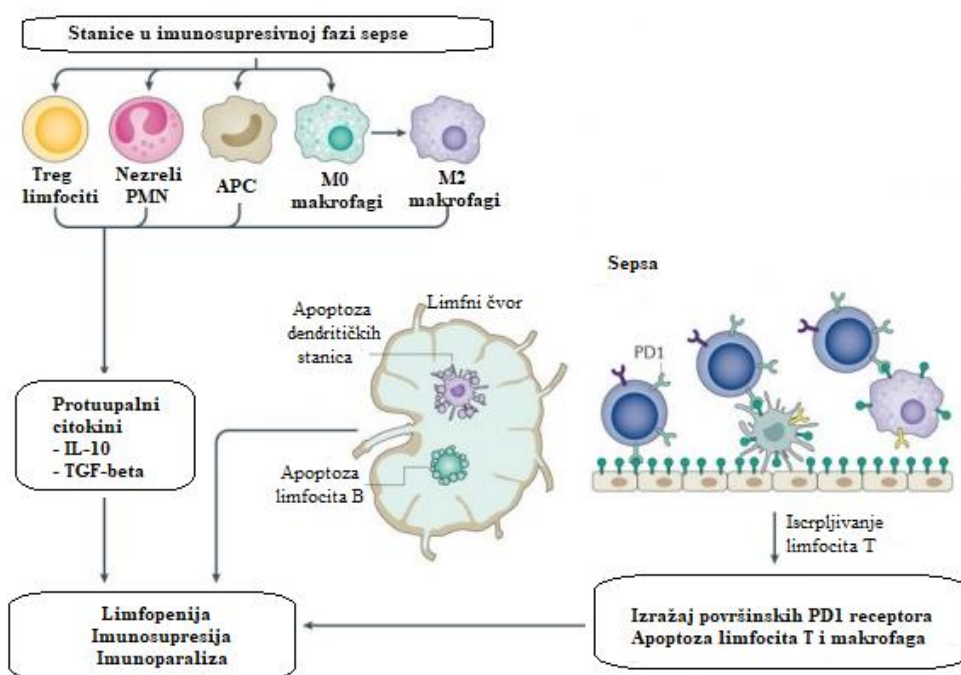
a Endotel krvnih žila u zdravlju je antikoagulantna površina. Cjelovitost endotelnoj barijeri omogućuje površinski glikokaliks i čvrste veze (engl. *Tight junctions*) između endotelnih stanica. **b** U sepsi dolazi do promjena koje endotel čine prokoagulantnom površinom. Citokini oslobođeni iz aktiviranih upalnih stanica pojačavaju upalnu reakciju tako što potiču izražaj adhezijskih molekula (ICAM) i selektina te potiču oslobađanje sadržaja granula neutrofila i oslobađanje ROS. Iz granula neutrofilnih granulocita oslobađaju se enzimi metaloproteaze koje razgrađuju čvrste veze i omogućuju leukocitima da procesom dijapedeze prođu između endotelnih stanica u tkiva. Na ovaj način oštećuje se endotelna barijera i iz vaskularnog odjeljka gubi se tekućina što uzrokuje edem tkiva. Proupalni citokini i oštećenje endotela uzrokuju izlaganje tkivnog čimbenika, TF, na površini endotelnih stanica što aktivira čimbenik zgrušavanja VII i pokreće sustav zgrušavanja krvi. Na mjestu ozljede endotela nastaju mikrougrušci koji blokiraju mikrocirkulaciju organa.

Kratice: ICAM1, adhezijske molekule (engl. *Intercellular Adhesion Molecule*); FVII, čimbenik zgrušavanja VII; IL-6, interleukin-6; MHCII, molekule kompleksa histokompatibilnosti (engl. *Major Histocompatibility Complex*); NO, dušikov(II) oksid; PGI2, prostaglandin I2; ROS, reaktivni kisikovi spojevi (engl. *Reactive Oxygen Species*); TF, tkivni faktor; TFPI, inhibitor puta tkivnog faktora (engl. *Tissue factor Pathway Inhibitor*); TM, trombomodulin; t-PA, tkivni aktivator plazminogena (engl. *tissue Plasminogen Activator*); TXA2, tromboksan A2 (engl. *Tromboxane A2*);

dovode do stvaranja trombina – moćne serinske proteaze koja prevodi veliku količinu fibrinogena u fibrin i stvaraju se mikrougrušci. Nastali mikrougrušci mogu začepiti mikrocirkulaciju organa. Ovi procesi uzrokuju razvoj stanja diseminirane intravaskularne koagulacije (DIK).

1.2.2. Imunosupresivna faza sepse

Ukoliko se ne uspostavi ravnoteža proupalnih i protoupalnih te prokoagulantnih i protukoagulantnih sustava, sepsa ulazi u drugu fazu – fazu imunosupresije. Ova faza sepse karakterizirana je potiskivanjem funkcija urođenog i stečenog imunološkog sustava. U stanju teške sepse i septičnog šoka sustavno aktivirani upalni procesi s vremenom dovode do iscrpljivanja stanica urođene i stečene imunosti i uzrokuju imunoparalizu koja vodi u stanje imunosupresije (slika 1.2).



Slika 1.2. Razvoj imunosupresivne faze sepse

(prilagođeno prema Hotchkiss i sur. (12))

Tijekom proupalne faze sepse dolazi do iscrpljivanja stanica urođene i stečene imunosti i pojačavaju se kompenzatorni imunosupresivni mehanizmi. Pojačano oslobađanje nezrelih neutrofilnih granulocita, reprogramiranje antigen predočnih stanica, APC, i makrofaga u fenotip M2 te aktivacija regulatornih T limfocita rezultira pojačanim oslobađanjem protoupalnih citokina. Na površini limfocita T aktiviraju se proteini koji pokreću apoptozu. U limfnim čvorovima apoptozom propadaju folikularne dendritičke stanice i limfociti B. Imunološki sustav gubi sposobnost uklanjanja patogena i sepsa ulazi u imunosupresivnu fazu. Opća imunoparaliza, uz višestruko zatajenje organa i razvoj diseminirane intravaskularne koagulacije, često vodi u smrtni ishod sepse.

Kratice: APC, antigen predočne stanice (engl. *Antigen Presenting Cells*); IL-10, interleukin-10; TGF-beta, transformirajući faktor rasta-beta (engl. *Transforming Growth Factor-beta*); PMN, polimorfonukleari; PD1, protein 1 programirane smrti (engl. *Programmed Death Protein 1*).

Protuupalni citokini

U imunosupresivnoj fazi sepse pojačava se stvaranje i oslobađanje citokina s imunosupresivnim djelovanjem poput interleukina 4 (IL-4), interleukina 10 (IL-10), interleukina 35 (IL-35) i transformirajućeg čimbenika rasta β (TGF- β) (15).

IL-10, poznat i po nazivu čimbenik inhibicije stvaranja citokina, najznačajniji je citokin s protuupalnim djelovanjem. Stvaranje i oslobađanje ovog citokina u zdravlju je minimalno i zahtjeva poticaj patogenih mikroorganizama. IL-10 je citokin s brojnim i različitim učincima na upalu i regulaciju imunološkog odgovora. Jedna od glavnih značajki u sepsi je sprječavanje stvaranja proupalnih citokina TNF- α , interferona γ (IFN- γ), interleukina 2 (IL-2) i interleukina 3 (IL-3) koje proizvode proupalni makrofagi M1 i T_H1 limfociti. IL-10 potiskuje proupalne funkcije T_H1 limfocita i makrofaga M1 fenotipa te potiče diferencijaciju u T_H2 fenotip i M2 fenotip koji imaju izraženo imunosupresivno i obnavljajuće djelovanje (16). Istraživanja su pokazala da IL-10 potiče sazrijevanje limfocita B i proizvodnju specifičnih protutijela (17).

Protuupalni citokini važna su protuteža proupalnim mehanizmima, međutim, ukoliko uzročnik upale još nije uklonjen, izraženo protuupalno djelovanje može biti pogubno za organizam.

1.2.3. Septični šok

Šok je stanje uzrokovano poremećenom prokrvljenosti tkiva i organa što za posljedicu ima smanjenu isporuku i upotrebu kisika u stanicama te smanjeno uklanjanje međuprodukata metabolizma. Šok je posljednji fatalni događaj u mnogim bolestima (18). Prema Sepsis-3 definiciji septični šok je definiran kao podvrsta sepse sa izraženim poremećajem staničnog metabolizma i cirkulacije koji značajno povećavaju rizik smrtnog ishoda. Smrtnost septičnog šoka doseže i do 40% (19).

Septični šok se prepoznaje po ustrajnoj hipotenziji koja zahtjeva upotrebu vazopresora kako bi se srednji arterijski tlak održao iznad 65 mmHg. Funkciju krvožilnog sustava narušava i razvoj vazodilatacije koja je rezultat oštećenja endotela i pojačanog oslobađanja dušikovog (II) oksida, NO. Smanjena prokrvljenost i produbljenje stanja vazodilatacije utječu na opskrbu tkiva kisikom i hranidbenim tvarima. Kao posljedica ovih zbivanja stanični se metabolizam mijenja iz aerobnog u anaerobni, što se očituje porastom koncentracije laktata.

Razvoj diseminirane intravaskularne koagulacije

Na oštećenom endotelu aktivira se sustav zgrušavanja i nastaju mikrougrušci. Prva faza DIK-a je prokoagulantna faza u kojoj nastali ugrušci uzrokuju ishemiju, poremećenu prokrvljenost i posljedično oštećenje organa. Opsežna aktivacija procesa zgrušavanja krvi uzrokuje potrošnju trombocita i čimbenika zgrušavanja, što pokreće drugu fazu DIK-a - fazu fibrinolize. Faza fibrinolize očituje se trombocitopenijom, znakovima potrošnje čimbenika zgrušavanja te povećanom koncentracijom razgradnih produkata fibrina, D-dimera. Fibrinolitička faza DIK-a ima visoku smrtnost zbog opsežnih krvarenja.

Višestruko zatajenje organa

U septičnom šoku štetan utjecaj nekontrolirane upalne reakcije, hipotenzija i smanjena prokrvljenost uzrokuju višestruko zatajenje organa, MODS (engl. *Multiple Organ Dysfunction Syndrom*). Na smanjenu prokrvljenost i hipotenziju posebno su osjetljivi kapilarni endotel glomerula bubrega, endotel plućnih alveola i jetrenih sinusoida. Nastanak mikrougrušaka i smanjena prokrvljenost bubrežnih krvnih žila uzrokuju nekrozu tubula i akutno bubrežno zatajenje. Oštećeni glomeruli gube funkciju filtracije krvi, što rezultira oligurijom, porastom koncentracije ureje i kreatinina u serumu, ali i zadržavanjem otpadnih metabolita i toksina u organizmu (20).

Povećana propusnost endotela plućnih kapilara uzrokuje premještanje plazme u međualveolarni prostor. Nastali edem pluća onemogućuje normalnu funkciju alveola i izmjenu plinova što uzrokuje stanje akutnog respiratornog distres sindroma, ARDS. Posljedična hipoksija i hiperkapnija dodatno otežavaju kliničko stanje pacijenta i zahtijevaju upotrebu mehanički potpomognute ventilacije.

U septičnom šoku hipotenzija, poremećena prokrvljenost i nastali mikrougrušci, ali i hemoragija u kasnim fazama sepse, utječu na funkciju gastrointestinalnog sustava. U tankom crijevu moguć je razvoj ileusa i submukoznog krvarenja. Poremećen krvotok u jetri uzrokuje hepatocelularnu nekrozu, što se očituje porastom aminotransferaza u serumu, ali i gubitkom metaboličke (povećana koncentracija bilirubina) i sintetske funkcije jetre (smanjena sinteza proteina i čimbenika zgrušavanja).

Hipotenziju i septični šok dodatno produbljuje i depresija funkcije srca. Smanjena prokrvljenost koronarnih arterija, uz izravan kardiotoksični učinak citokina TNF- α i IL-1, smanjuju ejskijsku frakciju i kontraktilnost srčanog mišića (30).

Sepsa je karakterizirana i promjenama neurološkog statusa bolesnika koji je sve izraženiji kako se klinička slika bolesti pogoršava. Razvojem bolesti javlja se letargija, zbunjenost i delirij oboljelih pacijenata.

1.3. Upotreba vazopresora u sepsi

U terapiji sepse i septičnog šoka neophodno je povratiti i održati primjerenu prokrvljenost tkiva. Smanjena prokrvljenost tkiva i vazodilatacija glavne su značajke sepse koja se komplicira u stanje septičnog šoka. Nastala vazodilatacija zahvaća kapilare, venule i arterije te rezultira sustavnom hipotenzijom koja povećava rizik smrtnog ishoda sepse za 40-60% (22). Mehanizmi razvoja vazodilatacije u sepsi obuhvaćaju upalom blokirane mehanizme vazokonstrikcije i pojačanu sintezu i oslobađanje medijatora s vazodilatacijskim učinkom.

Glavni medijator vazodilatacije je NO koji se sintetizira u endotelu krvnih žila, makrofagima, neutrofilima i drugim stanicama. Istraživanja su dokazala da u sepsi, proupalni citokini poput IL-1 i IL-6, aktiviraju enzim koji sintetizira NO, NOS (engl. *Nitro-oxid synthasis*) i uzrokuju sintezu i nagli porast koncentracije NO (23). Da bi se održao zadovoljavajući krvni tlak (MAP \geq 65 mmHg), potrebna je terapija lijekovima koji imaju vazokonstriktivan učinak.

Vazopresori su skupina lijekova sa snažnim i brzim hemodinamskim učincima. Dije se prema mehanizmu djelovanja na one koji ostvaruju i one koji ne ostvaruju adrenergičke učinke. Najčešće korišteni vazopresori u terapiji septičnog šoka su kateholamini (noradrenalin, adrenalin i dopamin) te vazopresin.

Kateholamini se sintetiziraju u postganglijskim završetcima simpatikusa u središnjem živčanom sustavu (SŽS) te u kromatofinim stanicama srži nadbubrežne žlijezde. Kateholamini su simpatomimetici s izravnim djelovanjem na adrenergičke receptore. Poznata su tri tipa adrenergičkih receptora: alfa, α , beta, β i dopaminergički, DA (24). U tablici 1.2. prikazana je raspodjela adrenergičkih receptora u organizmu i učinci njihove stimulacije.

Tablica 1.2. Raspodjela adrenergičkih receptora u organizmu i učinci njihove stimulacije

Adrenergički Receptor	Tip receptora	Mehanizam	Raspodjela	Učinak stimulacije
α_1	Gq protein	Aktivacija fosfolipaze C	Glatki mišići krvnih žila Mokraćni sustav	Vazokonstrikcija
α_2	Gi protein	Blokiranje adenilat ciklaze	Centralni živčani sustav	Smanjena funkcija simpatikusa Pad krvnog tlaka
β_1	Gs protein	Aktivacija protein kinaze C	Srce	Pozitivan inotropni i kronotropni učinak
β_2	Gs protein	Aktivacija adenilat ciklaze	Po cijelom organizmu, posebno glatki mišići bronha	Širenje krvnih žila i bronha Opuštanje mišića maternice, mjehura i probavnog sustava Smanjena agregacija trombocita Glikogenoliza
β_3	Gs protein Gi protein	Aktivacija adenilat ciklaze	Bijelo i smeđe masno tkivo	Lipoliza Potrošnja energije Stvaranje topline u mišićima

Djelovanje koje vazopresori ostvaruju preko α_1 receptora najznačajnije je u ostvarenju vazokonstriktivnog učinka. Noradrenalin i adrenalin snažni su agonisti α_1 receptora. Temeljem randomiziranih kontroliranih pokusa i meta analiza, međunarodne smjernice za liječenje sepse i septičnog šoka iz 2021. preporučuju noradrenalin kao vazopresor izbora u terapiji hipotenzije u septičnom šoku (25).

Adrenalin se preporuča kao vazopresor druge ili treće linije (25). Uz vazokonstriktivan učinak koji ostvaruje djelovanjem na α_1 adrenergičke receptore, adrenalin ostvaruje i snažan inotropni učinak na rad srca preko β_1 receptora. Iako meta analize nisu pokazale prednost udružene terapije noradrenalina i dobutamina u odnosu na monoterapiju adrenalinom (26), zbog značajnog učinka na β_1 receptore terapija adrenalinom se više preporuča kod bolesnika s poremećenom funkcijom u radu srca. Međutim, adrenalin ima značajne nuspojave poput aritmija i povećanja koncentracije laktata u krvi što dodatno otežava kliničko stanje bolesnika sa septičnim šokom.

Dopamin je u prošlosti korišten kao vazopresor prvog izbora u terapiji vazodilatacije u septičnom šoku, međutim novije studije dokazale su veći rizik od aritmija i veću smrtnost u odnosu na noradrenalin (27-28). Upotreba dopamina preporuča se samo u slučaju bolesnika s bradikardijom.

Vazopresor koji ne ostvaruje adrenergički učinak je arginin vazopresin (AVP), poznat i pod nazivom antidiuretski hormon. AVP je peptidni hormon neurohipofize. Vazokonstrikciju i održavanje krvnog tlaka omogućuje preko V_1 receptora koji se nalaze na glatkim mišićima krvnih žila. Istraživanja su pokazala da pad krvnog tlaka za 20% uzrokuje porast koncentracije AVP 30 puta (29). AVP i analozi su vazopresori druge linije jer nema snažnog dokaza o prednostima njihove rane upotrebe na brže postizanje željenog MAP u odnosu na noradrenalin (30). Najnovije smjernice preporučaju uključivanje AVP-a uz terapiju noradrenalinom, ukoliko se monoterapijom noradrenalinom ne može postići zadovoljavajući MAP (31).

1.4. Upotreba invazivne mehaničke ventilacije u sepsi

Mehanička ventilacija jedna je od najčešće korištenih mjera potpore kod kritično bolesnih pacijenata. Randomizirani kontrolirani pokusi i studije zapažanja dokazuju da je sepsa, a posebno septični šok, najčešći uzrok razvoja ARDS-a (32). Sepsom uzrokovan ARDS teška je komplikacija povezana sa značajnom smrtnosti koja u nekim zemljama doseže i do 50% (33). Pacijenti s ARDS-om, kojega je uzrokovala sepsa, imaju izraženiju hipoksiju i poremećaj disanja te manju uspješnost ukidanja mehanički potpomognute ventilacije.

ARDS je heterogeni sindrom i može se razviti različitim mehanizmima. Patologija razvoja uključuje povećanu propusnost endotela plućnih kapilara i alveola. U sepsi je najčešće uzrokovan oštećenjem plućnog tkiva zbog sustavne upalne reakcije. U proupalnoj fazi sepse proupalni citokini i stanice uzrokuju oštećenje alveolarno-kapilarne barijere. Zbog njezine povećane propusnosti upalne stanice i proteinima bogata plazma premještaju se u alveole i uzrokuju njihov otok. Difuzno oštećenje alveola smatra se histološkim obilježjem prve akutne faze ARDS-a. Upala uništava alveolarne epitelne stanice procesima nekroze što uzrokuje gubitak funkcionalne barijere.

Glavni ciljevi potpomognute ventilacije u sepsi i septičnom šoku su:

- Održavanje oksigenacije tkiva i organa
- Optimizacija funkcije krvožilnog sustava
- Smanjenje oštećenja organa zbog sepsom uzrokovane hipoksije

Potpomognuta ventilacija dijeli se na neinvazivnu i invazivnu mehaničku ventilaciju (IMV). Neinvazivna ventilacija koristi se samo kod bolesnika koji dišu spontano. Istraživanja su pokazala da je odgađanje intubacije i uvođenja IMV kod pacijenata s ARDS-om povezano s

većom smrtnosti (34-35). U istraživanju o kriterijima i uvjetima uvođenja IMV kod septičnih bolesnika s ARDS-om, koje je uključivalo 30 zemalja, zaključeno je da je intubaciju potrebno uvesti kod bolesnika s neurološkim (vrijednost Glasgowske skale kome (GCS) < 8, nemir i smetenost) i respiratornim kriterijima (cijanoza, ubrzano disanje, ARDS) (36).

Mehanički ventilatori dijele se na uređaje koji kontroliraju volumen i uređaje koji kontroliraju tlak. Načini izvođenja IMV prikazani su u tablici 1.3.

Tablica 1.3. Načini izvedbe invazivne mehaničke ventilacije

VOLUMNO KONTROLIRANA VENTILACIJA
<p>A/C (engl. <i>Assist-Control Mode</i>)</p> <ul style="list-style-type: none"> • Najjednostavniji oblik mehaničke ventilacije • Pokušaj udisaja bolesnika iznad definiranog praga osjetljivosti pokreće isporuku zadanog volumena kisika • Ukoliko bolesnik ne pokrene proces dovoljno često, uređaj sam preuzima proces disanja <p>SIMV (engl. <i>Synchronized Intermittent Mandatory Ventilation</i>)</p> <ul style="list-style-type: none"> • Uređaj omogućuje udahe definirane učestalosti i volumena koji su vremenski usklađeni s udasima bolesnika
TLAČNO KONTROLIRANA VENTILACIJA
<p>PCV, tlačno kontrolirana ventilacija (engl. <i>Pressure-Control Ventilation</i>)</p> <ul style="list-style-type: none"> • Svakim pokušajem udaha bolesnika koji je veći od definiranog praga osjetljivosti uređaj isporučuje punu tlačnu potporu i automatski održava frekvenciju disanja <p>PSV, tlačno potpomognuta ventilacija (engl. <i>Pressure-Supported Ventilation</i>)</p> <ul style="list-style-type: none"> • Svaki udah potaknut je dišnim pokretima bolesnika • Ova opcija rada obično se primjenjuje kod odvajanja bolesnika od invazivne mehaničke ventilacije <p>CPAP, stalni pozitivni tlak zraka (engl. <i>Continous Positive Airway Pressure</i>)</p> <ul style="list-style-type: none"> • Uređaj isporučuje isti tlak zraka tijekom cijelog dišnog ciklusa

Komplikacije IMV mogu se javiti kao posljedica intubacije (suženje traheje, ozljede glasnica, traheovaskularne fistule, infekcije, sinusitis) te kao posljedica same mehaničke ventilacije (pneumotoraks, hipotenzija, ozljeda pluća izazvana potpomognutom ventilacijom) (37). Najbolji način da se ove komplikacije izbjegnu je podešavanje i ograničenje trajanja IMV.

1.5. Biokemijski biljezi upale

U svakodnevnom kliničkom radu izazov je rano prepoznati trenutak kada infekcija postaje sustavna i imunološki sustav na nju pokreće pretjeranu reakciju. Iako se već desetljećima traga za idealnim biljegom sa zadovoljavajućom dijagnostičkom osjetljivošću i specifičnošću u sepsi, svi do sada poznati biokemijski biljezi nisu u potpunosti zadovoljili željene kriterije. Glavna uloga poznatih biokemijskih biljega je u prognozi teškog oblika sepse i septičnog šoka te neželjenih komplikacija i ishoda bolesti poput:

- smrtnog ishoda sepse
- vremena liječenja u bolnici
- vremena i uspješnosti upotrebe antibiotika.

Smjer promjene koncentracije biokemijskih biljega upale te određivanje graničnih vrijednosti omogućuje pravovremeno donošenje odluke o načinu liječenja i sprječavanju neželjenih ishoda (38-39).

1.5.1. C-reaktivni protein

C-reaktivni protein (CRP) je protein akutne faze upale i važan element urođene imunosti. Sintetizira se u jetri na poticaj proupalnih citokina. Porast koncentracije CRP-a javlja se već za 6h od razvoja upale, a vršnu koncentraciju postiže za 48h. Intenzitet porasta koncentracije CRP-a u krvotoku prati intenzitet upalnog procesa, zbog čega koncentracija ovog proupalnog proteina može porasti i do 100 puta iznad normalne vrijednosti (52). Na mjestu oštećenja tkiva, CRP se veže na razne patogene, posebno bakterije, i procesom opsonizacije olakšava njihovo uklanjanje iz organizma

Iako je najčešće korišten biljeg upale, najveći nedostatak CRP-a je njegova nespecifičnost. Porast CRP-a javit će se u slučaju upale i oštećenja tkiva uzrokovanog bakterijama, gljivicama i virusima, ali i neinfektivnim stanjima poput traume, pankreatitisa, malignih bolesti i slično.

CRP ima važnu ulogu u otkrivanju infekcija koje su anatomski zatvorene i ne mogu se lako dokazati mikrobiološkim metodama. Istraživanja su pokazala da je CRP povezan s težinom kliničkog stanja u sepsi te se praćenjem promjene njegove koncentracije prati odgovor na terapiju antibioticima (41). CRP se pokazao i kao biljeg rizika razvoja teškog oblika sepse i septičnog šoka i potrebe prijema bolesnika u jedinice intenzivnog liječenja (JIL) (42).

1.5.2. Prokalcitonin

U zadnjih 20 godina prokalcitonin (PCT) je najviše istraživani biomarker sepse. U fiziološkim uvjetima PCT se sintetizira u C-stanicama štitnjače kao prohormon kalcitonina. U zdravlju je njegova koncentracija u krvotoku vrlo niska. U bakterijskoj upali i sepsi aktivira se inače neaktivan gen za sintezu PCT-a i u drugim organima i ne-endokrinim stanicama. Sintezu PCT-a izravno potiču cirkulirajući endotoksini bakterija, ali i proupalni citokini poput IL-6 i TNF- α . Koncentracija PCT-a u krvotoku može porasti i do 1000 puta (43). Porast koncentracije PCT-a u bakterijskim infekcijama javlja se već 3-5h od aktivacije upale, a vršnu koncentraciju dostiže za 24-36h. Poluvrijeme života PCT-a u plazmi je 25-35h (40).

Biološka funkcija PCT-a u upali nije još potpuno jasna, ali je dokazano da je povezan s povećanom smrtnosti u sepsi. Najizraženiji porast PCT-a javlja se u bakterijskim infekcijama, sepsi i septičnom šoku. Međutim, kao i kod CRP-a, povećanje koncentracije PCT-a javlja se i u upalama koje nisu uzrokovane bakterijama, poput toplinskog udara, opekline, pankreatitisa i citokinske oluje. U usporedbi s CRP-om, PCT je bolji prognostički pokazatelj težine infekcije i poremećaja funkcije organa (44). Brojna istraživanja pokazala su važnu ulogu PCT-a u praćenju uspješnosti antibiotske terapije i smanjenje nepotrebnog izlaganja pacijenta antibioticima (45-46). PCT je prognostički biljeg smrtnog ishoda. U istraživanju Jaina i sur. pacijenti s vrijednostima PCT >7 $\mu\text{g/L}$ imali su 2.6 puta veći rizik od smrtnog ishoda (47).

1.5.3. Interleukin-6

IL-6 je citokin koji predominantno ostvaruje proupalne učinke, iako je dokazano i njegovo protuupalno djelovanje. Sintetiziraju ga brojne stanice poput makrofaga, monocita, endotelnih stanica, fibroblasta, limfocita T i adipocita. IL-6 je važan rani medijator razvoja upalne reakcije i dio mehanizama urođene imunosti. U upali IL-6 u SŽS potiče sintezu prostaglandina E₂ u hipotalamusu, što uzrokuje porast tjelesne temperature. U jetri IL-6 potiče pojačanu sintezu i oslobađanje reaktanata akutne faze upale. Porast koncentracije IL-6 javlja se već unutar 1-2h od početka upale, što čini IL-6 jednim od najranijih biljega akutne upalne reakcije (48). Međutim, koncentracije IL-6 može porasti i u traumama, srčanom udaru, autoimunim i malignim bolestima te nakon operativnih zahvata, što smanjuje specifičnost IL-6 u dijagnostici sepse.

Kao i ostali poznati biljezi upale, povećana koncentracija IL-6 čimbenik je rizika za razvoj sepse i septičnog šoka, težinu kliničkog stanja, vrijeme boravka u bolnici i reakcije na

terapiju. Novija istraživanja dokazala su prognostičku ulogu IL-6 u predviđanju preživljenja oboljelih od sepse i septičnog šoka unutar 48h od prijema u JIL. Pacijenti koji su razvili septični šok, imali su veće vrijednosti IL-6 u serumu koje su se zadržale kroz duži period praćenja (49).

1.5.4. Leukociti

Leukocitima nazivamo sve stanice u krvi koje imaju jezgru. Ove stanice čine osnovu imunološkog sustava i dio su urođenih i stečenih mehanizama obrane. Glavna funkcija monocita i neutrofila je fagocitoza uzročnika bolesti i oštećenog tkiva. Dodatna važna uloga monocita i makrofaga je predočenje antigena uzročnika bolesti na površini membrane. Takve antigene prepoznaju limfociti T i B koji pokreću reakcije stečene imunosti.

Porast broja leukocita u krvotoku jedan od najstarijih biljega upale. U zdravlju tek mali udio leukocita cirkulira krvlju, a većina je priljubljena uz endotel krvnih žila i uskladištena u koštanoj srži, odnosno limfatičnim tkivima. U upali se brzo oslobađaju u krvotok i odlaze u tkiva. Poluvrijeme života leukocita u krvotoku je tek 6-8h. Kod teške upalne reakcije, kakva je sepsa, leukociti poput neutrofila i monocita brzo odumiru i uklanjaju se iz tkiva.

Prve smjernice iz 1992. uključivale su leukocite u definiciju SIRS-a (Tablica 1.1). Određivanje ukupne koncentracije leukocita je brza, jednostavna i lako dostupna pretraga koja može postaviti sumnju na razvoj upale kod bolesnika. Međutim, ukupna koncentracija leukocita nema dovoljnu specifičnost za postavljanje dijagnoze sepse ili septičnog šoka. Oboljeli od sepse mogu imati normalnu ukupnu koncentraciju leukocita u krvi (62-63).

1.6. Endokanabinoidni sustav

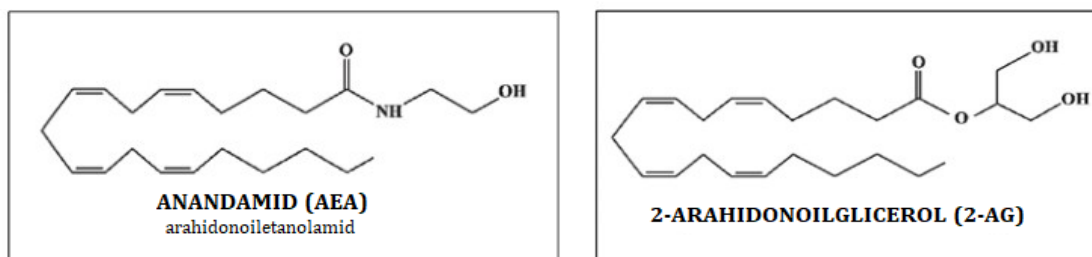
Endokanabinoidni sustav (ECS) je složen, evolutivno konzerviran sustav koji je dokazan i u nižim organizmima poput biljaka, oblića i gljiva (52). Naziv ovog sustava potječe od kanabinoide biljke *Cannabis sativa* čija je upotreba poznata već više od 6000 godina. U staroegipatskoj, kineskoj, indijskoj i srednjoistočnoj kulturi biljka *Cannabis sativa* upotrebljavala se u medicinske svrhe za liječenje zatvora, boli, poremećaja spavanja, malarije i povišene tjelesne temperature. Prije razvoja sintetskih lijekova i zapadna medicina koristila je kanabinoide kao antikonvulzive, antiemetike, analgetike i imunosupresive (53). Iako je djelovanje kanabinoide poznato već tisućljećima, strukture fitokanabinoide, posebno Δ^9 -tetrahidrokanabinola (THC) i kanabidiola (CBD), otkrivene su tek 1960. Budući da su istraživanja strukture fitokanabinoide dokazala njihovu stereospecifičnost (54), bilo je jasno da svoje učinke ostvaruju djelujući na specifične receptore. Krajem '80. i početkom '90. godina prošlog stoljeća otkriveni su receptori koji su nazvani kanabinoidni receptori i njihova prisutnost dokazana je i kod ljudi. Otkriće kanabinoidnih receptora otvorilo je nova znanstvena pitanja: ako u organizmu postoje receptori, koje se endogene molekule vežu na njih i koje su njihove uloge i učinci u zdravlju i bolesti? Već 1992. otkriven je arahidonoiletanolamid, nazvan anandamid, a potom i 2-arahidonoilglicerol (2-AG) (55-56). Otkrićem enzima koji sudjeluju u njihovoj sintezi i razgradnji uspostavljen je ECS, novi sustav u ljudskom organizmu.

ECS čine tri osnovna elementa:

- bioaktivni lipidni medijatori – endokanabinoidi
- proteini i enzimi koji sudjeluju u sintezi, transportu i razgradnji endokanabinoide
- kanabinoidni receptori.

1.6.1. Endokanabinoidi

Anandamid i 2-AG smatraju se glavnim predstavnicima endokanabinoide. Izravni su agonisti kanabinoidnih receptora, najviše istraživani i prvi otkriveni endokanabinoidi. Naziv anandamid dolazi od sanskriptske riječi „*ananda*“ što znači blaženstvo, spokoj, i kemijske strukture amida (52). Anandamid je etanolamid arahidonske kiseline i dio je obitelji N-acetil-etanolamina (NAE). Struktura endokanabinoide prikazana je na slici 1.3.



Slika 1.3. Struktura endokanabinoida anandamida i 2-arahidonoilglicerola
(kreirano u programu ChemSkech)

Sinteza endokanabinoida je strogo regulirana i odvija se tek po potrebi u gotovo svim stanicama organizma. Anandamid se sintetizira iz membranskog fosfolipida N-acil-fosfatidil-etanolamina (NAPE), kao nosioca etanolaminske skupine, i iz arahidonske kiseline. Reakciju sinteze omogućuje citoplazmatski enzim N-acil-fosfatidil-etanolamin specifična fosfolipaza D (NAPE-PLD). Reakcija ne zahtjeva potrošnju energije, ali je ovisna o kalciju. Glavni enzim odgovoran za razgradnju anandamida je serinska hidrolaza amida masnih kiselina, FAAH (engl. *Fatty Acid Amide Hydrolase*). FAAH je enzim vezan na staničnu membranu i membrane staničnih organela. Anandamid se djelovanjem FAAH enzima razgrađuje na etanolamin i arahidonsku kiselinu (57). Anandamid može biti supstrat i citokrom P450 enzimima, ciklooksigenazi-2 (COX-2) i lipooksigenazi (LOX). U upali ovi enzimi oslobađaju iz anandamida arahidonsku kiselinu potrebnu za sintezu prostaglandina i leukotriena (58).

2-AG je drugi otkriveni endokanabinoid, agonist kanabinoidnih receptora. 2-AG je ester arahidonske kiseline i glicerola i najzastupljeniji je endokanabinoid u našem organizmu. U krvotoku je koncentracija 2-AG do 10 puta veća, a u SŽS-u i do 170 puta veća od koncentracije anandamida (59). Opisano je nekoliko biosintetskih putova 2-AG od kojih je najzastupljeniji sinteza 2-AG iz 1,2-diacilglicerola (DAG), koji sadrži dvije molekule arahidonske kiseline. Djelovanjem enzima diacilglicerol lipaze (DAGL), koja specifično hidrolizira arahidonsku kiselinu na poziciji jedan, nastaje 2-AG. Koncentracija 2-AG u SŽS i perifernim tkivima regulira se pomoću nekoliko različitih enzima. Najzastupljeniji je metabolički put razgradnje pomoću serinske hidrolaze monoacilglicerol lipaze (MAGL), kojom se metabolizira oko 85% 2-AG. MAGL hidrolizira 2-AG na arahidonsku kiselinu i glicerol (57). Kao i anandamid, 2-AG se može metabolizirati pomoću COX i LOX oksidaza. Ovaj metabolički put izraženiji je u upali i povezuje sustav prostaglandina i leukotriena sa ECS (58).

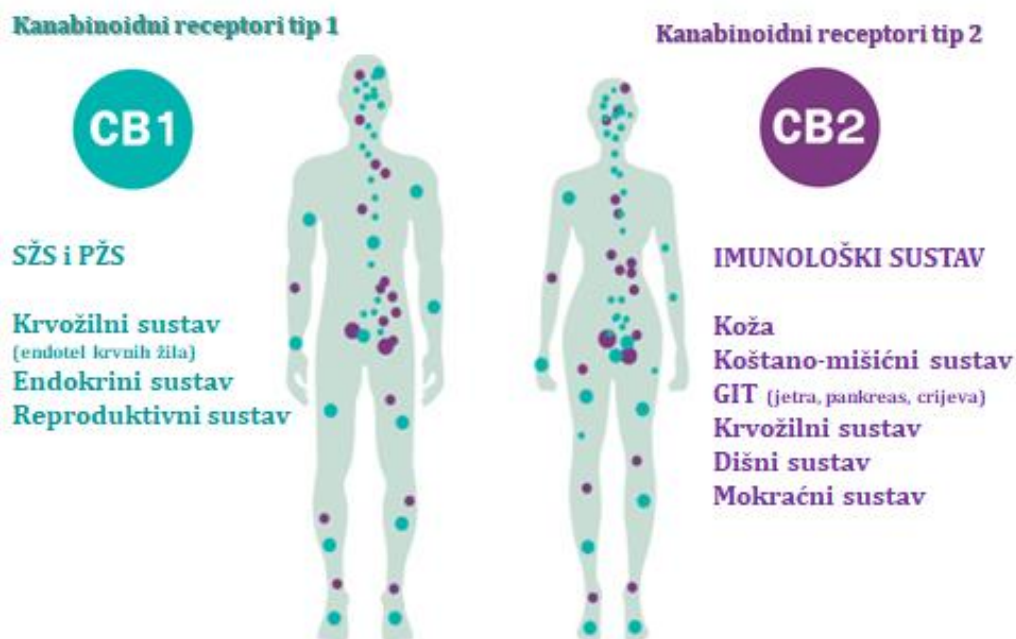
Endokanabinoidi su lipofilne molekule i zahtijevaju posebne prenosioce unutar i između stanica te u krvotoku. S unutarstanične i izvanstanične strane membrane endokanabinoidi se prenose unutar struktura „lipidnih splavi“ (engl. *Lipid rafts*), vežući se na kolesterol i ceramide. Između staničnih odjeljaka unutar stanice, endokanabinoidi se prenose vezani na protein toplinskog šoka 70, Hsp70 (engl. *Heat shock protein 70*), a u krvotoku vezani na albumin. U jetri se prenose vezani na protein-1 koji veže masne kiseline, FABP1 (engl. *Fatty acid-binding protein 1*) (60-61).

1.6.2. Kanabinoidni receptori

Dva glavna receptora ECS otkrivena su tijekom istraživanja učinaka fitokanabinoida THC-a i CBD-a i nazvani su kanabinoidni receptor 1 i 2 (CB1R i CB2R). Ovi receptori pripadaju superobitelji GPC receptora (engl. *G-protein coupled receptor*), čija je glavna zadaća prevesti izvanstanične podražaje u unutarstanični signal te tako omogućiti odgovor stanice na vanjske podražaje. Kanabinoidni receptori su transmembranski proteini koji su s unutarstanične strane združeni s G-proteinima, bilo inhibicijskim G_iα- ili aktivacijskim G_sα-proteinima (62). Vežanjem endokanabinoida na kanabinoidne receptore u stanici se blokira izražaj specifičnih gena i sinteza ciljnih proteina. Isto tako, aktivacija kanabinoidnih receptora može mijenjati aktivnost kalijevih i kalcijevih kanala. Promjena koncentracije ovih elektrolita ima za posljedicu hiperpolarizaciju membrane neurona, što smanjuje njihovu podražljivost (63).

CB1R je najzastupljeniji GPC receptor u ljudskom živčanom sustavu. Neželjene psihoaktivne učinke THC ostvaruje upravo djelujući na CB1R. Ovi receptori rasprostranjeni su po cijelom SŽS-u i gotovo svim tkivima u organizmu, iako u puno manjoj mjeri nego u SŽS. CB1R receptori smješteni su na presinaptičkoj membrani i njihova aktivacija uzrokuje postsinaptičku inhibiciju jer sprječava oslobađanje neurotransmitera (64). Djelujući na CB1R u SŽS endokanabinoidi moduliraju kognitivne i motoričke funkcije, pamćenje i osjet boli. Izoforma CB1R, koja nastaje posttranslacijskim uklanjanjem 33 aminokiselina s N-terminalnog kraja proteina, izražena je izvan SŽS, posebno na stanicama jetre, gušterače, masnog tkiva, mišićima te posebno srcu, endotelu i glatkim mišićima krvnih žila (52).

CB2R prvenstveno se nalaze na stanicama imunološkog sustava i krvotvornim stanicama, iako je njihova prisutnost dokazana na gotovo svim stanicama organizma. Prisutnost ovih receptora dokazana je i u SŽS, međutim preko njih se ne ostvaruje psihoaktivno djelovanje THC-a (65). Rasprostranjenost kanabinoidnih receptora u organizmu prikazana je na slici 1.4.



Slika 1.4. Rasprostranjenost kanabinoidnih receptora u organizmu

(Kratice: SŽS, središnji živčani sustav; PŽS, periferni živčani sustav; GIT, gastrointestinalni trakt)

Najviše CB2R dokazano je na površini limfocita B, potom NK-stanicama, monocitima, neutrofilima, citoksičnim i pomagačkim T limfocitima. Intenzitet izražaja ovisan je o vrsti medijatora koji aktivira stanicu i stanju aktivacije stanice. Zbog značajnog izražaja na stanicama stečene i urođene imunosti, CB2R imaju važnu ulogu u funkciji i modulaciji imunološkog sustava (66).

Anandamid je djelomični agonist CB1R na koji se veže velikim afinitetom, dok na CB2R gotovo da nema učinka. 2-AG je puni agonist oba kanabinoidna receptora, ali se na njih veže slabijim afinitetom nego anandamid na CB1R (67).

Osim CB1R i CB2R, u ECS se danas ubrajaju i drugi receptori. TRPV1 receptori (engl. *Transient receptor potential vanilloid 1 channel*) nalazi se unutar stanica i veže oba endokanabinoida. Najznačajniji izražaj ovog receptora uočen je na osjetilnim živčanim stanicama, epitelnim i endotelnim stanicama te stanicama imunološkog sustava (68). Receptori iz obitelji GPR receptora (engl. *Orphan G protein-coupled receptor*) također se aktiviraju vezanjem endokanabinoida. Najpoznatiji je GPR55 receptor i smatra se trećim kanabinoidnim receptorom. Ovaj je receptor strukturom sličan kanabinoidnim receptorima, ali za razliku od njih, veže isključivo $G\alpha_{12/13}$ protein i potiče sazrijevanje i aktivaciju stanica. GPR55 receptori izolirani su iz SŽS, nadbubrežne žlijezde, probavnog sustava, masnog tkiva i stanica

imunološkog sustava (69). Endokanabinoidi su agonisti PPAR α receptora (engl. *Peroxisome proliferator-activated receptor α*) koji se nalaze u jezgri stanice. Vežući se na ove receptore, endokanabinoidi moduliraju izražaj gena te tako utječu na metabolizam i ostvaruju protuupalne i neurozaštitne učinke (70).

1.6.3. Endokanabinoidi u sepsi

Otkriće važne uloge ECS-a u moduliranju imunološkog odgovora i regulaciji funkcije endotela u upali, pokrenulo je istraživanja uloge ECS-a u sepsi.

U ranoj proupalnoj fazi očekivano pozitivno djelovanje mehanizama regulacije imunološkog odgovora je utišavanje upalnog procesa. Istraživanja na modelima sepse pokazala su da endokanabinoidi djeluju imunosupresivno i povećavaju uklanjanje bakterija fagocitozom u neutrofilnim granulocitima i makrofagima (71). Ovakvo djelovanje istovremeno smanjuje oštećenje tkiva uzrokovano upalom, ali i regulira intenzitet imunološkog odgovora u sepsi. Utišavanje i sprječavanje da upalni proces izmakne kontroli, endokanabinoidi omogućuju i izravnim djelovanjem na smanjeno oslobađanje proupalnih citokina te poticanjem oslobađanja protuupalnog citokina IL-10 iz Treg limfocita (72).

Protuupalno djelovanje u sepsi endokanabinoidi ostvaruju preko CB2R, međutim njihov učinak je ovisan o težini sepse. U proupalnoj fazi sepse, miševi koji nisu imali CB2R imali su veću smrtnost u sepsi u odnosu na divlji tip. Međutim, u životinjskom modelu septičnog šoka miševi koji nisu imali CB2R imali su manju smrtnost od divljeg tipa, budući da su imali manju koncentraciju protuupalnog citokina IL-10 u krvi i crijevima. Uz apoptozu limfocita T i B, nastala imunosupresija smanjila je uklanjanje bakterija i posljedično rezultirala većim oštećenjem tkiva i smrtnim ishodom divljeg tipa miševa (73). Istraživanja su pokazala da aktivacija CB2R u ranoj proupalnoj fazi sepse kontrolira izvor upale i sprječava njezino daljnje širenje i oštećenje tkiva. Međutim, u kasnoj imunosupresivnoj fazi sepse i u septičnom šoku, djelotvornije bi bilo blokirati imunosupresivno djelovanje ECS.

Na životinjskom modelu sepse dokazan je i antioksidativni učinak ECS-a. U sepsi su makrofagi i neutrofilni glavni izvori ROS i RNS (engl. *Reactive nitrogen species*). Smanjujući aktivaciju i pokretljivost neutrofila, endokanabinoidi smanjuju stvaranje ROS i RNS. Osim toga, ECS izravno djeluje na enzime koji sudjeluju u nastanku slobodnih radikala (74).

Pretjerana upalna reakcija u plućnom tkivu uzrokuje razvoj ARDS-a i posljedično oštećenje ostalih organa te povećani rizik od potrebe za uvođenjem IMV. Endokanabinoidi,

koji djeluju immunosupresivno i smanjuju pretjerano oslobađanje citokina, ostvaruju zaštitno djelovanje na plućno tkivo (75-76).

Mnoga istraživanja pokazala su da CB1R imaju važnu ulogu u razvoju hipotenzije u sepsi. Pošto je hipotenzija jedan od značajnijih patofizioloških događaja u razvoju septičnog šoka, upravo je taj učinak jedan od glavnih razloga zašto nema *in vivo* studija o djelovanju endokanabinoida u humanoj sepsi. CB1R nalaze se na presinaptičkoj membrani živaca simpatikusa i njihova aktivacija uzrokuje pad krvnog tlaka. CB1R se smatraju razlogom razvoja hipotenzije koja je otporna na terapiju noradrenalinom. Na životinjskom modelu septičnog šoka s izraženom hipotenzijom dokazano je da antagonisti CB1R uzrokuju porast krvnog tlaka, bolju arterijsku oksigenaciju i smanjenje koncentracije laktata u krvi (77).

Djelovanje ECS u sepsi ovisno je o koncentraciji endokanabinoida, receptoru preko kojega se ostvaruje učinak te proupalnoj, odnosno immunosupresivnoj fazi sepse. Iako su brojni dokazi o njihovom protuupalnom i mogućem zaštitnom djelovanju u proupalnoj fazi sepse, većina ovih istraživanja provedena je na životinjskim i staničnim modelima sepse. Ti modeli nisu dovoljno složeni, niti homogeni da bi se na temelju njih ispravno procijenila uloga ECS-a u organizmu čovjeka. Vrlo je malo spoznaja o ulozi, promjenama i mogućoj dijagnostičkoj i prognostičkoj ulozi ECS u ljudi oboljelih od sepse.

2. HIPOTEZA

Hipoteza ovog istraživanja je:

Endokanabinoidi anandamid i 2-AG su čimbenici rizika za pojavu komplikacija i smrtnog ishoda oboljelih od sepse.

3. CILJEVI

Ciljevi ovog istraživanja su:

1. Ispitati razlike u koncentraciji endokanabinoida anandamida i 2-AG kod oboljelih od sepse po prijemu i otpustu.
2. Ispitati povezanost anandamida i 2-AG s biljezima aktiviranih stanica imunološkog sustava u pacijenata oboljelih od sepse (proupalnim citokinom, interleukinom-6 i protuupalnim citokinom, interleukinom-10 te leukocitima, C-reaktivnim proteinom i prokalcitoninom).
3. Ispitati prognostičku ulogu anandamida i 2-AG u prepoznavanju neželjenih ishoda liječenja i komplikacija sepse.

4. ISPITANICI I METODE

4.1. Ustroj studije

Studija je ustrojena kao prospektivno kohortno istraživanje i provedena je u Kliničkom bolničkom centru Osijek u razdoblju od svibnja 2018. do travnja 2019.

Istraživanje je provedeno nakon odobrenja Etičkog povjerenstva Kliničkog bolničkog centra Osijek (broj: R2-6782/2018.) i Etičkog povjerenstva Medicinskog fakulteta Osijek (klasa: 602-04/21-08/07, broj: 2158-61-07-21-04).

Studija je organizirana i izvedena prema uputama CLSI GP45-A smjernica objavljenih 2004. godine o ispitivanju ishoda bolesti (78).

4.2. Ispitanici

U istraživanje je uključeno 106 ispitanika. Prikupljeni su uzorci krvi pacijenata sa sumnjom na sepsu, koji su na liječenje primljeni putem ambulantnog prijema i potom liječeni na Klinici za infektologiju i Odjelu za pulmologiju i intenzivno liječenje internističkih bolesnika, Klinike za internu medicinu Kliničkog bolničkog centra Osijek. Pacijenti su praćeni tijekom hospitalizacije i samo oni kojima je po završetku liječenja potvrđena dijagnoza sepse ili septičnog šoka uključeni su u istraživanje.

Ispitanicima su sepsa ili septični šok potvrđeni:

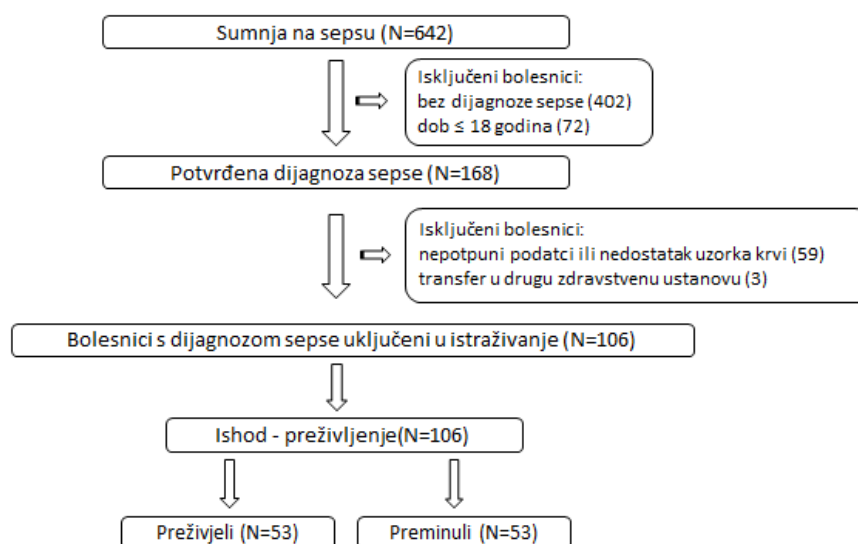
- a) mikrobiološki
- b) klinički, ukoliko je mikrobiološki nalaz bio negativan.

Iz istraživanja su isključeni pacijenti mlađi od 18 godina, pacijenti bez potvrđene dijagnoze sepse ili septičnog šoka, pacijenti koji su premješteni na liječenje u drugu ustanovu, pacijenti oboljeli od hemato-onkoloških bolesti te pacijenti koji su tijekom hospitalizacije imali operativni zahvat.

Tijekom istraživanja pratili su se slijedeći ishodi:

1. ishod liječenja (smrtni ishod ili preživljenje)
2. pokazatelji komplikacija i težine bolesti
 - a) razvoj septičnog šoka
 - b) potreba za mehaničkom ventilacijom
 - c) potreba za terapijom vazopresorima.

Ispitanici uključeni u istraživanje podijeljeni su u dvije skupine ovisno o ishodu liječenja: skupinu ispitanika s negativnim ishodom liječenja, odnosno smrtnim ishodom (N=53) i skupinu s pozitivnim ishodom liječenja, poboljšanjem kliničke i laboratorijske slike upale i otpustom s bolničkog liječenja što je definirano kao ishod preživljenja (N=53). Kako bi snaga prognostičke uloge endokanabinoida bila veća, dvije skupine imale su jednak broj ispitanika. Algoritam uključivanja ispitanika u istraživanje prikazan je na slici 4.1.



Slika 4.1. Algoritam uključivanja ispitanika u istraživanje

Uzorci krvi ispitanika prikupljeni su po prijemu na liječenje. Za svakog ispitanika prikupljena su 3 ml venske krvi u epruvetu s EDTA antikoagulansom i 3 ml krvi u epruvetu s trombinom bez antikoagulansa (BD Vacutainer, Becton, Dickinson and Company, Franklin Lakes, New Jersey, SAD). Ispitanicima s pozitivnim ishodom liječenja (ishod preživljenja) prikupljen je isti volumen uzoraka venske krvi po oporavku i otpustu s liječenja. U istraživanju su iskorišteni uzorci krvi uzorkovani u svrhu rutinske laboratorijske dijagnostičke obrade te istraživanje nije predstavljalo nikakav dodatan rizik za ispitanike. Unutar dva sata od završetka

zatražene laboratorijske dijagnostičke obrade, uzorci krvi su centrifugirani 10 min na 1370g (centrifuga Hettich 320R, Hettich GmbH & Co. KG, Tuttlingen, Njemačka). Odvojena su dva alikvota EDTA-plazme i tri alikvota seruma te su zamrznuti na -20°C do analize.

4.3. Metode

4.3.1. Podatci iz medicinske dokumentacije

Iz medicinske dokumentacije preuzeti su sljedeći podatci:

- a) Dob i spol ispitanika
- b) Pridružene bolesti
- c) Podatci iz kliničkog nalaza po ambulantnom prijemu:
 - tjelesna temperatura, °C
 - tjelesna masa, kg
 - brzina rada srca, broj otkucaja/min
 - brzina disanja, broj udaha/min
 - krvni tlak izražen kao srednji arterijski tlak (engl. *Mean Arterial Pressure, MAP*) izračunat prema formuli:

$$MAP(mmHg) = \frac{\text{sistolickitlak}(mmHg) + [2 \times \text{diastolickitlak}(mmHg)]}{3} \quad (1)$$

- d) Podatci iz kliničkog nalaza po završetku hospitalizacije
 - Potreba za potpomognutom mehaničkom ventilacijom
 - Potreba za suportivnom terapijom (vazokonstriktori)
 - Rezultati mikrobiološke analize hemokulture, urina i briseva
- e) Izračun sustava bodovanja

Prema vrijednostima mjerenih i zabilježenih parametara u trenutku prijema bolesnika na liječenje, izračunati su sustavi bodovanja qSOFA i SOFA. Izračun qSOFA sustava bodovanja učinjen je prema Sepsis-3 smjernicama (tablica 4.1.) (8).

Tablica 4.1. Izračun qSOFA sustava bodovanja

PARAMETAR	qSOFA BODOVI
Snižen krvni tlak (MAP \leq 100 mmHg)	1
Povećan broj udaha (\geq 22 udaha/min)	1
Stanje svijesti prema GCS skali (GCS \leq 14)	1

Kratice: qSOFA ljestvica (engl. *quick Sequential Organ Failure Assessment*); MAP, srednji arterijski tlak (engl. *Mean Arterial Pressure*); GCS, Glasgowska skala kome (engl. *Glasgow Coma Scale*)

SOFA sustav bodovanja izračunat je pomoću MDCalc kalkulatora koji je dostupan na mrežnim stranicama www.mdcalc.com (tablica 4.2.).

Tablica 4.2. Izračun SOFA sustava bodovanja

SOFA sustav bodovanja					
pO ₂ (kPa) ili FiO ₂ (%)	Unosi se mjerena vrijednost				
IMV (uključujući CPAP)	DA/NE				
BODOVI	0	1	2	3	4
Trombociti ($\times 10^9/L$)	≥ 150	100-149	50-99	20-49	< 20
GCS	15	13-14	10-12	6-9	< 6
Bilirubin ($\mu\text{mol/L}$)	< 20	20-32	33-101	102-204	> 204
MAP (mmHg) i vazoaktivna terapija ($\mu\text{g/kg/min}$)	≥ 70	< 70	DOP ≤ 5 ili DOBUT	DOP > 5 , EPI ≤ 0.1 norEPI ≤ 0.1	DOP > 15 , EPI > 0.1 norEPI > 0.1
Kreatinin ($\mu\text{mol/L}$) ili diureza (mL/dan)	< 110	110-170	171-299	300-440 ili < 500 mL/dan	≥ 440 < 200 mL/dan

Kratice: pO₂, parcijalni tlak kisika; FiO₂, udio kisika u udahutoj smjesi plinova; CPAP, kontinuirani pozitivni tlak zraka (engl. *Continuous Positive Airway Pressure*); IMV, invazivna mehanička ventilacija; GCS, Glasgowska skala kome (engl. *Glasgow Coma Scale*); MAP, srednji arterijski tlak (engl. *Mean arterial pressure*); DOP, dopamin; DOBUT, dobutamie; EPI, epinefrin=adrenalin; norEPI, norepinefrin=noradrenalin

Ukoliko GCS po prijemu nije bio zabilježen, za potrebe izračuna SOFA sustava bodovanja, ocjenjen je prema podacima iz trijažnog lista i anamneze bolesnika i izračunat u MDCalc programu (tablica 4.3).

Tablica 4.3. Vrednovanje stanja svijesti prema Glasgowskoj skali kome (GCS)

BOD	OPIS
NAJBOLJI OČNI ODGOVOR (O)	
1	Ne otvara oči
2	Oči otvara na bolan podražaj
3	Oči otvara na glasovnu naredbu
4	Spontano otvara oči
	Nije moguće testirati†
NAJBOLJI GOVORNI (VERBALNI) ODGOVOR (V)	
1	Nema glasovnog odgovora
2	Odgovara nerazumljivim zvukovima
3	Odgovara besmislenim riječima
4	Odgovara konfuzno
5	Odgovara orijentirano
	Nije moguće testirati††
NAJBOLJI MOTORIČKI ODGOVOR (M)	
1	Nema motoričkog odgovora
2	Odgovara ekstenzijom na bolan podražaj
3	Odgovara fleksijom na bolan podražaj
4	Odmiče se od bolnog podražaja
5	Lokalizira bolni podražaj
6	Prati naredbe
	Nije moguće testirati†††

† lokalna ozljeda, edem oka/očiju; †† intubiran pacijent; ††† paraliza, sedacija

f) Podatci laboratorijske analize

- Acidobazni status

U svrhu određivanja acidobaznog statusa ispitanika uzorkovana je arterijska krv u šprice s litij-heparinom (BD A-Line Arerial Blood Collection Syringes, Becton, Dickinson and Company, Franklin Lakes, New Jersey, SAD). Analiza je učinjena na analizatoru ABL 800 Flex (Radiometer Medical Aps, Brønshø, Danska). Metode određivanja parametara acidobaznog statusa prikazane su u tablici 4.4.

Tablica 4.4. Metode određivanja parametara acidobaznog statusa

PARAMETAR	METODA
pH krvi	Potencimetrija (pH elektroda)
Parcijalni tlak kisika u krvi, pO ₂	Amperometrija (pO ₂ elektroda)
Parcijalni tlak ugljikovog dioksida u krvi, pCO ₂	Potencimetrija (pCO ₂ elektroda)
Saturacija hemoglobina kisikom, sO ₂	Računski prema formuli: $sO_2 = \frac{cO_2Hb}{cHHb + cO_2Hb}$

cO₂Hb, koncentracija oksihemoglobina; cHHb, koncentracija deoksihemoglobina

- Hematološki parametri

Krvna slika određena je u EDTA-punoj venskoj krvi (BD Vacutainer, Becton, Dickinson and Company, Franklin Lakes, New Jersey, SAD) na hematološkom brojaču Sysmex XN-2000 (Sysmex Corporation, Kobe, Japan). Analiza krvne slike učinjena je metodom protočne citometrije s fluorescentnim bojama. Određeni su parametri crvene krvne loze (broj eritrocita, koncentracija hemoglobina i hematokrit), parametri bijele krvne loze (broj leukocita, postotak neutrofila, limfocita, monocita, bazofila, eozinofila i nezrelih razvojnih oblika) te broj trombocita.

- Biokemijski parametri

Biokemijski parametri određeni su u serumu venske krvi koja je uzorkovana u epruvetu bez antikoagulansa, s dodanim trombinom (BD Vacutainer, Becton, Dickinson and Company, Franklin Lakes, New Jersey, SAD) na biokemijskom analizatoru Olympus AU680 (Beckman Coulter, Brea, California, SAD). Prokalcitonin je određen na imunokemijskom analizatoru Cobas e411 (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Njemačka). U tablici 4.5. prikazani su biokemijski parametri preuzeti iz laboratorijske dokumentacije s pripadajućim metodama određivanja.

Tablica 4.5. Metode određivanja biokemijskih parametara

PARAMETAR	METODA
Alanin aminotransferaza, ALT	UV fotometrija (IFCC metoda)
γ -glutamil transferaza, GGT	Kontinuirana fotometrija (IFCC metoda)
Laktat dehidrogenaza, LDH	UV fotometrija (IFCC metoda)
Urea	Spektrofotometrijski test s ureazom
Kreatinin	Spektrofotometrijski test s kreatinazom
Bilirubin	Spektrofotometrijski test s dijazonijevom soli
Glukoza	UV fotometrija s heksokinazom
Laktat	UV fotometrija s laktat dehidrogenazom
Albumin	Spektrofotometrijski test s bromkrezol zelenilom
Natrij	Indirektna ion-selektivna potenciometrija
Kalij	Indirektna ion-selektivna potenciometrija
C-reaktivni protein, CRP	Lateks-imunoturbidimetrijski test
Prokalcitonin, PCT	Elektrokemiluminescentna imunoanaliza, ECLIA

Kratice: IFCC, engl. *International Federation for Clinical Chemistry*; UV, ultraljubičasti spektar.

- Koagulacijski parametri

Koagulacijski parametri određeni su u plazmi venske krvi koja je uzorkovana na antikoagulans natrijev-citrat (BD Vacutainer, Becton, Dickinson and Company, Franklin Lakes, New Jersey, SAD). Analize su učinjene na koagulometru BCS XP (Siemens Healthineers AG, Erlangen, Njemačka). U tablici 4.6. prikazani su koagulacijski parametri preuzeti iz laboratorijske dokumentacije s pripadajućim metodama određivanja.

Tablica 4.6. Metode određivanja koagulacijskih parametara

PARAMETAR	METODA
Fibrinogen	Koagulometrijska metoda
Antitrombin III, ATIII	Fotometrijska metoda s kromogenom
D-dimeri	Imunoturbidimetrijski test s mikročesticama
Protrombinsko vrijeme, PV	Koagulometrijska metoda
Aktivirano parcijalno tromboplastinsko vrijeme, aPTV	Koagulometrijska metoda

4.3.2. Određivanje endokanabinoida i interleukina

U odvojenim alikvotima EDTA-plazme i seruma određena je koncentracija endokanabinoida anandamida i 2-AG te citokina IL-6 i IL-10.

a) Metoda određivanja endokanabinoida anandamida i 2-AG

Endokanabinoidi anandamid i 2-AG određeni su u uzorku EDTA-plazme kompetitivnom ELISA metodom (engl. *Enzyme-linked Immunosorbent Assay*) korištenjem reagensa proizvođača Abbexa (Milton, Cambridge, Ujedinjeno Kraljevstvo).

Kako bi se očuvala stabilnost endokanabinoida, otopljeni uzorci plazme su tijekom postupka pipetiranja čuvani su na 4°C u ledenoj kupelji. Preliminarnim istraživanjem za određivanje koncentracije endokanabinoida anandamida najbolje se pokazalo razrjeđenje uzorka plazme 1:4, a za 2-AG 1:5. Razrjeđenje je učinjeno s 25 mM fosfatnim puferom, pH 7.2 (Euroimmun PBS, pH 7.2, Euroimmun Medizinische Labordiagnostika AG, Lübeck, Njemačka).

Postupak izvedbe ELISA metode jednak je za oba endokanabinoida i proveden je prema uputama proizvođača. Primjer postupka izvedbe ELISA metode prikazan je za endokanabinoid anandamid.

Na dnu mikrotitarske pločice vezano je antitijelo specifično za anandamid. Dodatkom standardnih otopina, razrijeđenih uzoraka te reagensa koji sadrži anandamid vezan s biotinom (engl. *Detection Reagent A*), dolazi do "natjecanja" anandamida iz uzorka i anandamida iz reagensa za vezna mjesta na antitijelu vezanom na dno jažice. Nakon inkubacije reakcijske smjese jedan sat na 37°C (Thermoshake mješalica, C.Gerhardt Analytical Systems, Königswinter, Njemačka) u tri koraka ispiranja uklanja se višak reagensa i moguće interferencije iz uzorka plazme ispitanika. U sljedećem koraku reakcije dodaje se reagens koji sadrži streptavidin vezan s enzimom peroksidazom (engl. *Detection Reagent B*). Specifično prepoznavanje i vezanje biotina i streptavidina omogućuje formiranje imunokompleksa čiju prisutnost je moguće dokazati kemijskom reakcijom. Nakon kratke inkubacije od 30 min na 37°C i ispiranja nevezanog kompleksa streptavidina i peroksidaze, dodaje se supstrat 3,3',5,5'-tetrametilbenzidin (TMB). Enzim peroksidaza vezan u imunokompleksu oksidira TMB u radikal-kation koji reakcijsku smjesu boji plavo. Enzimska reakcija mora se odvijati u mraku na 37°C. Dodatkom stop otopine (0.1 M sumporna kiselina), TMB radikal-kation oksidira u diimin koji boji reakcijsku smjesu žuto. Apsorbancija nastalog obojenja mjerena je na 450 nm na ELISA procesoru EtiMax 3000 (DiaSorin, Saluggia, Italija).

b) Metoda određivanja interleukina-6 i interleukina-10

U uzorku seruma određena je koncentracija proupalnog citokina IL-6 reagensom Human IL-6 ELISA i protuupalnog citokina IL-10 reagensom Human IL-10 ELISA "sendvič" ELISA metodom proizvođača Invitrogen, Thermo Fisher Scientific (Waltham, Massachusetts, SAD).

Preliminarnim istraživanjem za određivanje koncentracije citokina IL-6 najbolje se pokazalo razrjeđenje uzorka seruma 1:10, a za citokin IL-10 1:2. Za razrjeđenje uzoraka korišten je 25 mM fosfatni pufer, pH 7.2 (Euroimmun PBS, pH 7.2, Euroimmun Medizinische Labordiagnostika AG, Lübeck, Njemačka).

Postupak izvedbe ELISA metode jednak je za oba interleukina i proveden je prema uputama proizvođača. Primjer postupka izvedbe ELISA metode prikazan je za IL-6.

Prvi dan izvedbe analize:

Pročišćeno primarno monoklonsko antitijelo specifično za IL-6 pipetirano je na mikrotitarsku pločicu. Preko noći pločica je inkubirana na 2-8°C u hladnjaku kako bi se primarno antitijelo vezalo na dno pločice.

Drugi dan izvedbe analize:

Pločica je isprana puferom za ispiranje kojeg čini fosfatni pufer, pH 7.2 s detergentom (Euroimmun PBS pH 7.2 sa 0.05% detergentom Tween-20, Euroimmun Medizinische Labordiagnostika AG, Lübeck, Njemačka). 200 µL ELISA/ELISPOT diluenta koji sadrži goveđi serumski albumin, BSA (engl. *Bovine Serum Albumin*), dodano je u svaku jažicu kako bi se blokirala slobodna mjesta na dnu jažice na koja se nije vezalo primarno antitijelo. Pločica je inkubirana na Thermoshake miješalici kroz jedan sat. Po isteku inkubacije mikrotitarska pločica je isprana puferom za ispiranje i pipetirani su standardi i razrijeđeni uzorci ispitanika. Radi postizanja veće osjetljivosti analize, prema preporuci proizvođača, mikrotitarska pločica je inkubirana preko noći na 2-8°C.

Treći dan izvedbe analize:

Mikrotitarska pločica je isprana puferom za ispiranje i dodano je sekundarno antitijelo specifično za IL-6 na koje je vezan biotin. Reakcijska smjesa je inkubirana na miješalici na sobnoj temperaturi kroz jedan sat kako bi se formirao imunokompleks: primarno antitijelo-IL-6-sekundarno antitijelo. Pločica je ponovno isprana puferom za ispiranje kako bi se uklonio višak nevezanog sekundarnog antitijela te je potom dodan reagens koji sadrži avidin vezan s enzimom peroksidazom. Preko biotina, avidin s peroksidazom veže se na nastali imunokompleks. Dodatkom supstrata TMB, enzim peroksidaza vezan u imunokompleksu oksidira TMB u radikal-kation koji boji reakcijsku smjesu u plavo. Enzimska reakcija mora se odvijati u mraku na 37°C. Dodatkom stop otopine (0.1 M sumporna kiselina), TMB radikal-kation oksidira u diimin koji boji reakcijsku smjesu žuto. Apsorbancija nastalog obojenja mjerena je na 450 nm na ELISA procesoru EtiMax 3000 (DiaSorin, Saluggia, Italija).

4.4. Statističke metode

Numeričke varijable opisane su aritmetičkom sredinom i pripadajućom standardnom devijacijom u slučaju normalne razdiobe, u suprotnom, varijable su opisane medijanom i granicama interkvartilnog raspona. Shapiro Wilk testom testirano je prate li numeričke varijable normalnu razdiobu.

Razlike između normalno raspodijeljenih numeričkih varijabli dvije nezavisne skupine testirane su Studentovim t-testom, dok je u slučaju odstupanja od normalne raspodjele primijenjen Mann-Whitney U test. Razlike između normalno raspodijeljenih numeričkih varijabli dvije zavisne skupine (poput vrijednosti varijabli u skupini ispitanika sa pozitivnim ishodom liječenja mjerene po prijemu i po otpustu s liječenja) testirane su Studentovim t testom za ponavljana mjerenja, dok je u slučaju odstupanja od normalne raspodjele primijenjen Wilcoxonov test.

Razina značajnosti razlike između nezavisnih kategorijskih varijabli ispitana je χ^2 testom, a po potrebi Fisher egzaktnim testom.

Za ocjenu povezanosti numeričkih varijabli korišten je Pearsonov koeficijent korelacije r u slučaju normalne raspodjele varijabli, odnosno Spearmanov koeficijent korelacije ρ u slučaju odstupanja od normalne raspodjele.

Ocjena prognostičke uloge endokanabinoida (anandamida i 2AG), proupalnih (IL-6) i protuupalnih (IL-10) citokina te biljega upale (CRP, PCT i leukocita) testirana je analizom krivulje osjetljivosti testa, ROC analizom (engl. *Receiver Operating Curve*), i mjerenjem površine ispod krivulje (engl. *Area Under the Curve*, AUC). Upotrebom ROC analize određena je granična vrijednost svakog biljega te njegova osjetljivost, specifičnost, negativan (LR-) i pozitivan omjer izgleda (LR+).

Za analizu smrtnosti ispitanika u 28 dana hospitalizacije određena je Kaplan-Meier krivulja preživljenja. U analizi čimbenika rizika za smrtni ishod korištena je Cox regresijska analiza (engl. *Cox proportional hazard regression*) u dva koraka, dok je za ishode razvoja septičnog šoka, potrebe za invazivnom mehaničkom ventilacijom i vazopresorima korištena logistička regresijska analiza u kojoj su ishodi zavisne dihotomne varijable. U prvom koraku učinjena je univarijatna analiza za demografske, kliničke i biokemijske varijable. Sve varijable koje su u univarijatnoj analizi pokazale statističku značajnost $p < 0.1$ uključene su u multivarijatnu regresijsku analizu po stupnjevnom modelu. Čimbenici rizika koji su u multivarijatnoj regresijskoj analizi pokazali statističku značajnost $p < 0.05$ smatrani su

nezavisnim čimbenicima rizika za promatrani ishod. Rizik za smrtni ishod prikazan je omjerom hazarda (engl. *Hazard Ratio, HR*), dok je za preostala tri ishoda prikazan omjerom izgleda (engl. *Odds Ratio, OR*).

Za svaki regresijski model koji uključuje endokanabinoide, ocjenjena je učinkovitost u ranoj procjeni rizika za ispitivani ishod pomoću Hosmer-Lemeshow testa, Nagelkerke R^2 koeficijenta i ROC analize. Hosmer-Lemeshow test ispituje koliko dobro logistički regresijski model opisuje opaženu pojavnost ishoda u ispitivanoj skupini. Podatci se dijele u deset grupa prema rastućem riziku za pojavu ishoda. Za svaku skupinu računa se broj opaženih i očekivanih slučajeva ishoda i računa se χ^2 statistika. Test statistika slijedi χ^2 distribuciju sa $n-2$ stupnja slobode. Mala vrijednost χ^2 statistike uz $p > 0.05$ ukazuje na dobru prilagodbu logističkog regresijskog modela. Nagelkerke R^2 koeficijent, ili pseudo R^2 koeficijent, mjeri koliko ukupna varijacija zavisne varijable, tj. ispitivanog ishoda, u logističkom regresijskom modelu može biti objašnjena uvrštenim nezavisnim varijablama. ROC analizom testira se koliko dobro logistički regresijski model razlikuje pozitivne i negativne slučajeve ispitivanog ishoda. Snaga razlikovanja opisuje se površinom ispod krivulje, AUC, koji se naziva još i indeksom podudarnosti regresijskog modela. Predviđene vrijednosti ishoda izračunate prema logističkom regresijskom modelu koriste se kao nezavisna varijabla u ROC analizi. Uz AUC vrijednost, snaga razlikovanja pozitivnih i negativnih slučajeva ishoda opisuje se i veličinama osjetljivosti i specifičnosti.

Sve p vrijednosti su dvostrane. Razina značajnosti postavljena je na $\alpha = 0.05$. Za statističku analizu korišten je statistički program MedCalc (inačica 17.9.0, MedCalc Software, Ostend, Belgija).

5. REZULTATI

5.1. Opis osnovnih značajki ispitanika

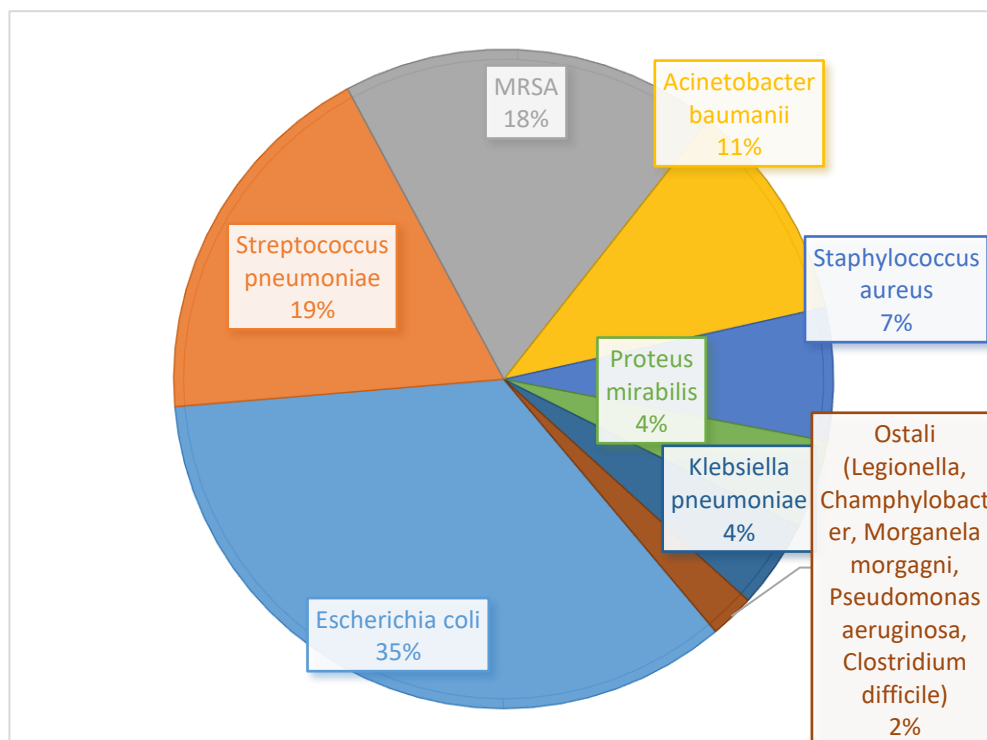
U istraživanje je bilo uključeno 106 ispitanika oboljelih od sepse, od kojih je 64 (60%) bilo ženskog spola. Medijan (raspon) dobi ispitanika u kohorti bila je 73 godine (27-94), dok je medijan dobi žena bio 73 godine (35-94), a muškaraca 66 godina (27-88) ($p=0.096$).

Najčešći uzroci sepse u ispitivanoj kohorti bili su pneumonija (41%) i upala mokraćnog sustava (37%). U 11% ispitanika uzrok sepse bile su infekcije gastrointestinalnog sustava (gastroenterokolitis, 9% i ileus, 2%), dok je od ostalih uzroka 4% ispitanika sepsu razvilo kao komplikaciju postojeće maligne bolesti, a 1% kao posljedicu infekcije tuneliranog centralnog venskog katetera. U 6% ispitanika uzrok sepse nije bilo moguće definirati.

Simptomi težine sustavne upale po prijemu na liječenje prikazani su u tablici 5.1. Iz tablice je vidljivo da je skupina ispitanika sa smrtnim ishodom primljena sa značajno nižim krvnim tlakom ($p<0.001$), tahipnejom ($p<0.001$), poremećajem neurološkog statusa ($p<0.001$) te sniženom sO_2 ($p<0.001$).

Mikrobiološka pretraga tjelesnih tekućina zatražena je u 87% ispitanika, a bila je pozitivna u 57% slučajeva. Analizirani su uzorci urina, hemokultura i pleuralni izljev. Najčešće izolirani patogen bila je *Escherichia Coli* (32%), a u 17% slučajeva izolirani su *Streptococcus pneumoniae* i meticilin-rezistentni *Staphylococcus aureus* (MRSA) (slika 5.1). Tri ispitanika imala su višestruke infekcije: dvama ispitanicima izolirana su dva uzročnika upale (MRSA i *Acinetobacter baumannii*, odnosno *Staphylococcus aureus* i *Clostridium difficile*), dok je kod jednog ispitanika izolirano čak pet uzročnika infekcije (MRSA, *Acinetobacter baumannii*, *Morganella morgagni*, *Pseudomonas aeruginosa* i *Champhylobacter*).

Od ukupnog broja ispitanika njih 100 (94%) imalo je jednu ili više pridruženih bolesti, a svi ispitanici uzimali su jedan ili više lijekova kao kroničnu terapiju. Između dvije skupine ispitanika nije postojala razlika u pridruženim bolestima (tablica 5.2), iako su preminuli ispitanici imali više pridruženih bolesti, u odnosu na preživjele ispitanike (6, 5-7 vs. 4, 3-6; $p=0.001$).



Slika 5.1. Patogeni izolirani iz tjelesnih tekućina ispitanika oboljelih od sepsa

Tablica 5.1. Simptomi težine upalnog stanja mjereni po prijemu na liječenje

ISPITANICI				
SIMPTOM	SVI (N=106), n (%)	PREŽIVJELI (N=53), n (%)	PREMINULI (N=53), n (%)	P
Tjelesna temperatura (°C) <36°C i >38°C	69 (65)	36 (68)	33 (62)	0.370*
Hiperventilacija (≥22 udaha/min)	32 (30)	4 (8)	28 (53)	<0.001†
Tahikardija (puls > 90/min)	63 (59)	33 (62)	30 (57)	0.553*
Hipotenzija (sistolički tlak ≤100 mmHg)	55 (52)	15 (28)	40 (76)	<0.001*
MAP ≤ 65 mmHg	26 (25)	6 (11)	20 (38)	<0.001†
sO ₂ < 90%	44 (42)	12 (23)	32 (60)	<0.001*
Leukocitoza (>12×10 ⁹ /L) Leukopenija (<4×10 ⁹ /L)	73 (69)	39 (74)	34 (64)	0.294*
Trombocitopenija (<100×10 ⁹ /L)	18 (17)	5 (9)	13 (25)	0.068*
Hiperglikemija (>7.7 mmol/L)	23 (22)	9 (17)	14 (26)	0.346†
Kreatinin >240 μmol/L	31 (29)	20 (38)	11 (21)	0.055*
GCS <15	57 (54)	13 (25)	44 (83)	<0.001*
qSOFA ≥2	58 (55)	12 (23)	46 (87)	<0.001*
SOFA >5	62 (59)	14 (26)	48 (91)	<0.001*

Skracenicke: MAP, srednji arterijski tlak (engl. *Mean Arterial Pressure*); sO₂, saturacija hemoglobina kisikom; GCS, Glasgowska ljestvica kome (engl. *Glasgow Coma Scale*); SOFA ljestvica (engl. *Sequential Organ Failure Assessment score*); qSOFA ljestvica (engl. *quick Sequential Organ Failure Assessment score*). * χ^2 test, † Fisherov egzaktan test

Tablica 5.2. Pridružene bolesti u skupinama preživjelih i preminulih ispitanika oboljelih od sepse

ISPITANICI				
PRIDRUŽENA BOLEST	SVI (N=106), n (%)	PREŽIVJELI (N=53), n (%)	PREMINULI (N=53), n (%)	P
Hipertenzija	67 (63)	35 (66)	32 (60)	0.546*
Kardiomiopatija	40 (38)	18 (34)	22 (42)	0.423*
Fibrilacija atrija	25 (24)	12 (23)	13 (25)	0.819*
Dijabetes	37 (35)	19 (36)	18 (34)	0.839*
Kronično zatajenje bubrega	15 (14)	7 (13)	8 (15)	1.000 [†]
KOPB	11 (10)	6 (11)	5 (9)	1.000 [†]
Hiperlipidemija	5 (5)	2 (4)	3 (6)	1.000 [†]
Psihoorganske promjene	12 (11)	4 (8)	8 (15)	0.359 [†]
Demencija	9 (9)	2 (4)	7 (13)	0.161 [†]
Karcinom ^a	8 (8)	5 (9)	3 (6)	0.716 [†]

Skraćenice: KOPB, kronična opstruktivna plućna bolest.

* χ^2 test, [†] Fisherov egzaktni test

^a Preživjeli: Non-Hodgkin limfom, kronična mijeloična leukemija, tumor bubrega, tumor kolona, tumor pluća; Preminuli: kronična limfatična leukemija, tumor ingvinalnih limfnih čvorova, adenokarcinom pluća

Ispitanicima s ishodom preživljenja (N=53) uzorkovani su uzorci krvi i u trenutku prijema na liječenje i u trenutku otpusta s liječenja. Nije uočena značajna razlika u koncentracijama endokanabinoida anandamida i 2-AG po prijemu i otpustu, iako se uočava da organizam u upali održava koncentraciju ovih medijatora u uskom koncentracijskom rasponu i bez velikih promjena. Koncentracija proupalnog citokina IL-6 i protuupalnog citokina IL-10, bile su značajno veće u trenutku prijema pacijenata u odnosu na otpust s liječenja ($p < 0.001$). Razlike u koncentraciji mjerenih parametara po prijemu i otpustu ispitanika oboljelih od sepse prikazani su u tablici 5.3.

Kod ispitanika s ishodom preživljenja, anandamid i 2-AG pokazali su vrlo dobru međusobnu pozitivnu povezanost i u trenutku prijema ispitanika na liječenje i u trenutku otpusta s liječenja (slika 5.2 A i B). Oba endokanabinoida mjerena po prijemu na liječenje pokazuju slabu pozitivnu, iako statistički značajnu, povezanost s upalnim citokinom IL-6. Povezanosti dva endokanabinoida s biljezima upale po prijemu ispitanika na liječenje prikazane su u tablici 5.4. Kada je ispitana povezanost koncentracija anandamida u trenutku prijema i trenutku otpusta, Spearmanov koeficijent povezanosti bio je $\rho = 0.621$ ($p < 0.001$).

Tablica 5.3. Razlike u koncentraciji parametara mjerenih u krvi ispitanika oboljelih od sepse s ishodom preživljenja po prijemu i po otpustu s liječenja

PARAMETAR	PRIJEM (N=53)	OTPUST (N=53)	p*
KRVNA SLIKA, MEDIAN (IQR)			
Leukociti ($\times 10^9/L$)	15.0 (10.9-20.8)	8.2 (6.5-11.2)	<0.001
Hemoglobin (g/L)	108 (96-122)	120 (98-137)	<0.001
MCHC (g/L)	332 (325-340)	338 (328-344)	0.013
Nesegmentirani granulociti (%)	9 (4-6)	3 (1-5)	<0.001
NEUT/LIMFO	6.4 (3.8-9.7)	2.7 (1.9-4.7)	<0.001
Trombociti ($\times 10^9/L$)	210 (150-270)	313 (242-396)	<0.001
BIOKEMIJA, MEDIAN (IQR)			
Bilirubin ($\mu\text{mol/L}$)	14.0 (12.0-19.0)	12.5 (11.0-14.0)	0.009
Glukoza (mmol/L)	7.8 (6.6-9.3)	6.1 (5.1-8.2)	0.001
Urea (mmol/L)	10.5 (6.9-17.9)	5.9 (4.6-8.1)	<0.001
Kreatinin ($\mu\text{mol/L}$)	134 (86-195)	84 (58-99)	<0.001
CRP (mg/L)	222.1 (172.3-299.9)	27.6 (12.6-67.1)	<0.001
Fibrinogen (g/L)	6.8 (5.4-8.9)	5.2 (3.9-5.9)	<0.001
ENDOKANABINOIDI, MEDIAN (IQR)			
Anandamid ($\mu\text{g/L}$)	5.04 (3.16-9.65)	5.80 (3.22-9.40)	0.512
2-AG ($\mu\text{g/L}$)	7.25 (4.28-15.95)	7.75 (6.58-13.05)	0.726
CITOKINI, MEDIAN (IQR)			
IL-6 (ng/L)	60.2 (32.3-179.7)	3.9 (2.2-7.8)	<0.001
IL-10 (ng/L)	20.3 (1.05-58.5)	0.8 (0.05-6.7)	<0.001

Skraćenice: IQR, interkvartilni raspon (engl. *Interquartile Range*); MCHC, srednja stanična koncentracija hemoglobina (engl. *Mean Cellular Hemoglobin Concentration*); NEUT/LIMFO, omjer neutrofila i limfocita; CRP, C-reaktivni protein; Anandamid, arahidonoiletanolamin; 2-AG, 2-arahidonoilglicerol; IL-6, interleukin-6; IL-10, interleukin-10; *Wilcoxon test

Spearmanov koeficijent povezanosti koncentracija 2-AG po prijemu i otpustu s liječenja bio je $\rho=0.592$ ($p<0.001$) (slika 5.2 C i D). Povezanost proupalnih i protuupalnih biljega mjerena po prijemu i otpustu s liječenja bila je slaba, iako statistički značajna (tablica 5.4 i 5.5).

Tablica 5.4. Povezanost endokanabinoida, proupalnih i protuupalnih biljega po prijemu na liječenje ispitanika s ishodom preživljenja

ρ (p)*	AEA	2-AG	IL-6	IL-10	CRP	PCT	Leuko
AEA	-	0.816 (<0.001)	0.438 (0.001)	0.119 (0.394)	-0.177 (0.180)	0.029 (0.874)	-0.027 (0.846)
2-AG	0.816 (0.001)	-	0.347 (0.011)	0.109 (0.436)	-0.280 (0.031)	-0.094 (0.610)	0.149 (0.287)
IL-6	0.438 (0.001)	0.347 (0.011)	-	0.363 (0.008)	-0.009 (0.944)	0.077 (0.676)	-0.033 (0.816)
IL-10	0.119 (0.394)	0.109 (0.436)	0.363 (0.008)	-	-0.254 (0.052)	0.113 (0.538)	0.251 (0.070)
CRP	-0.177 (0.180)	-0.280 (0.031)	-0.009 (0.944)	-0.254 (0.052)	-	0.033 (0.857)	-0.007 (0.962)
PCT	0.029 (0.874)	-0.094 (0.610)	0.077 (0.676)	0.113 (0.538)	0.033 (0.857)	-	0.156 (0.448)
Leuko	-0.027 (0.846)	0.149 (0.287)	-0.033 (0.816)	0.251 (0.070)	-0.007 (0.962)	0.156 (0.448)	-

Povezanost^a

- ρ 0 do ± 0.25
nema povezanosti
- ρ 0.25 do ± 0.50
slaba povezanost
- ρ 0.50 do ± 0.75
umjerena do dobra povezanost
- ρ 0.75 do ± 1.00
vrlo dobra do izvrsna povezanost

Skraćenice: AEA (anandamid), arahidonoiletanolamin; 2-AG, 2-arahidonoilglicerol; IL-6, interleukin-6; IL-10, interleukin-10; CRP, C-reaktivni protein; PCT, prokalcitonin; Leuko, leukociti.

*Spearmanov koeficijent korelacije, rho i razina statističke značajnosti ($p < 0.05$)

Tablica 5.5. Povezanost endokanabinoida, proupalnih i protuupalnih biljega po otpustu s liječenja ispitanika s ishodom preživljenja

ρ (p)*	AEA	2-AG	IL-6	IL-10	CRP	PCT	Leuko
AEA	-	0.782 (<0.001)	-0.157 (0.261)	0.299 (0.029)	-0.171 (0.195)	0.142 (0.395)	0.249 (0.072)
2-AG	0.782 (<0.001)	-	-0.168 (0.228)	0.166 (0.236)	-0.135 (0.310)	0.323 (0.408)	0.150 (0.285)
IL-6	-0.157 (0.261)	-0.168 (0.228)	-	0.316 (0.021)	0.263 (0.044)	0.554 (<0.001)	-0.102 (0.467)
IL-10	0.299 (0.029)	0.166 (0.236)	0.316 (0.021)	-	0.244 (0.063)	0.563 (<0.001)	-0.125 (0.373)
CRP	-0.171 (0.195)	-0.135 (0.310)	0.263 (0.044)	0.244 (0.063)	-	0.309 (0.059)	-0.098 (0.484)
PCT	0.142 (0.395)	0.323 (0.408)	0.554 (<0.001)	0.563 (<0.001)	0.309 (0.059)	-	-0.127 (0.490)
Leuko	0.249 (0.072)	0.150 (0.285)	-0.102 (0.467)	-0.125 (0.373)	-0.098 (0.484)	-0.127 (0.490)	-

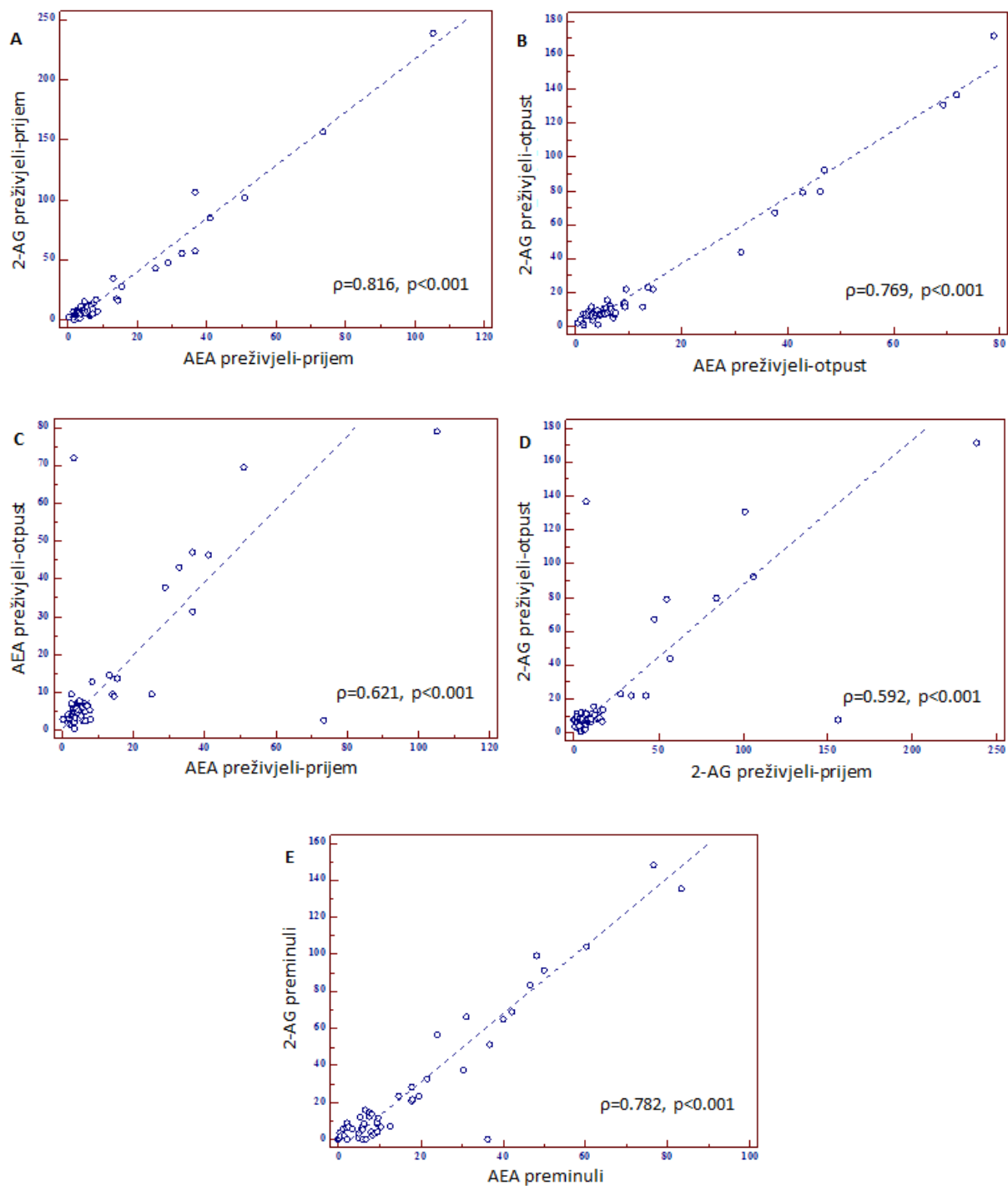
Povezanost^a

- ρ 0 do ± 0.25
nema povezanosti
- ρ 0.25 do ± 0.50
slaba povezanost
- ρ 0.50 do ± 0.75
umjerena do dobra povezanost
- ρ 0.75 do ± 1.00
vrlo dobra do izvrsna povezanost

Skraćenice: AEA (anandamid), arahidonoiletanolamin; 2-AG, 2-arahidonoilglicerol; IL-6, interleukin-6; IL-10, interleukin-10; CRP, C-reaktivni protein; PCT, prokalcitonin; Leuko, leukociti.

*Spearmanov koeficijent korelacije, rho

Po otpustu s liječenja ispitanika s ishodom preživljenja, anandamid je pokazao slabu, iako značajnu povezanost sa protuupalnim citokinom IL-10 ($\rho=0.299$, $p=0.029$) (tablica 5.5). Istovjetna povezanost nije uočena po prijemu ispitanika na liječenje (tablice 5.4)



Slika 5.2. Povezanost endokanabinoida anandamida i 2-AG prema ishodu liječenja

Skraćenice: AEA (anandamid), arahidonoiletanolamin; 2-AG, 2-arahidonoilglicerol

ρ , Spearmanov koeficijent korelacije

5.2. ISHOD 1: Ishod liječenja oboljelih od sepse

Dvije skupine ispitanika oboljelih od sepse činilo je 53 ispitanika s ishodom preživljenja i 53 ispitanika sa smrtnim ishodom liječenja. Između dvije skupine nije bilo razlike u dobi, spolu i izvoru upale. Osnovna obilježja dvije skupine prikazana su u tablici 5.6.

Tablica 5.6. Osnovne značajke ispitanika oboljelih od sepse s obzirom na ishod liječenja

VARIJABLA	PREŽIVJELI (N=53)	PREMINULI (N=53)	p
DEMOGRAFSKE KARAKTERISTIKE			
Muškarci, N (%)	22 (42)	20 (38)	0.843*
Dob, medijan (raspon)	71 (27-94)	75 (35-92)	0.117‡
IZVOR UPALE, N (%)			
Dišni sustav	18 (34)	25 (47)	0.253*
Mokraćni sustav	21 (40)	18 (34)	0.687*
Ostale bolesti ^a	10 (18)	7 (13)	0.296†
Nedefiniran izvor	4 (8)	3 (6)	1.000†
KULTURE TJELESNIH TEKUCINA, N (%)			
Ukupno 92 (87)			
Pozitivne 52 (57)	23 (44)	29 (56)	0.327*
BODOVNI SUSTAVI U SEPSI, medijan (IQR)			
qSOFA	1 (1-2)	2 (2-3)	<0.001‡
SOFA	8 (7-10)	11 (9-13)	<0.001‡
LABORATORIJSKA MJERENJA, medijan (IQR)			
Leukociti (×10 ⁹ /L)	15.0 (12.7-16.2)	12.5 (10.9-14.0)	0.091‡
Hemoglobin (g/L)	120 (109-126)	104 (95-114)	0.057‡
MCHC (g/L)	338 (333-339)	327 (325-331)	0.012‡
Protrombinsko vrijeme, udio	0.89 (0.82-1.01)	0.65 (0.56-0.80)	0.006‡
D-dimeri (µg/L)	2391 (1485-3858)	5587 (3139-7636)	0.020‡
Fibrinogen (g/L)	7.1 (6.1-7.7)	6.1 (5.0-6.6)	0.007‡
C-reaktivni protein (g/L)	222.1 (176.4-296.8)	253.2 (187.1-312.9)	0.245‡
Prokalcitonin (µg/L)	4.66 (1.63-18.99)	5.57 (2.38-17.74)	0.870‡
Interleukin-6 (ng/L)	60.2 (32.3-179.7)	85.8 (44.8-195.5)	0.134‡
Interleukin-10 (ng/L)	20.3 (1.1-58.5)	24.9 (0.3-52.2)	0.723‡
Urea (mmol/L)	10.6 (8.5-15.0)	20.9 (16.2-27.1)	<0.001‡
Kreatinin (µmol/L)	136 (113-152)	168 (148-250)	0.020‡
ENDOKANABINOIDI, medijan (IQR)			
Anandamid (µg/L)	5.04 (3.74-6.75)	8.40 (5.01-22.25)	0.057‡
2-AG (µg/L)	7.25 (4.28-15.95)	8.35 (3.28-29.34)	0.980‡

^aOstale bolesti: karcinomi, infekcija centralnog venskog katetera, akutni kolecistitis

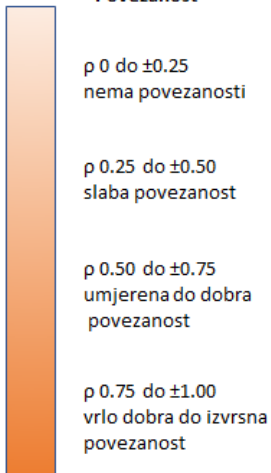
Skraćenice: IQR, interkvartilni raspon (engl. *Interquartile Range*); qSOFA ljesvica (engl. *quick Sequential Organ Failure Assessment*); SOFA ljestvica (engl. *Sequential Organ Failure Assessment*); MCHC, srednja stanična koncentracija hemoglobina (engl. *Mean Cellular Hemoglobin Concentration*); Anandamid, arahidonoiletanolamin; 2-AG, 2-arahidonoilglicerol; * χ^2 test; †Fisherov egzaktini test; ‡Mann-Whitney test

U skupini ispitanika sa smrtnim ishodom liječenja sepse značajnije je bio izražen poremećaj funkcije bubrega i sustava zgrušavanja krvi. Između skupine preživjelih i preminulih ispitanika nije uočena razlika u koncentraciji proupalnih (leukociti, CRP, PCT, IL-6) i protuupalnih (IL-10) biljega. U koncentraciji endokanabinoida anandamida i 2-AG između dvije skupine ispitanika nije uočena statistički značajna razlika ($p=0.057$ i $p=0.980$).

Analizom povezanosti endokanabinoida anandamida i 2-AG uočena je statistički značajna pozitivna povezanost i kod ispitanika s ishodom preživljenja (slika 5.2 E) i kod ispitanika sa smrtnim ishodom liječenja (tablica 5.7.).

Tablica 5.7. Povezanost endokanabinoida, proupalnih i protuupalnih biljega ispitanika u smrtnom ishodu liječenja sepse

ρ (p)*	AEA	2-AG	IL-6	IL-10	CRP	PCT	Leuko
AEA	-	0.769 (<0.001)	-0.050 (0.721)	-0.078 (0.581)	-0.057 (0.685)	0.550 (0.125)	0.170 (0.225)
2-AG	0.769 (<0.001)	-	-0.050 (0.722)	-0.019 (0.892)	-0.002 (0.992)	-0.667 (0.059)	0.117 (0.405)
IL-6	-0.050 (0.721)	-0.050 (0.722)	-	0.330 (0.016)	0.279 (0.043)	0.050 (0.898)	-0.094 (0.505)
IL-10	-0.078 (0.581)	-0.019 (0.892)	0.330 (0.016)	-	0.235 (0.090)	0.517 (0.154)	-0.036 (0.797)
CRP	-0.057 (0.685)	-0.002 (0.992)	0.279 (0.043)	0.235 (0.090)	-	0.267 (0.488)	0.137 (0.329)
PCT	0.550 (0.125)	-0.667 (0.059)	0.050 (0.898)	0.517 (0.154)	0.267 (0.488)	-	0.383 (0.309)
Leuko	0.170 (0.225)	0.117 (0.405)	-0.094 (0.505)	-0.036 (0.797)	0.137 (0.329)	0.383 (0.309)	-



Povezanost^a

ρ 0 do ± 0.25
nema povezanosti

ρ 0.25 do ± 0.50
slaba povezanost

ρ 0.50 do ± 0.75
umjerena do dobra povezanost

ρ 0.75 do ± 1.00
vrlo dobra do izvrsna povezanost

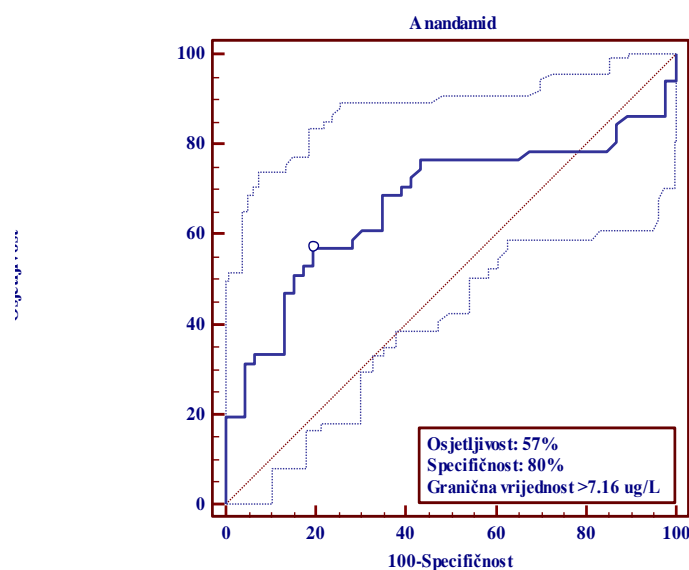
Skraćenice: AEA (anandamid), arahidonoiletanolamin; 2-AG, 2-arahidonoilglicerol; IL-6, interleukin-6; IL-10, interleukin-10; CRP, C-reaktivni protein; PCT, prokalcitonin; Leuko, leukociti.

*Spearmanov koeficijent korelacije, rho

5.2.1. Prognozička točnost endokanabinoida u razlikovanju ishoda liječenja sepse i krivulje preživljenja

Analizom krivulje osjetljivosti testa (ROC analizom) ispitana je prognozička točnost endokanabinoida anandamida i 2-AG te upalnih (leukociti, CRP, PCT, IL-6) i protuupalnih (IL-10) biljega u ranoj prognozi smrtnog ishoda ispitanika oboljelih od sepse. Izračunate su granične vrijednosti parametara koje predviđaju smrtni ishod već po prijemu bolesnika na liječenje.

Analiza je pokazala da je samo endokanabinoid anandamid značajan, iako slab, prognostički pokazatelj smrtnog ishoda sa površinom ispod krivulje (AUC) od 0.671 (95%CI 0.568-0.763, $p=0.003$). Granična vrijednost za rano razlikovanje septičnih bolesnika sa većim rizikom od smrtnog ishoda je koncentracija anandamida $>7.16 \mu\text{g/L}$ sa prognostičkom osjetljivosti za smrtni ishod od 57% (95%CI 42-71) i specifičnosti od 80% (95%CI 66-91). Pozitivan (LR+) i negativan (LR-) omjer vjerojatnosti bili su 2.9 (95%CI 1.5-5.5) i 0.5 (95%CI 0.4-0.8) (slika 5.3). Ostali proupalni i protuupalni parametri nisu se pokazali kao značajni prognostički biljezi u razlikovanju ishoda preživljenja oboljelih od sepse.



Slika 5.3. Rezultati analize krivulje osjetljivosti prediktivne vrijednosti anandamida u prognozi smrtnog ishoda oboljelih od sepse

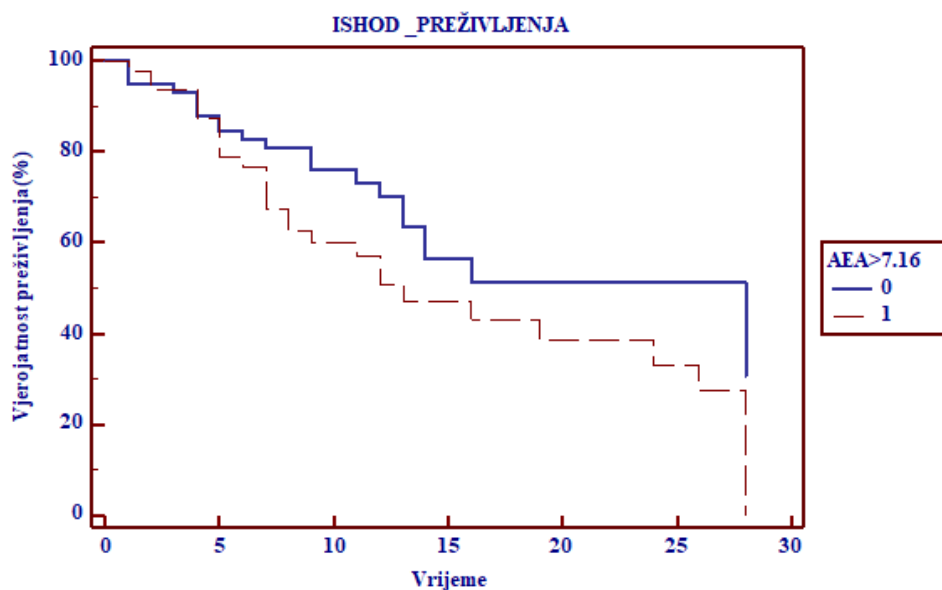
Uočena je statistički značajna ($p=0.004$) razlika u 28-dnevnom preživljenju između skupine oboljelih od sepse kojima je po prijemu mjerena koncentracija anandamida $>7.16 \mu\text{g/L}$ i skupine kojoj je po prijemu mjerena koncentracija $<7.16 \mu\text{g/L}$ (slika 5.4).

5.2.2. Analiza čimbenika rizika za smrtni ishod sepse

Cox proporcionalnom regresijskom analizom ispitano je jesu li endokanabinoidi, uz ostale mjerene parametre upale i oštećenja tkiva, čimbenici rizika za smrtni ishod oboljelih od sepse u periodu od 28 dana liječenja. U prvom koraku ispitan je utjecaj svakog parametra zasebno na preživljenje (univarijatna analiza), a u sljedećem koraku ocjenjen je utjecaj navedenih parametara uz prilagodbu u odnosu na druge varijable koje bi mogle utjecati na ishod

smrti (multivarijatna analiza). Rezultati oba modela regresijske analize prikazani su u tablici 5.8.

Iako se u univarijatnom modelu prognoze smrtnog ishoda endokanabinoid anandamid pokazao kao značajan čimbenik rizika, nakon uključanja ostalih varijabli koje utječu na ishod preživljenja, samo su se smanjen broj leukocita, porast SOFA sustava bodovanja, smanjena koncentracija fibrinogena i MCHC pokazali kao nezavisni rani čimbenici rizika za smrtni ishod oboljelih od sepse, u 28 dana hospitalizacije.



Slika 5.4. Krivulja 28-dnevnog preživljenja tijekom hospitalizacije oboljelih od sepse prema graničnoj vrijednosti endokanabinoida anandamida $>7.16 \mu\text{g/L}$

(0, preživjeli ispitanici; 1, preminuli ispitanici)

Tablica 5.8. Analiza ranih čimbenika rizika za 28-dnevno preživljenje oboljelih od sepse

VARIJABLA	UNIVARIJATNA COX REGRESIJSKA ANALIZA		MULTIVARIJATNA COX REGRESIJSKA ANALIZA	
	HR (95% CI)	p	HR (95% CI)	p
Dob	1.01 (0.99-1.03)	0.241		
Spol (M)	0.84 (0.48-1.47)	0.548		
MAP	0.96 (0.94-0.98)	<0.001		
GCS	0.87 (0.82-0.92)	<0.001		
sO ₂	0.97 (0.96-0.99)	<0.001		
Anandamid	1.02 (1.01-1.04)	0.017		
2-AG	1.00 (0.99-1.01)	0.873		
C-reaktivni protein	0.99 (0.99-1.00)	0.947		
Prokalcitonin	1.00 (0.99-1.00)	0.481		
Interleukin-6	1.00 (0.99-1.00)	0.586		
Interleukin-10	1.00 (0.99-1.00)	0.866		
Leukociti	0.96 (0.94-0.99)	0.021	0.90 (0.83-0.99)	0.028
qSOFA	2.53 (1.78-3.59)	<0.001		
SOFA	1.20 (1.12-1.28)	<0.001	1.17 (1.03-1.33)	0.018
Hemoglobin	0.99 (0.98-1.00)	0.218		
MCHC	0.98 (0.96-0.99)	0.028	0.96 (0.92-0.99)	0.008
Protrombinsko vrijeme	0.49 (0.22-1.09)	0.083		
Fibrinogen	0.84 (0.73-0.98)	0.023	0.79 (0.64-0.97)	0.026
D-dimeri	1.00 (1.00-1.01)	0.410		
Albumin	0.90 (0.85-0.96)	<0.001		
Urea	1.03 (1.01-1.05)	<0.001		
Kreatinin	1.01 (0.99-1.00)	0.063		

Skraćenice: HR, omjer hazarda (*engl. Hazard Ratio*); CI, interval pouzdanosti (*engl. Confidence Interval*); MAP, srednji arterijski tlak (*engl. Mean Arterial Pressure*); GCS, Glasgowska ljestvica kome (*engl. Glasgow Coma Scale*); sO₂, saturacija hemoglobina kisikom; 2-AG, 2-arahidonoilglicerol; qSOFA ljestvica (*engl. quick Sequential Organ Failure Assessment*); SOFA ljestvica (*engl. Sequential Organ Failure Assessment*); MCHC, srednja stanična koncentracija hemoglobina (*engl. Mean Cellular Hemoglobin Concentration*).

5.3. ISHOD 2a: Razvoj septičnog šoka

Od ukupnog broja ispitanika oboljelih od sepse (N=106) njih 25 (23%) razvilo je septični šok. Smrtnost u skupini oboljelih od septičnog šoka bila je 85%. Kod najvećeg broja ispitanika sa septičnim šokom izvor infekcije bio je u dišnom sustavu (60%).

Već po prijemu na liječenje ispitanici koji su razvili septični šok imali su značajnije oštećenje vitalnih organa poput pluća, bubrega i jetre, značajan poremećaj neurološkog statusa i funkcije sustava zgrušavanja krvi. Također, vrijednosti sustava bodovanja qSOFA i SOFA bile su značajno veće kod oboljelih sa septičnim šokom. Vrijednosti anandamida i 2-AG po prijemu u bolnicu bile su manje u skupini oboljelih sa septičnim šokom. Kako bi se smanjenje njihove koncentracije međusobno usporedilo, izračunata je razlika dvaju endokanabinoida u svakoj skupini. U skupini oboljelih od septičnog šoka koncentracija 2-AG bila je za 2.29 $\mu\text{g/L}$ (0.03 – 4.52) veća od koncentracije anandamida. U skupini ispitanika oboljelih od sepse koji nisu razvili septični šok, koncentracija 2-AG bila je za 3.29 $\mu\text{g/L}$ (0.31 – 10.09) veća od koncentracije anandamida. Međutim, nije uočena značajna razlika u koncentracijskom odnosu dvaju endokanabinoida ($p=0.245$). Osnovna obilježja septičnih bolesnika koji su razvili septični šok prikazana su u tablici 5.9.

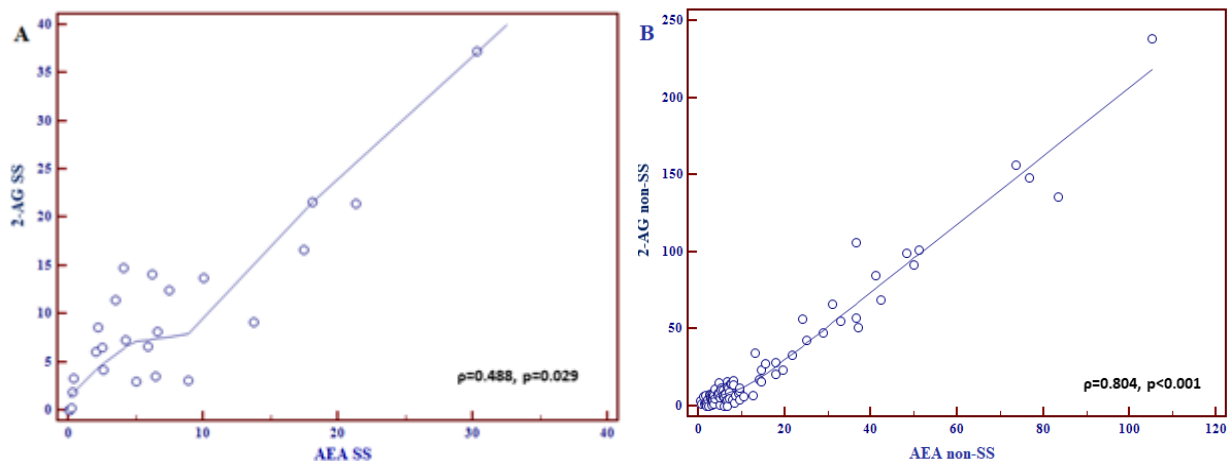
Analizom povezanosti endokanabinoida anandamida i 2-AG, uočena je statistički značajna pozitivna korelacija i u skupini oboljelih koji su razvili septični šok ($\rho=0.488$, $p=0.029$; slika 5.5 A) i u skupini ispitanika koji nisu razvili septični šok ($\rho=0.804$, $p<0.001$; slika 5.5 B). U slučaju teške komplikacije sepse, poput razvoja septičnog šoka, uočava se slabija povezanost dvaju endokanabinoida.

Tablica 5.9. Osnovna obilježja ispitanika oboljelih od sepse koji su razvili septični šok

VARIJABLA	SS (N=20)	Non-SS (N=86)	P
DEMOGRAFSKE KARAKTERISTIKE			
Muškarci, N (%)	6 (30)	36 (42)	0.195*
Dob, medijan (raspon)	69 (39-92)	72 (27-94)	0.332‡
IZVOR UPALE, N (%)			
Dišni sustav	12 (60)	31 (36)	0.087*
Mokraćni sustav	5 (25)	34 (40)	0.305†
Ostale bolesti ^a	3 (15)	14 (16)	1.000†
Nedefiniran izvor	0 (0)	7 (8)	0.343†
BODOVNI SUSTAVI U SEPSI, medijan (IQR)			
qSOFA	2 (2-3)	1 (1-2)	0.002‡
SOFA	11 (9-13)	5 (4-9)	<0.001‡
LABORATORIJSKA MJERENJA, medijan (IQR)			
Leukociti ($\times 10^9/L$)	13.6 (8.4-10.0)	13.3 (10.8-18.9)	0.554‡
Eritrociti ($\times 10^{12}/L$)	3.44 (2.89-4.06)	4.02 (3.37-4.53)	0.045‡
Hemoglobin (g/L)	106 (87-119)	118 (92-134)	0.084‡
Trombociti ($\times 10^9/L$)	106 (72-241)	199 (145-290)	0.008‡
Protrombinsko vrijeme, udio	0.58 (0.47-0.84)	0.84 (0.56-1.05)	0.039‡
aPTV, omjer	1.13 (0.91-1.39)	0.96 (0.87-1.08)	0.100‡
D-dimeri ($\mu g/L$)	6239 (1649-10645)	2979 (1451-6289)	0.241‡
pH	7.321 (7.187-7.407)	7.385 (7.332-7.444)	0.012‡
pO ₂ (kPa)	6.16 (5.11-8.15)	8.21 (6.42-9.32)	0.017‡
pCO ₂ (kPa)	5.35 (3.63-6.48)	4.47 (4.00-5.26)	0.239‡
sO ₂ (%)	87 (76-92)	91 (84-96)	0.032‡
Albumin (g/L)	21.9 (19.0-26.9)	26.0 (22.4-29.0)	0.014‡
γ -glutamil transferaza (U/L)	51 (28-146)	32 (18-58)	0.019‡
Laktat dehidrogenaza (U/L)	526 (349-732)	241 (175-326)	0.011‡
C-reaktivni protein (g/L)	297.8 (199.0-343.9)	222.1 (172.9-298.7)	0.057‡
Prokalcitonin ($\mu g/L$)	23.12 (2.38-112.64)	5.00 (1.24-13.74)	0.039‡
Interleukin-6 (ng/L)	117.1 (78.5-497.2)	68.3 (35.5-163.7)	0.032‡
Interleukin-10 (ng/L)	25.2 (0.3-87.6)	20.9 (0.8-54.3)	0.914‡
Laktati (mmol/L)	4.16 (1.80-6.77)	2.31 (1.12-4.15)	0.043
Urea (mmol/L)	25.8 (19.5-31.0)	12.8 (8.1-20.8)	<0.001‡
Kreatinin ($\mu mol/L$)	301 (159-401)	138 (85-226)	0.002‡
ENDOKANABINOIDI, medijan (IQR)			
Anandamid ($\mu g/L$)	4.18 (1.20-7.06)	6.68 (3.56-15.29)	0.012‡
2-AG ($\mu g/L$)	6.28 (2.43-10.53)	8.30 (4.40-23.49)	0.032‡

^aOstale bolesti: karcinomi, infekcija centralnog venskog katetera, akutni kolecistitis

Skraćenice: SS, skupina ispitanika koja je razvila septični šok; non-SS, skupina septičnih ispitanika koji nisu razvili septični šok; IQR, interkvartilni raspon (engl. *Interquartile Range*); qSOFA ljestvica (engl. *quick Sequential Organ Failure Assessment*); SOFA ljestvica (engl. *Sequential Organ Failure Assessment*); aPTV, aktivirano parcijalno tromboplastinsko vrijeme; pO₂, parcijalni tlak kisika; pCO₂, parcijalni tlak ugljičnog dioksida; sO₂, saturacija hemoglobina kisikom; anandamid, arahidonoleitanolamin; 2-AG, 2-arahidonoleilglicerol; * χ^2 test; †Fisherov egzaktni test; ‡Mann-Whitney test



Slika 5.5. Povezanost endokanabinoida anandamida i 2-arahidonoilglicerola u skupini sa septičnim šokom (A) i skupini ispitanika bez septičnog šoka (B)

Skraćenice: SS, septični šok; anandamid, arahidonoiletanolamin; 2-AG, 2-arahidonoilglicerol

U skupini ispitanika koji nisu razvili septični šok uočena je negativna, iako slaba, povezanost endokanabinoida 2-AG i proupalnog biljega CRP ($\rho = -0.252$, $p = 0.020$). Proupalni biljezi IL-6 i CRP pokazali su značajnu pozitivnu povezanost s protuupalnim biljekom IL-10 ($\rho = 0.488$, $p = 0.031$ i $\rho = 0.493$, $p = 0.027$).

5.3.1. Prognoza razvoja septičnog šoka

Analizom krivulje osjetljivosti testa (ROC analizom) ispitana je prognostička točnost endokanabinoida anandamida i 2-AG te upalnih (CRP, PCT, IL-6, leukociti) i protuupalnih (IL-10) biljega u ranom prepoznavanju razvoja septičnog šoka kod ispitanika oboljelih od sepse. Analizom je utvrđeno da su oba endokanabinoida i proupalni biljezi CRP, IL-6 i PCT rani pokazatelji razvoja septičnog šoka kod oboljelih od sepse. Proupalni biljeg IL-6 pri graničnoj vrijednosti >82.5 ng/L imao je najveću osjetljivost od 75% (95%CI 51-91), dok je proupalni biljeg PCT, pri graničnoj vrijednosti od >33.93 $\mu\text{g/L}$, imao najveću specifičnost, 91% (95%CI 78-98) u ranoj prognozi razvoja septičnog šoka. Endokanabinoidi anandamid i 2-AG pri graničnim vrijednostima od ≤ 2.6 $\mu\text{g/L}$ i ≤ 3.35 $\mu\text{g/L}$ pokazali su slabiju osjetljivost (45%, 95%CI 23-69 i 40%, 95%CI 19-64), ali veću specifičnost za rano prepoznavanje oboljelih od sepse, koji će razviti stanje septičnog šoka (87%, 95%CI 78-93 i 85%, 95%CI 76-92) (tablica 5.10).

Tablica 5.10. Prognostička točnost endokanabinoida anandamida i 2-AG, proupalnih i protuupalnih biljega u ranom razlikovanju septičnih ispitanika koji će razviti septični šok

Varijabla	AUC (95% CI)	P	Granična vrijednost	Osjetljivost (95% CI)	Specifičnost (95% CI)	LR+ (95% CI)	LR- (95% CI)
AEA ($\mu\text{g/L}$)	0.69 (0.59-0.77)	0.008	≤ 2.60	45 (23-69)	87 (78-93)	3.5 (1.7-7.3)	0.6 (0.4-0.9)
2-AG ($\mu\text{g/L}$)	0.66 (0.56-0.75)	0.015	≤ 3.35	40 (19-64)	85 (76-92)	2.7 (1.3-5.5)	0.7 (0.5-1.0)
CRP (mg/L)	0.64 (0.54-0.73)	0.047	> 268.0	65 (41-85)	70 (59-79)	2.2 (1.4-3.4)	0.5 (0.3-0.9)
PCT ($\mu\text{g/L}$)	0.69 (0.55-0.80)	0.036	> 33.93	50 (23-77)	91 (78-98)	5.5 (1.9-16.1)	0.6 (0.3-0.9)
IL-6 (ng/L)	0.65 (0.56-0.74)	0.030	> 82.5	75 (51-91)	59 (48-70)	1.8 (1.3-2.6)	0.4 (0.2-0.9)
IL-10 (ng/L)	0.50 (0.40-0.60)	0.974	> 0.3	65 (41-85)	24 (16-35)	0.9 (0.6-1.2)	1.4 (0.7-2.9)
Leuko ($\times 10^9/\text{L}$)	0.55 (0.45-0.64)	0.566	≤ 10.5	45 (23-69)	72 (68-86)	2.0 (1.1-3.8)	0.7 (0.5-1.1)

Skraćenice: AUC, površina ispod krivulje osjetljivosti testa; CI, interval pouzdanosti (engl. *Confidence Interval*); AEA (anandamid), arahidonoiletanolamin; 2-AG, 2-arahidonoilglicerol; CRP, C-reaktivni protein; PCT, prokalcitonin; IL-6, interleukin-6; IL-10, interleukin-10; Leuko, leukociti.

5.3.2. Analiza čimbenika rizika za razvoj septičnog šoka

Logistička regresijska analiza pokazala je da su endokanabinoidi anandamid i 2-AG i proupalni biljeg PCT, zajedno s pulsom i brojem udaha u minuti, sustavima bodovanja izračunatim po prijemu u bolnicu (qSOFA i SOFA) te biljezima funkcije jetre (albumin, γ -glutamil transferaza, GGT), pluća (pH, $p\text{O}_2$, $p\text{CO}_2$), bubrega (urea, kreatinin) i sustava zgrušavanja krvi (trombociti, PV-udio, aPTV-omjer), rani čimbenici rizika za razvoj septičnog šoka.

Nakon što su u multivarijatnu logističku regresijsku analizu uključeni svi navedeni biljezi, kao jedini rani nezavisni čimbenici rizika za razvoj septičnog šoka pokazali su se SOFA sustav bodovanja, pH i PV-udio (tablica 5.11). Endokanabinoidi i upalni biljezi nisu se pokazali kao rani nezavisni čimbenici rizika za razvoj septičnog šoka tijekom bolničkog liječenja oboljelih od sepse. Na ishod rizika razvoja septičnog šoka značajno su utjecali protrombinsko vrijeme i pH, čiji porast za jednu jedinicu smanjuje izgled razvoja septičnog šoka za 97%, odnosno 100%, dok se SOFA sustav bodovanja pokazao kao nezavisni čimbenik rizika, čiji porast povećava rizik za razvoj septičnog šoka za 35%.

Jednadžba modela logističke regresijske analize za rani razvoj septičnog šoka je:

$$\text{logit}(p) = 67.737 + 0.299(\text{SOFA}) + 0.068(\text{urea}) - 9.709(\text{pH}) - 3.376(\text{PVudio}) \quad (2)$$

Tablica 5.11. Analiza ranih čimbenika rizika za razvoj septičnog šoka

VARIJABLA	UNIVARIJATNA LOGISTIČKA REGRESIJSKA ANALIZA		MULTIVARIJATNA LOGISTIČKA REGRESIJSKA ANALIZA	
	OR (95% CI)	p	OR (95% CI)	p
Dob	0.98 (0.95-1.01)	0.244		
Spol (M)	0.60 (0.21-1.70)	0.322		
Puls (otkucaji/min)	0.97 (0.94-0.99)	0.005		
qSOFA	2.50 (1.35-4.64)	0.004		
SOFA	1.50 (1.22-1.75)	<0.001	1.35 (1.01-1.80)	0.044
pH	0.01 (0.01-0.05)	0.002	0.01 (0.01-0.22)	0.020
pO ₂	0.79 (0.64-0.98)	0.029		
pCO ₂	1.22 (1.01-1.46)	0.035		
sO ₂	0.97 (0.93-1.00)	0.058		
Anandamid	0.96 (0.91-0.99)	0.040		
2-AG	0.96 (0.91-0.99)	0.009		
C-reaktivni protein	1.00 (0.99-1.01)	0.062		
Prokalcitonin	1.01 (1.00-1.01)	0.034		
Interleukin-6	1.00 (0.99-1.00)	0.093		
Interleukin-10	1.00 (0.99-1.00)	0.395		
Leukociti	0.97 (0.91-1.04)	0.439		
Trombociti	0.99 (0.98-0.99)	0.014		
PV, udio	0.21 (0.05-0.94)	0.042	0.03 (0.01-0.69)	0.028
aPTV, omjer	4.72 (1.22-18.24)	0.024		
GGT	1.01 (1.00-1.01)	0.015		
Albumin	0.88 (0.78-0.98)	0.019		
Urea	1.06 (1.02-1.11)	0.006	1.07 (1.00-1.15)	0.052
Kreatinin	1.01 (1.00-1.01)	0.010		

Skraćenice: OR, omjer izgleda (*engl. Odds Ratio*); CI, interval pouzdanosti (*engl. Confidence Interval*); MAP, srednji arterijski tlak (*engl. Mean Arterial Pressure*); qSOFA ljestvica (*engl. quick Sequential Organ Failure Assessment*); SOFA ljestvica (*engl. Sequential Organ Failure Assessment*); pO₂, parcijalni tlak kisika; pCO₂, parcijalni tlak ugljičnog dioksida; sO₂, saturacija hemoglobina kisikom; 2-AG, 2-arahidonoilglicerol; PV, protrombinsko vrijeme; aPTV, aktivirano parcijalno tromboplastinsko vrijeme; GGT, gama-glutamil transferaza.

5.4. ISHOD 2b: Potreba za invazivnom mehaničkom ventilacijom

Od ukupnog broja ispitanika (N=106) kliničko stanje 26 (25%) bolesnika zahtijevalo je tijekom liječenja invazivnu mehaničku ventilaciju (IMV). Svi ovi bolesnici liječeni su u jedinici za intenzivno liječenje. Smrtnost u IMV skupini bila je 92%, dok je u skupini bolesnika čije kliničko stanje nije zahtijevalo IMV (non-IMV skupina) preminulo 36% ispitanika. U 77% bolesnika IMV skupine izvor infekcije bio je u dišnom sustavu, dok je isti izvor infekcije bio uočen u 29% bolesnika non-IMV skupine.

Već po prijemu na liječenje ispitanici iz IMV skupine imali su veće vrijednosti SOFA bodovnih sustava, što ukazuje na težu kliničku sliku upale. Anemija, poremećaji funkcije bubrega, pluća i jetre bili su izraženiji u skupini ispitanika koji su tijekom liječenja trebali potporu IMV. Vrijednosti anandamida i 2-AG po prijemu u bolnicu bile su manje u skupini oboljelih koji su trebali IMV. Kako bi se usporedilo smanjenje njihove koncentracije, izračunata je razlika dvaju endokanabinoida u svakoj skupini. U skupini oboljelih koji su trebali IMV, koncentracija 2-AG bila je tek za 0.37 $\mu\text{g/L}$ (-4.0 – 4.70) veća od koncentracije anandamida. U skupini ispitanika oboljelih od sepse koji nisu trebali IMV, koncentracija 2-AG bila je za 3.81 $\mu\text{g/L}$ (0.85–15.085) veća od koncentracije anandamida. Značajno veće smanjenje koncentracije 2-AG ($p=0.004$) uočeno je u skupini oboljelih koji su trebali IMV. Osnovna obilježja IMV i non-IMV skupine prikazana su u tablici 5.12.

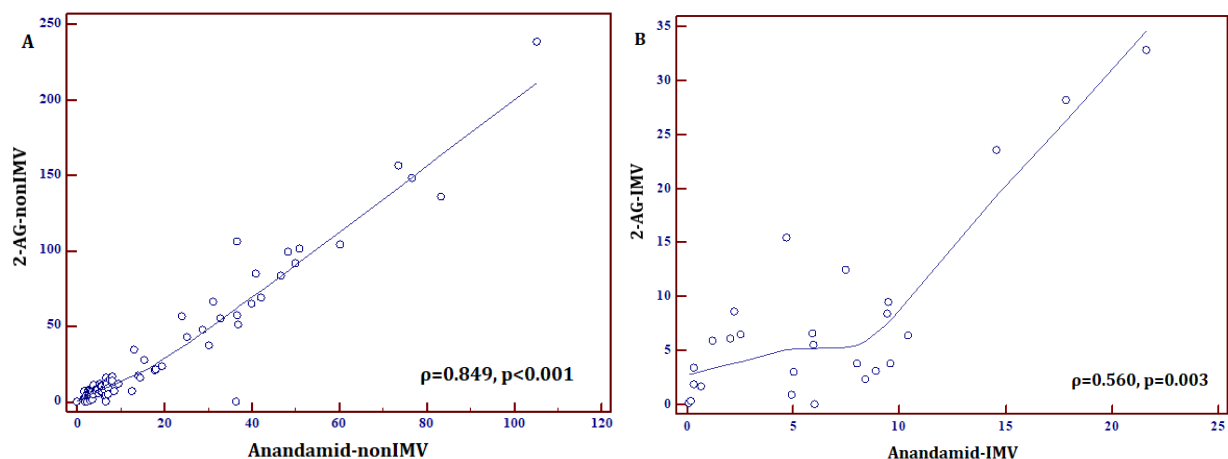
U non-IMV skupini ispitanika endokanabinoidi anandamid i 2-AG pokazali su izvrsnu pozitivnu povezanost ($\rho=0.849$, $p<0.001$) (slika 5.6 A). Iako se prati zajednički porast i pad endokanabinoida anandamida i 2-AG, što je uočeno i u prethodnim promatranim ishodima, međusobna povezanost nije tako snažna u slučaju komplikacije kliničkog stanja sepse koje zahtjeva upotrebu IMV ($\rho=0.560$, $p=0.003$) (slika 5.6 B). U non-IMV skupini uočena je i vrlo slaba povezanost obaju endokanabinoida s proupalnim biljekom IL-6 i protuupalnim biljekom IL-10 (tablica 5.13). Endokanabinoidi i upalni biljezi nisu pokazali značajnu međusobnu povezanost u IMV skupini ispitanika.

Tablica 5.12. Osnovne značajke ispitanika oboljelih od sepse s obzirom na potrebu za invazivnom mehaničkom ventilacijom

VARIJABLA	IMV (N=26)	Non-IMV (N=80)	P
DEMOGRAFSKE KARAKTERISTIKE			
Muškarci, N (%)	10 (39)	32 (40)	0.927*
Dob, medijan (raspon)	70 (39-84)	73 (27-94)	0.120‡
IZVOR UPALE, N (%)			
Dišni sustav	20 (77)	23 (29)	<0.001*
Mokraćni sustav	2 (8)	37 (46)	0.003†
Ostale bolesti ^a	3 (12)	14 (18)	0.556†
Nedefiniran izvor	1 (3)	6 (3)	1.000†
BODOVNI SUSTAVI U SEPSI, medijan (IQR)			
qSOFA	2 (2-3)	1 (1-2)	0.002‡
SOFA	12 (11-15)	8 (6-10)	<0.001‡
LABORATORIJSKA MJERENJA, medijan (IQR)			
Leukociti ($\times 10^9/L$)	12.9 (10.0-17.2)	13.6 (10.6-19.5)	0.602‡
Eritrociti ($\times 10^{12}/L$)	3.29 (2.80-4.03)	4.07 (3.43-4.54)	0.006‡
Hemoglobin (g/L)	94 (87-117)	118 (101-136)	0.003‡
Hematokrit (L/L)	0.293 (0.268-0.359)	0.362 (0.297-0.403)	0.015‡
MCHC (g/L)	325 (313-329)	337 (325-343)	0.003‡
Protrombinsko vrijeme, udio	0.66 (0.50-0.89)	0.84 (0.57-1.04)	0.171‡
D-dimeri ($\mu g/L$)	2137 (1814-5727)	3681 (1444-7623)	0.674‡
Fibrinogen (g/L)	6.5 (5.3-8.7)	6.6 (5.2-7.7)	0.720‡
pH	7.352 (7.189-7.455)	7.378 (7.329-7.428)	0.447‡
pO ₂ (kPa)	6.44 (5.19-7.83)	8.36 (6.74-9.32)	0.013‡
pCO ₂ (kPa)	4.75 (3.76-6.68)	4.43 (3.90-5.25)	0.158‡
sO ₂ (%)	80 (70-90)	92 (88-96)	<0.001‡
Albumin (g/L)	20.9 (19.3-25.4)	26.9 (23.1-29.4)	<0.001‡
C-reaktivni protein (g/L)	282.9 (229.3-352.0)	217.8 (170.7-295.4)	0.008‡
Prokalcitonin ($\mu g/L$)	5.80 (2.41-21.81)	4.21 (0.84-18.44)	0.249‡
Interleukin-6 (ng/L)	93.2 (71.9-227.1)	64.3 (33.7-181.4)	0.073‡
Interleukin-10 (ng/L)	26.7 (0.7-80.9)	20.6 (0.7-54.2)	0.769‡
Urea (mmol/L)	22.6 (12.4-31.4)	14.0 (8.9-21.2)	0.032‡
Kreatinin ($\mu mol/L$)	282 (108-423)	142 (97-215)	0.025‡
ENDOKANABINOIDI, medijan (IQR)			
Anandamid ($\mu g/L$)	5.94 (2.04-9.44)	6.70 (3.50-27.04)	0.043‡
2-AG ($\mu g/L$)	5.68 (2.30-8.60)	9.58 (4.83-40.05)	0.002‡

^aOstale bolesti: karcinomi, infekcija centralnog venskog katetera, akutni kolecistitis

Skraćenice: IMV, invazivna mehanička ventilacija; IQR, interkvartilni raspon (engl. *Interquartile Range*); qSOFA ljestvica (engl. *quick Sequential Organ Failure Assessment*); SOFA ljestvica (engl. *Sequential Organ Failure Assessment*); MCHC, srednja stanična koncentracija hemoglobina (engl. *Mean Cellular Hemoglobin Concentration*); pO₂, parcijalni tlak kisika; pCO₂, parcijalni tlak ugljičnog dioksida; sO₂, saturacija hemoglobina kisikom; anandamid, arahidonoleitolamin; 2-AG, 2-arahidonoleilglicerol; * χ^2 test; †Fisherov egzaktan test; ‡Mann-Whitney test



Slika 5.6. Povezanost endokanabinoida anandamida i 2-arahidonoilglicerola ovisno o ishodu potrebe invazivne mehaničke ventilacije

Skraćenice: IMV, invazivna mehanička ventilacija; anandamid, arahidonoiletanolamid; 2-AG, 2-arahidonoilglicerol

Tablica 5.13. Povezanost koncentracije endokanabinoida, proupalnih i protuupalnih biljega po prijemu ispitanika koji tijekom liječenja nisu trebali invazivnu mehaničku ventilaciju

ρ (p)*	AEA	2-AG	IL-6	IL-10	CRP	PCT	Leuko
AEA	-	0.849 (<0.001)	0.314 (0.005)	0.272 (0.015)	-0.074 (0.517)	-0.138 (0.423)	0.024 (0.831)
2-AG	0.849 (<0.001)	-	0.233 (0.038)	0.231 (0.040)	-0.103 (0.364)	-0.093 (0.591)	0.093 (0.410)
IL-6	0.314 (0.005)	0.233 (0.038)	-	0.367 (<0.001)	0.141 (0.212)	0.094 (0.586)	<0.001 (0.993)
IL-10	0.272 (0.015)	0.231 (0.040)	0.367 (<0.001)	-	-0.034 (0.765)	0.194 (0.256)	0.155 (0.169)
CRP	-0.074 (0.517)	-0.103 (0.364)	0.141 (0.212)	-0.034 (0.765)	-	0.218 (0.201)	<0.001 (0.999)
PCT	-0.138 (0.423)	-0.093 (0.591)	0.094 (0.586)	0.194 (0.256)	0.218 (0.201)	-	0.121 (0.484)
Leuko	0.024 (0.831)	0.093 (0.410)	<0.001 (0.993)	0.155 (0.169)	<0.001 (0.999)	0.121 (0.484)	-

Povezanost*

- ρ 0 do ± 0.25
nema povezanosti
- ρ 0.25 do ± 0.50
slaba povezanost
- ρ 0.50 do ± 0.75
umjerena do dobra povezanost
- ρ 0.75 do ± 1.00
vrlo dobra do izvrsna povezanost

Skraćenice: AEA (anandamid), arahidonoiletanolamin; 2-AG, 2-arahidonoilglicerol; IL-6, interleukin-6; IL-10, interleukin-10; CRP, C-reaktivni protein; PCT, prokalcitonin; Leuko, leukociti. *Spearmanov koeficijent korelacije, rho

5.4.1. Prognoza potrebe za invazivnom mehaničkom ventilacijom

Analizom krivulje osjetljivosti testa (ROC analizom) ispitana je mogućnost upotrebe endokanabinoida anandamida i 2-AG kao ranih biljega koji bi već po prijemu na liječenje prepoznali bolesnika čije kliničko stanje može zahtijevati mehaničku potporu disanja. Analizom je utvrđeno da su oba endokanabinoida rani prognostički pokazatelji potrebe za IMV u liječenju oboljelih od sepse. Anandamid je pri graničnoj vrijednosti ≤ 21.64 $\mu\text{g/L}$ pokazao

najveću osjetljivost (100%, 95%CI 87-100) u predviđanju potrebe za uvođenjem IMV, iako vrlo slabu specifičnost (28%, 95%CI 18-39). 2-AG pri optimalnoj graničnoj vrijednosti od ≤ 6.60 $\mu\text{g/L}$ imao je najbolju osjetljivost i specifičnost od 69% (95%CI 48-86% za osjetljivost i 57-79% za specifičnost) u ranoj predikciji potrebe za IMV kod bolesnika oboljelih od sepse. Od svih upalnih biljega samo je CRP mjereno po prijemu na liječenje razlikovao bolesnike kojima će trebati IMV bio je CRP. Rezultati analize krivulje osjetljivosti rane predikcije potrebe za IMV u sepsi prikazani su u tablici 5.14.

Tablica 5.14. Prognostička točnost endokanabinoida i biljega upale u razlikovanju potrebe za uvođenjem IMV u liječenje oboljelih od sepse

Varijabla	AUC (95% CI)	p	Granična vrijednost	Osjetljivost (95% CI)	Specifičnost (95% CI)	LR+ (95% CI)	LR- (95% CI)
AEA ($\mu\text{g/L}$)	0.63 (0.53-0.72)	0.032	≤ 21.64	100 (87-100)	28 (18-39)	1.4 (1.2-1.6)	0
2-AG ($\mu\text{g/L}$)	0.70 (0.60-0.79)	<0.001	≤ 6.60	69 (48-86)	69 (57-79)	2.2 (1.5-3.4)	0.5 (0.2-0.8)
CRP (mg/L)	0.67 (0.58-0.76)	0.005	> 227.6	77 (56-91)	60 (48-71)	1.9 (1.4-2.7)	0.4 (0.2-0.8)
PCT ($\mu\text{g/L}$)	0.62 (0.52-0.71)	0.057	> 4.21	69 (48-86)	58 (46-69)	1.6 (1.1-2.3)	0.5 (0.3-1.0)
IL-6 (ng/L)	0.62 (0.52-0.71)	0.053	69.1	77 (56-91)	54 (42-65)	1.7 (1.2-2.3)	0.4 (0.2-0.9)
IL-10 (ng/L)	0.52 (0.42-0.62)	0.782	> 22	58 (37-78)	55 (44-66)	1.3 (0.9-1.9)	0.8 (0.5-1.3)
Leuko ($\times 10^9/\text{L}$)	0.53 (0.44-0.63)	0.610	≤ 14.9	69 (48-86)	45 (34-57)	1.3 (0.9-1.7)	0.7 (0.4-1.3)

Skraćenice: AUC, površina ispod krivulje osjetljivosti testa; CI, interval pouzdanosti (engl. *Confidence Interval*); AEA (anandamid), arahidonoiletanolamin; 2-AG, 2-arahidonoilglicerol; CRP, C-reaktivni protein; PCT, prokalcitonin; IL-6, interleukin-6; IL-10, interleukin-10; Leuko, leukociti.

5.4.2. Analiza čimbenika rizika za upotrebu invazivne mehaničke ventilacije u liječenju sepse

Univarijatna logistička regresijska analiza pokazala je da su endokanabinoidi anandamid i 2-AG čimbenici rizika za uvođenje IMV u liječenje sepse. Međutim, nakon što su u multivarijatni regresijski model uključene sve varijable koje utječu na ishod potrebe za IMV, jedini nezavisni rani čimbenici rizika za IMV bili su bodovni sustavi qSOFA i SOFA, sO_2 i endokanabinoid anandamid. Omjer izgleda za potrebu uvođenja IMV smanjio se za više od 20% s porastom koncentracije anandamida za 1 $\mu\text{g/L}$ (tablica 5.15).

Tablica 5.15. Analiza ranih čimbenika rizika za potrebu uvođenja invazivne mehaničke ventilacije bolesnicima oboljelim od sepse

VARIJABLA	UNIVARIJATNA LOGISTIČKA REGRESIJSKA ANALIZA		MULTIVARIJATNA LOGISTIČKA REGRESIJSKA ANALIZA	
	OR (95% CI)	p	OR (95% CI)	p
Dob	0.97 (0.93-0.99)	0.026		
Spol (M)	0.94 (0.38-2.32)	0.889		
MAP	0.95 (0.92-0.98)	0.002		
Tjelesna težina	0.97 (0.94-0.99)	0.036	0.92 (0.85-1.01)	0.052
qSOFA	2.35 (1.35-4.07)	0.002	0.12 (0.02-0.69)	0.018
SOFA	1.83 (1.43-2.35)	<0.001	4.57 (1.87-11.18)	<0.001
pH	0.03 (0.01-2.49)	0.118		
pO ₂	0.80 (0.66-0.97)	0.023		
pCO ₂	1.21 (1.01-1.46)	0.041		
sO ₂	0.92 (0.88-0.96)	<0.001	0.79 (0.67-0.93)	0.005
Anandamid	0.93 (0.88-0.99)	0.027	0.79 (0.67-0.93)	0.004
2-AG	0.95 (0.91-0.99)	0.035		
C-reaktivni protein	1.01 (1.00-1.01)	0.017		
Prokalcitonin	0.99 (0.99-1.01)	0.659		
Interleukin-6	1.00 (0.99-1.01)	0.152		
Interleukin-10	1.00 (0.99-1.01)	0.942		
Leukociti	1.01 (0.94-1.06)	0.973		
NEUT%	1.02 (0.98-1.07)	0.265		
MONO%	0.77 (0.63-0.94)	0.012		
Hemoglobin	0.97 (0.95-0.99)	0.005		
MCHC	0.95 (0.92-0.99)	0.003		
aPTV	3.70 (1.04-13.15)	0.043		
GGT	1.01 (1.01-1.02)	0.038		
Bilirubin	1.02 (0.99-1.05)	0.100		

Nastavak tablice 5.15.				
VARIJABLA	UNIVARIJATNA LOGISTIČKA REGRESIJSKA ANALIZA		MULTIVARIJATNA LOGISTIČKA REGRESIJSKA ANALIZA	
	OR (95% CI)	p	OR (95% CI)	p
Albumin	0.82 (0.73-0.92)	0.001		
Urea	1.04 (0.99-1.08)	0.055		
Kreatinin	1.00 (1.00-1.01)	0.006		

Skraćenice: OR, omjer izgleda (*engl. Odds Ratio*); CI, interval pouzdanosti (*engl. Confidence Interval*); MAP, srednji arterijski tlak (*engl. Mean Arterial Pressure*); qSOFA ljestvica (*engl. quick Sequential Organ Failure Assessment*); SOFA ljestvica (*engl. Sequential Organ Failure Assessment*); pO₂, parcijalni tlak kisika; pCO₂, parcijalni tlak ugljičnog dioksida; sO₂, saturacija hemoglobina kisikom; 2-AG, 2-arahidonoilglicerol; NEUT%, postotak neutrofilnih granulocita; MONO%, postotak monocita; MCHC, srednja stanična koncentracija hemoglobina (*engl. Mean Cellular Hemoglobin Concentration*); aPTV, aktivirano parcijalno tromboplastinsko vrijeme; GGT, gama-glutamil transferaza.

Jednadžba modela A logističke regresijske analize je slijedeća:

$$\text{logit}(p) = 18.181 - 0.240 \times (\text{anandamid}) - 2.113 \times (\text{qSOFA}) + 1.520 \times (\text{SOFA}) - 0.239 \times (\text{sO}_2) \quad (3)$$

Hosmer-Lemeshow testom testirana je statistička značajnost dobivenog regresijskog modela u razlikovanju bolesnika koji će tijekom liječenja trebati potporu mehaničke ventilacije. Rezultati testa pokazali su da regresijski model statistički značajno razlikuje bolesnike s potrebom za IMV u liječenju sepse (χ^2 1.285, DF 8, p=0.996). Upotrebom opisanog regresijskog modela za 90% ispitanika ispravno je prognozirana potreba za IMV (tablica 5.16. A).

Prognostička točnost vjerojatnosti potrebe za IMV u oboljelih od sepse upotrebom prikazanog regresijskog modela, koji uključuje endokanabinoid anandamid, sO₂ te sustave bodovanja qSOFA i SOFA kao nezavisne prediktivne varijable, bila je AUC=0.967 (95%CI 0.945 – 0.999). Osjetljivost i specifičnost ovog modela u predviđanju potrebe za IMV bila je 100% (slika 5.7).

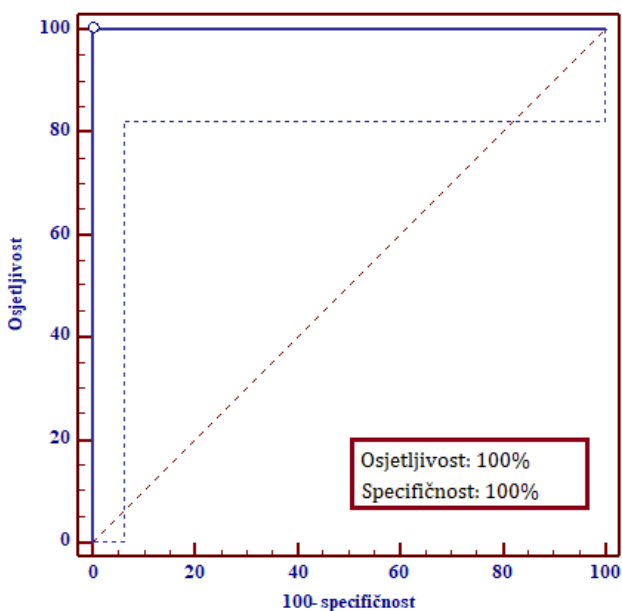
Radi ocjene jačine doprinosa endokanabinoida modelu rane prognoze potrebe za IMV u sepsi, provedena je logistička regresijska analiza s uključenim svim nezavisnim varijablama koje su uključene i u model A (varijable sa statističkom značajnosti <0.1 u univarijatnoj analizi prikazane u tablici 5.16), osim endokanabinoida anandamida i 2-AG. Regresijski model B je kao nezavisne čimbenike rizika za IMV izdvojio sO₂ i sustave bodovanja qSOFA i SOFA. Međutim, omjeri izgleda za IMV sve tri varijable bili su manji nego u modelu A (OR (sO₂) 0.91, 95%CI 0.86-0.96; OR (qSOFA) 0.35, 95%CI 0.13-0.93; OR (SOFA) 2.22, 95%CI 1.56-3.15).

Tablica 5.16. Vrijednost modela logističke regresijske analize u razlikovanju potrebe za invazivnom mehaničkom ventilacijom oboljelih od sepse

MODEL A – regresijski model sa endokannabinoidima					
		POTREBA IMV U SEPSI		Udio točno klasificiranih	Negelkerke R ²
		Predviđeno modelom A			
POTREBA IMV U SEPSI		NE	DA		
Promatrane skupine	NE	69	11	86%	0.873
	DA	0	26	100%	
% točno klasificiranih pacijenata upotrebom modela A				90%	

MODEL B – regresijski model bez endokannabinoida					
		POTREBA IMV U SEPSI		Udio točno klasificiranih	Negelkerke R ²
		Predviđeno modelom b			
POTREBA IMV U SEPSI		NE	DA		
Promatrane skupine	NE	52	28	65%	0.675
	DA	0	26	100%	
% točno klasificiranih pacijenata upotrebom modela B				74%	

Skraćenice: IMV, invazivna mehanička ventilacija



Slika 5.7. Rezultati analize krivulje osjetljivosti prognostičke točnosti regresijskog modela A u razlikovanju oboljelih od sepse koji su trebali invazivnu mehaničku ventilaciju

Model B, koji nije uključivao endokanabinoide, kao čimbenike rizika za IMV, ispravno je klasificirao manje ispitanika nego model A (74%; tablica 5.16 B).

Uključivanjem i endokanabinoida anandamida kao nezavisnog čimbenika rizika, značajno se povećava vrijednost regresijskog modela u ranoj prognozi potrebe za IMV u liječenju sepse.

5.5. ISHOD 2c: Potreba za terapijom vazopresorima

Tijekom hospitalizacije 28 (26%) bolesnika trebalo je vazoaktivnu potporu. Od vazopresora najčešće korišten je noradrenalin, dok je u dva slučaja korišten adrenalin. Svi ispitanici kojima je bila potrebna vazoaktivna potpora liječeni su u jedinici intenzivnog liječenja. Od ukupnog broja ispitanika kojima je bila potrebna vazoaktivna potpora, 25 (89%) ispitanika je preminulo. Svi ispitanici koji su trebali vazoaktivnu potporu već po prijemu imali su značajno niži krvni tlak (MAP 66; 56-72 mmHg) i sustavi bodovanja qSOFA i SOFA ukazivali su na teško kliničko stanje. Oba sustava bodovanja u izračun uključuju srednji arterijski tlak kao važnu sastavnicu koja značajno doprinosi lošijim vrijednostima izračuna. Oštećenje vitalnih organa, poput pluća, bubrega i jetre, već po dolasku na liječenje bio je izraženiji u skupini oboljelih koji su kasnije tijekom hospitalizacije trebali vazoaktivnu potporu za održavanje krvnog tlaka. Također, ovi ispitanici imali su značajno niže vrijednosti endokanabinoida anandamida ($p < 0.001$). 2-AG nije značajno razlikovao dvije ispitivane skupine bolesnika. Osnovna obilježja bolesnika ovisno o potrebi za vazoaktivnom terapijom prikazana su u tablici 5.17.

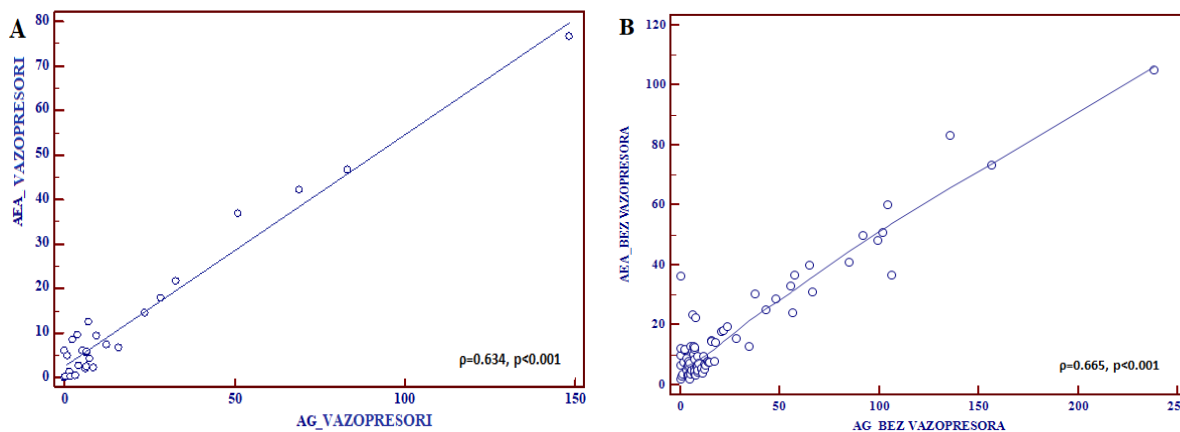
I u slučaju praćenog ishoda potrebe za vazoaktivnom terapijom, endokanabinoidi anandamid i 2-AG pokazali su visok stupanj međusobne korelacije (slika 5.8).

Tablica 5.17. Osnovne značajke ispitanika oboljelih od sepse ovisno o potrebi za vazoaktivnom terapijom

VARIJABLA	VAZOAKTIVNA POTPORA (N=28)	BEZ VAZOAKTIVNE POTPORE (N=78)	P
DEMOGRAFSKE KARAKTERISTIKE			
Muškarci, N (%)	8 (29)	33 (42)	0.260 [†]
Dob, medijan (raspon)	66 (35-87)	73 (27-94)	0.112 [‡]
IZVOR UPALE, N (%)			
Dišni sustav	14 (50)	29 (37)	0.267*
Mokraćni sustav	8 (29)	31 (40)	0.364 [†]
Ostale bolesti ^a	4 (14)	12 (15)	1.000 [†]
Nedefiniran izvor	2 (7)	5 (6)	1.000 [†]
BODOVNI SUSTAVI U SEPSI, medijan (IQR)			
qSOFA	2 (2-3)	1 (1-2)	<0.001 [‡]
SOFA	11 (9-13)	5 (3-7)	<0.001 [‡]
GCS	11 (5-13)	15 (12-15)	<0.001 [‡]
KLINIČKA MJERENJA, medijan (IQR)			
MAP (mmHg)	66 (56-72)	77 (69-91)	<0.001 [‡]
sO ₂ (%)	82 (71-90)	92 (88-96)	<0.001 [‡]
LABORATORIJSKA MJERENJA, medijan (IQR)			
Leukociti (×10 ⁹ /L)	13.3 (10.3-17.1)	13.6 (10.5-19.7)	0.496 [‡]
Hemoglobin (g/L)	102 (90-125)	115 (96-134)	0.142 [‡]
Neutrofili (%)	77 (71-86)	72 (61-77)	0.006[‡]
Nesegmentirani neutrofili(%)	5 (2-11)	9 (4-15)	0.036[‡]
Monociti (%)	3 (2-7)	6 (3-8)	0.039[‡]
Protrombinsko vrijeme, udio	0.59 (0.46-0.89)	0.87 (0.59-1.04)	0.041[‡]
aPTV (omjer)	0.99 (0.81-1.27)	0.96 (0.90-1.10)	0.682 [‡]
D-dimeri (µg/L)	3691 (1337-7832)	3265 (1485-6974)	0.974 [‡]
ALT (U/L)	41 (19-88)	22 (15-40)	0.028[‡]
GGT (U/L)	48 (29-202)	30 (18-56)	0.007[‡]
Albumin (g/L)	20.9 (19.3-26.3)	26.9 (22.7-29.2)	<0.001 [‡]
C-reaktivni protein (g/L)	258.9 (189.4-352.8)	221.4 (173.6-302.4)	0.200 [‡]
Prokalcitonin (µg/L)	10.95 (5.26-48.13)	2.38 (0.84-14.74)	0.012[‡]
Interleukin-6 (ng/L)	98.3 (74.4-498.7)	68.7 (33.7-174.5)	0.012[‡]
Interleukin-10 (ng/L)	36.5 (16.1-94.8)	17.9 (0.9-54.5)	0.048[‡]
Urea (mmol/L)	20.5 (13.4-31.3)	13.4 (8.3-21.6)	0.014[‡]
Kreatinin (µmol/L)	170 (133-382)	139 (91-231)	0.043[‡]
ENDOKANABINOIDI, medijan (IQR)			
Anandamid (µg/L)	5.98 (2.38-8.94)	9.54 (5.72-22.52)	<0.001 [‡]
2-AG (µg/L)	6.53 (2.83-19.70)	8.33 (4.30-23.45)	0.247 [‡]

^aOstale bolesti: karcinomi, infekcija centralnog venskog katetera, akutni kolecistitis

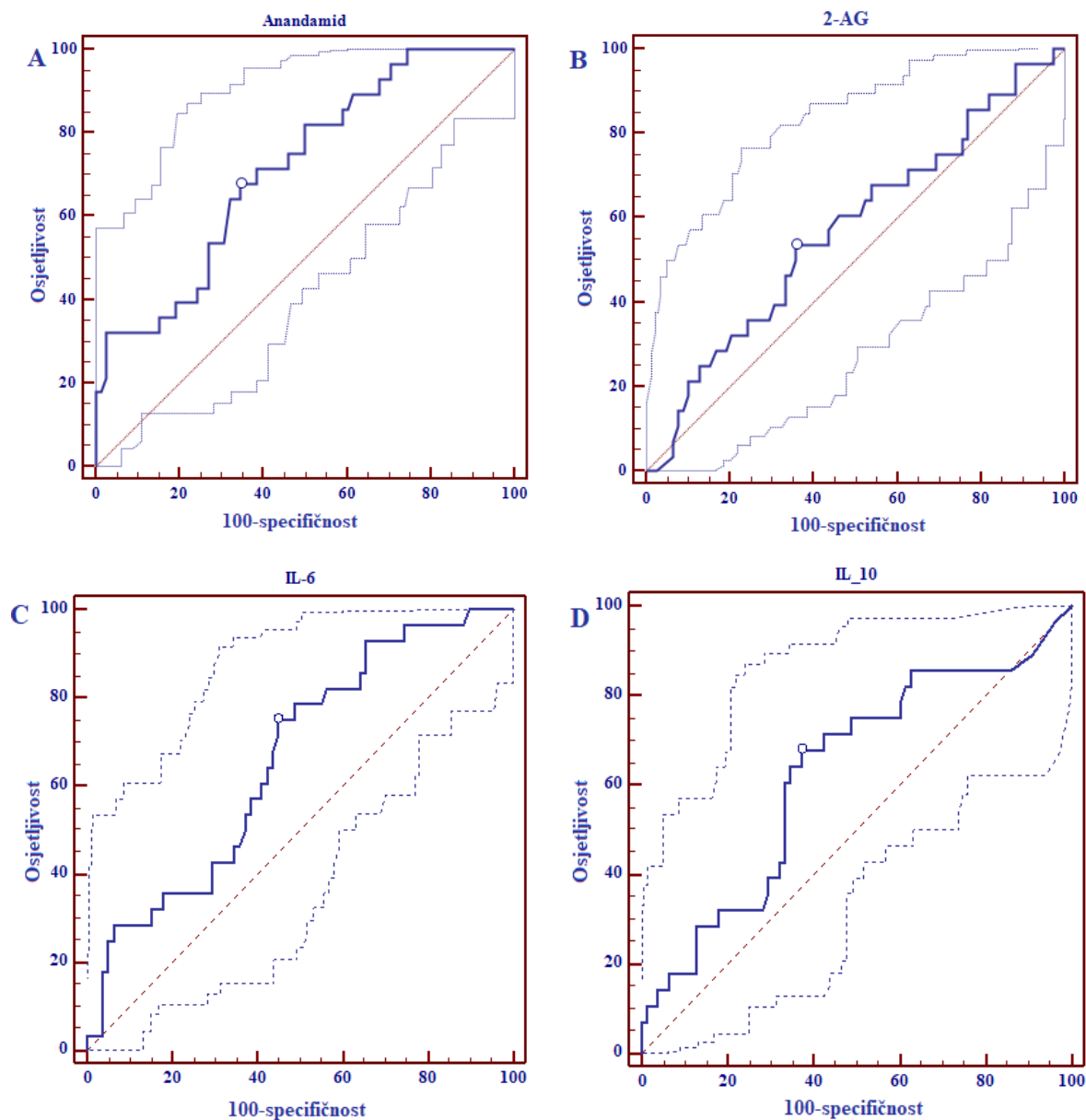
Tablica 5.17. - Skraćenice: IQR, interkvartilni raspon (engl. *Interquartile Range*); qSOFA ljestvica (engl. *quick Sequential Organ Failure Assessment*); SOFA ljestvica (engl. *Sequential Organ Failure Assessment*); GCS, Glasgowska skala kome; MAP, srednji arterijski tlak (engl. *Mean arterial pressure*); aPTV, aktivirano parcijalno tromboplastinsko vrijeme; ALT, alanin aminotransferaza; GGT, gama-glutamil transferaza; CK-MBa, aktivnost MB podjedinice kreatin kinaze; anandamid, arahidonoiletanolamin; 2-AG, 2-arahidonoilglicerol; * χ^2 test; †Fisherov egzakti test; ‡Mann-Whitney test



Slika 5.8. Povezanost endokanabinoida anandamida i 2-arahidonoilglicerola ovisno o potrebi za vazoaktivnom terapijom

5.5.1. Prognoza potrebe za vazoaktivnom terapijom u sepsi

Analizom krivulje osjetljivosti (ROC analizom) ispitana je prognostička točnost endokanabinoida i biljega upale u razlikovanju dviju skupina ispitanika oboljelih od sepse, ovisno o ishodu potrebe za vazoaktivnom terapijom. Rezultati su pokazali da je od dva ispitivana endokanabinoida samo anandamid rani pokazatelj potrebe za vazoaktivnom potporom u liječenju hipotenzije u sepsi. Od ispitivanih upalnih biljega, proupalni biljezi PCT i IL-6 te protuupalni biljeg IL-10 bili su značajni pokazatelji potrebe za uvođenjem vazoaktivne terapije u liječenje. Površina ispod krivulje, AUC, najveća je za anandamid, 0.716 (95%CI 0.620-0.799, $p<0.001$), potom slijedi PCT sa AUC 0.700 (95%CI 0.566-0.813, $p=0.004$), IL-6 sa AUC 0.661 (95%CI 0.562-0.719, $p=0.005$) i IL-10 s AUC 0.627 (95%CI 0.527-0.719, $p=0.044$). Krivulje osjetljivosti i granične vrijednosti s najvećom osjetljivošću i specifičnošću za razlikovanje septičnih pacijenata koji su trebali vazoaktivnu potporu tijekom hospitalizacije, prikazane su na slici 5.9 i tablici 5.18.



Slika 5.9. Rezultati analize krivulje osjetljivosti endokanabinoida anandamida (A) i 2-arahidonoilglicerola (B) te biljega upale interleukina-6 (C) i interleukina-10 (D) u razlikovanju potrebe za vazoaktivnom potporom u liječenju hipotenzije u sepsi

Tablica 5.18. Prognostička točnost endokanabinoida, proupalnih i protuupalnih biljega u razlikovanju pacijenata sa i bez potrebe za vazoaktivnom terapijom u liječenju sepse

Varijabla	Granična vrijednost	Osjetljivost (95% CI)	Specifičnost (95% CI)	LR+ (95% CI)	LR- (95% CI)	P
AEA (µg/L)	≤6.96	68% (48-84)	65% (54-76)	1.96 (1.30-2.90)	0.49 (0.30-0.90)	<0.001
2-AG (µg/L)	≤6.60	54% (34-73)	64% (52-75)	1.49 (0.90-2.40)	0.72 (0.50-1.10)	0.249
CRP (mg/L)	>227.6	64% (44-81)	56% (45-68)	1.47 (1.00-2.10)	0.63 (0.40-1.10)	0.214
PCT (µg/L)	>4.66	81% (58-95)	60% (42-75)	2.00 (1.30-3.10)	0.32 (0.10-0.80)	0.004
IL-6 (ng/L)	>74.1	75% (55-89)	55% (43-66)	1.67 (1.20-2.30)	0.45 (0.20-0.90)	0.005
IL-10 (ng/L)	>28.1	68% (48-84)	63% (51-74)	1.83 (1.20-2.70)	0.51 (0.30-0.90)	0.044
Leuko (×10 ⁹ /L)	≤20.6	93% (77-99)	24% (15-35)	1.23 (1.10-1.40)	0.29 (0.07-1.20)	0.468

Skraćenice: AUC, površina ispod krivulje osjetljivosti testa; CI, interval pouzdanosti; AEA (anandamid), arahidonoiletanolamin; 2-AG, 2-arahidonoilglicerol; CRP, C-reaktivni protein; PCT, prokalcitonin; IL-6, interleukin-6; IL-10, interleukin-10; Leuko, leukociti.

5.5.2. Analiza čimbenika rizika za upotrebu vazoaktivne potpore u liječenju sepse

Logističkom regresijskom analizom ispitano je jesu li endokanabinoidi anandamid i 2-AG rani čimbenici rizika za potrebu uvođenja vazoaktivne potpore radi održavanja krvnog tlaka kod oboljelih od sepse. Univarijatna logistička regresijska analiza pokazala je da su endokanabinoid anandamid, proupalni biljeg IL-6, udio monocita i neutrofila, srednji arterijski tlak, sustavi bodovanja izračunati po prijemu bolesnika (qSOFA i SOFA) te biljezi funkcije jetre (GGT, albumin), bubrega (urea, kreatinin) i pluća (sO₂) rani čimbenici rizika za upotrebu vazoaktivne terapije u liječenju sepse. Nakon što su u multivarijatni model logističke regresijske analize uključeni svi statistički značajni biljezi, samo su se anandamid, sustav bodovanja SOFA, puls i kreatinin pokazali kao nezavisni rani čimbenici rizika za potrebu uvođenja vazoaktivne terapije u sepsi. Omjer izgleda za upotrebu vazoaktivne terapije smanjio se za 9% s porastom koncentracije anandamida za 1 µg/L. Čimbenik rizika koji najznačajnije utječe na ishod potrebe za vazoaktivnom terapijom je SOFA sustav bodovanja, čiji porast povećava izgleda za 3.13 puta (tablica 5.19).

Tablica 5.19. Analiza ranih čimbenika rizika za potrebom uvođenja vazoaktivne potpore u liječenje oboljelih od sepse

VARIJABLA	UNIVARIJATNA LOGISTIČKA REGRESIJSKA ANALIZA		MULTIVARIJATNA LOGISTIČKA REGRESIJSKA ANALIZA	
	OR (95% CI)	p	OR (95% CI)	p
Dob	0.98 (0.95-1.01)	0.112		
MAP	0.94 (0.90-0.97)	<0.001		
sO ₂	0.94 (0.91-0.98)	0.001		
Puls	0.98 (0.97-1.01)	0.074	0.98 (0.95-1.01)	0.013
GCS	0.78 (0.69-0.88)	<0.001		
qSOFA	2.72 (1.55-4.75)	<0.001		
SOFA	2.01 (1.52-2.68)	<0.001	3.13 (1.79-5.46)	<0.001
Anandamid	0.90 (0.83-0.97)	0.020	0.91 (0.82-0.99)	0.008
2-AG	0.99 (0.98-1.01)	0.435		
C-reaktivni protein	1.00 (0.99-1.01)	0.169		
Prokalcitonin	1.00 (0.99-1.01)	0.096		
Interleukin-6	1.01 (1.01-1.02)	0.047		
Interleukin-10	1.01 (0.99-1.03)	0.096		
Leukociti	0.97 (0.91-1.03)	0.279		
NEUT%	1.07 (1.02-1.13)	0.011		
LIMFO%	0.97 (0.91-1.04)	0.398		
MONO%	0.82 (0.68-0.99)	0.043		
ALT	1.00 (0.99-1.01)	0.869		
GGT	1.01 (1.01-1.02)	0.003		
Albumin	0.85 (0.76-0.94)	0.002		
Urea	1.04 (1.01-1.08)	0.044		
Kreatinin	1.02 (1.01-1.04)	0.049	0.99 (0.82-1.01)	0.008

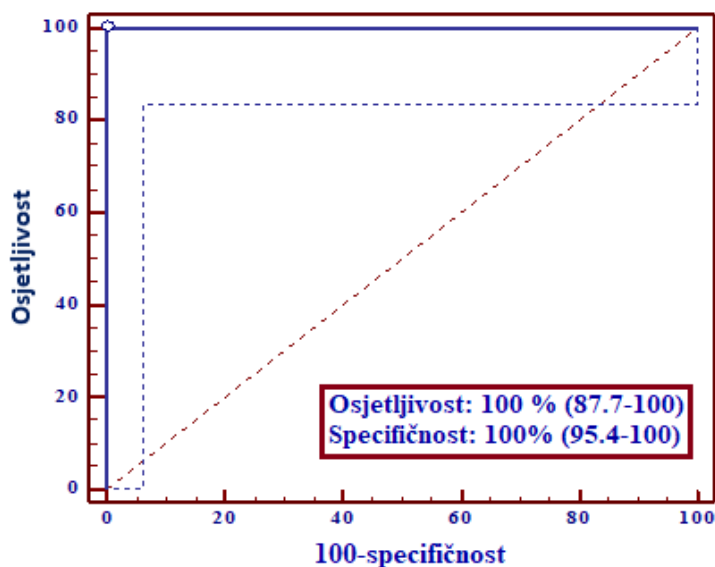
Skraćenice: OR, omjer izgleda (*engl. Odds Ratio*); CI, interval pouzdanosti (*engl. Confidence Interval*); MAP, srednji arterijski tlak (*engl. Mean Arterial Pressure*); sO₂, saturacija hemoglobina kisikom; GCS, Glasgowska skala kome; qSOFA ljestvica (*engl. quick Sequential Organ Failure Assessment*); SOFA ljestvica (*engl. Sequential Organ Failure Assessment*); 2-AG, 2-arahidonoilglicerol; NEUT%, postotak neutrofilnih granulocita; LYM%, postotak limfocita; MONO%, postotak monocita; ALT, alanin aminotransferaza; GGT, gama-glutamil transferaza.

Jednadžba modela logističke regresijske analize je:

$$\text{logit}(p) = -5.310 - 0.093 \times (\text{anandamid}) - 0.009 \times (\text{kreatinin}) - 0.023 \times (\text{puls}) + 1.140 \times (\text{SOFA}) \quad (4)$$

Hosmer-Lemeshow test pokazao je da regresijski model statistički značajno razlikuje pacijente koji će trebati vazoaktivnu potporu ($\chi^2=3.276$, $DF=8$, $p=0.916$). Ovaj model pravilno je klasificirao 91% pacijenata koji su trebali vazoaktivnu potporu (tablica 5.20 A).

Prognostička točnost potrebe za vazoaktivnom terapijom u oboljelih od sepse ocjenjena prikazanim regresijskim modelom (jednadžba 4) bila je AUC 0.966 (95%CI 0.911-0.991). Prognostička osjetljivost i specifičnost ovog modela u razlikovanju pacijenata kojima je potrebna vazoaktivna terapija, u odnosu na one kojima nije, bila je 100% (slika 5.10).



Slika 5.10. Rezultati analize krivulje osjetljivosti prognostičke točnosti regresijskog modela A u razlikovanju oboljelih od sepse koji su trebali vazoaktivnu terapiju

Kako bi se ocijenila jačina doprinosa anandamida regresijskom modelu rane prognoze potrebe za vazoaktivnom potporom u sepsi, učinjena je multivarijatna logistička regresijska analiza sa svim varijablama kao i u modelu A, ali bez endokanabinoida anandamida (model B).

Tablica 5.20. Vrijednost modela logističke regresijske analize u razlikovanju potrebe za uvođenjem vazoaktivne potpore oboljelima od sepse

MODEL A – regresijski model sa endokanabinoidima					
		POTREBA ZA VAZOPRESORIMA U SEPSI			
		Predviđeno modelom A		Udio točno klasificiranih	Negelkerke R ²
POTREBA ZA VAZOPRESORIMA U SEPSI		NE	DA		
Promatrane skupine	NE	74	4	95%	0.770
	DA	6	22	79%	
% točno klasificiranih pacijenata upotrebom modela A				91%	

MODEL B – regresijski model bez endokanabinoida					
		POTREBA ZA VAZOPRESORIMA U SEPSI			
		Predviđeno modelom B		Udio točno klasificiranih	Negelkerke R ²
POTREBA ZA VAZOPRESORIMA U SEPSI		NE	DA		
Promatrane skupine	NE	75	3	96%	0.770
	DA	7	21	75%	
% točno klasificiranih pacijenata upotrebom modela B				91%	

Regresijski model B je kao nezavisne čimbenike rizika za potrebu vazoaktivne potpore izdvojio koncentracije kreatinina i bilirubina, puls te sustave bodovanja qSOFA i SOFA. Međutim, koncentracija bilirubina i qSOFA sustav bodovanja nisu statistički značajno doprinili modelu prognostičke osjetljivosti ($p=0.084$ za bilirubin i $p=0.060$ za qSOFA). Regresijski model B koji nije uključivao endokanabinoid anandamid kao nezavisni čimbenik rizika potrebe za vazoaktivnom terapijom, pravilno je klasificirao jednak postotak pacijenata kao regresijski model A, koji je uključivao i endokanabinoid anandamid (tablica 5.20 B).

Iako je endokanabinoid anandamid nezavisni čimbenik rizika za potrebu uvođenja vazoaktivne terapije u liječenje septičnih bolesnika, nema veliki doprinos prikazanom prognostičkom modelu. Najznačajniji u ranoj prognozi potrebe za uvođenjem vazoaktivne terapije pokazao se SOFA sustav bodovanja.

6. RASPRAVA

Od otkrića prvih endogeno prisutnih kanabinoida i njihovih receptora prije 30 godina, ECS probudio je znatiželju brojnih istraživača zbog svoje uloge modulatora različitih funkcija stanica i organa u zdravlju i bolesti. Djelujući preko CB2R, endokanabinoidi reguliraju i moduliraju funkcije i aktivnost stanica urođene i stečene imunosti, što ih čini važnim sudionikom upalnog odgovora organizma. Iako je medicinski poznata već stoljećima, sepsa kao najteži sustavni oblik upalnog odgovora organizma i danas, u 21. stoljeću, predstavlja zdravstveni i terapijski izazov. Sepsa zahvaća brojne organske sustave, očituje se naglom i intenzivnom aktivacijom mehanizama urođene i stečene imunosti i oštećenjem endotelnih barijera, što posljedično dovodi do sustavnog oštećenja i zatajenja organa. Još je mnogo neodgovorenih pitanja o patofiziološkim procesima razvoja sepse, što otežava rano prepoznavanje trenutka u kojemu lokalizirani odgovor na infekciju postaje sustavan. Isto tako, malo je spoznaja o ranim dijagnostičkim i prognostičkim biljezima neželjenih ishoda sepse.

Ovo istraživanje je prvo opisano istraživanje uloge endokanabinoida anandamida i 2-AG u prognozi neželjenih ishoda sepse. Glavno istraživačko pitanje ove studije je, jesu li endokanabinoidi rani prognostički biljezi smrtnog ishoda sepse te mogu li predvidjeti razvoj teškog oblika sepse – septičnog šoka, potrebe za IMV i terapijom vazopresorima već po dolasku bolesnika u bolnicu.

6.1. Opća obilježja ispitanika

Sepsa najviše pogađa odrasle osobe starije od 60 godina. Razlog tomu je u većem broju pridruženih bolesti koje utječu na imunološki odgovor organizma na infekciju. Ispitivanu kohortu ispitanika oboljelih od sepse činili su pretežno ispitanici stariji od 60 godina koji su imali i po nekoliko pridruženih bolesti. Veći broj pridruženih bolesti utjecao je na ishod sepse te su preminuli ispitanici imali više pridruženih bolesti u odnosu na preživjele. Iste rezultate opisalo je nedavno nekoliko skupina znanstvenika ističući kronične bolesti dišnog sustava i bubrega te maligne bolesti kao pridružene bolesti povezane sa smrtnim ishodom sepse (79- 80).

Glavni izvori infekcije su organski sustavi čije su sluznice u izravnom kontaktu s okolinom. Pravovremeni odgovor imunološkog sustava na susret s patogenima na sluznicama ključan je za njihovo uklanjanje i sprječavanje sustavnog razvoja upalne reakcije. Prema Svjetskoj zdravstvenoj organizaciji, upravo su dišni, mokraćni i probavni sustav glavni izvori infekcija iz kojih se razvija sepsa (3). U oboljelih ispitanika u ovoj studiji najčešći uzrok sepse bila je upala pluća, potom infekcija mokraćnog sustava te u manjoj mjeri infekcije probavnog sustava. Iako se sepsa definira kao infekcija koja uzrokuje sustavni upalni odgovor, tek u 15-50% slučajeva moguće je dokazati prisutnost mikroorganizma koji je uzročnik infekcije (81-82). Sukladno literaturi i u ovom je istraživanju uzročnik sepse izoliran tek iz 57% kultura.

Smrtni ishod sepse imalo je 53 ispitanika. Iako pojedinim ispitanicima dijagnoza sepse nije bila postavljena odmah po prijemu, kod svih su bili prisutni simptomi sustavne upalne reakcije na infekciju definirani prema Sepsis-2 smjernicama. Da bi se postavila sumnja na razvoj sepse, Sepsis-3 smjernice preporučaju brzu procjenu upotrebom qSOFA sustava bodovanja te ocjenu funkcije i oštećenja organa i prognozu neželjenih ishoda izračunom SOFA sustava bodovanja. Izraženiji simptomi sustavne upale uočeni su kod ispitanika sa smrtnim ishodom, kao i veće vrijednosti qSOFA i SOFA sustava bodovanja. U opsežnom istraživanju, u koje je bilo uključeno više centara hitne medicine i JIL jedinica, Seymour i sur. također su dokazali da veće vrijednosti qSOFA i SOFA sustava bodovanja predviđaju smrtni ishod kod bolesnika sa sumnjom na sepsu (11).

6.2. Razlike biljega mjerenih po prijemu i otpustu s liječenja

Ispitanici oboljeli od sepse po prijemu na liječenje bili su u aktivnoj proupalnoj fazi sepse, što se očituje u porastu broja leukocita, koncentracije proupalnih biljega i aktivaciji neutrofilnih granulocita. Ispitanicima s ishodom preživljenja mjerenja biljega upale i oštećenja tkiva učinjena su i prije otpusta s bolničkog liječenja.

Kod svih preživjelih ispitanika uočava se pad koncentracije upalnih biljega po otpustu s liječenja. Međutim, koncentracije endokanabinoidea ostale su podjednake kao u trenutku prijema na liječenje. Iako su istraživanja dokazala da su koncentracije anandamida i 2-AG povećane u sepsi (83-84), organizam ih održava u uskom i stalnom rasponu. Isti rezultat opazili su i Ladak i sur., koji su u istraživanje uključili 49 ispitanika oboljelih od sepse koji su bili

hospitalizirani u JIL-u. Svim ispitanicima su prvi i drugi dan po prijemu na liječenje određene koncentracije endokanabinoida anandamida i lipida palmitoiletanolamida (PEA) i oleiletanolamida (OEA). Kod 26 preživjelih ispitanika navedeni biljezi određeni su i po oporavku. Niti ova skupina istraživača nije uočila značajnu razliku u koncentracijama anandamida po prijemu i po otpustu s liječenja (85). Upravo činjenice da dinamika promjene koncentracije endokanabinoida nije tako izražena kao promjena koncentracije proupalnih i protuupalnih biljega i da se ona ne mijenja po otpustu s liječenja kada se aktiviraju procesi cijeljenja i obnavljanja tkiva, podupire dosadašnje znanje o funkciji endokanabinoida kao regulatora upalnog procesa i biljega cijeljenja oštećenog tkiva. Anandamid je pokazao značajnu pozitivnu povezanost s protuupalnim citokinom IL-10 po otpustu s liječenja, što je dokazano i na staničnim i na životinjskim modelima sepse (72, 86-87). U nedavnom istraživanju Angelina i sur. dokazali su da aktiviranje kanabinoidnih receptora tijekom upale aktivira FOXP3+ Treg limfocite, koji oslobađaju IL-10 i neophodni su za uravnoteženu imunološku reakciju u sepsi i održavanje homeostaze (88). Mogući razlog produljeno povećane koncentracije endokanabinoida je i njihovo sudjelovanje u ponovnom uspostavljanju homeostaze nakon sustavne upalne reakcije.

Dva su endokanabinoida pokazala značajnu međusobnu pozitivnu povezanost i po prijemu i po otpustu s liječenja. Koncentracije anandamida i 2-AG u upali mijenjaju se zajedno te porast koncentracije jednog endokanabinoida prati porast drugoga. Sličan rezultat dokazali su Ladak i sur., iako su oni uočili jednak smjer promjene endokanabinoida anandamida i pratećih, *entourage* (engl. pratnja), lipida PEA i OEA (85). Ovi lipidi se danas smatraju dijelom ECS, ali ne i pravim endokanabinoidima, budući da nije dokazano da se vežu na kanabinoidne receptore. Dokazano je da se vežu s velikim afinitetom i nadmeću s anandamidom za vezna mjesta na FAAH enzimu koji razgrađuje anandamid te tako povećavaju njegovu koncentraciju i omogućuju duže vrijeme djelovanja (89-90). Jednaki smjer promjene anandamida i 2-AG još nije opisan, iako je dokazano da se oba endokanabinoida sintetiziraju i oslobađaju iz stanica imunološkog sustava (91-92).

6.3. ISHOD 1: Ishod liječenja oboljelih od sepse

Nove smjernice, posebno zadnje izdanje smjernica Kampanje za preživljenje sepse (engl. *Surviving Sepsis Campaign*) iz 2021. (25), daju puno jasnije preporuke o terapijskim postupcima u liječenju sepse i septičnog šoka. Međutim, smrtnost ove složene bolesti i dalje je

velika. Istraživanja, ali i svakodnevno kliničko iskustvo, svjedoče da je ključno rano prepoznati znakove sepse i započeti s terapijom, ali isto tako i pravovremeno prepoznati bolesnika s većim rizikom za smrtni ishod liječenja. Literaturni podatci o ranim prognostičkim biljezima smrtnosti su ograničeni.

Jedan od glavnih ciljeva ovog istraživanja bio je ispitati jesu li endokanabinoidi, već u trenutku prijema na liječenje, rani prognostički biljezi preživljenja. Prema literaturnim podacima ovo je prvo istraživanje koje uspoređuje prognostičku ulogu endokanabinoida i proupalnih biljega kod septičnih bolesnika. Između preživjelih i preminulih ispitanika nije bilo razlike u koncentraciji proupalnih biljega (leukocita, PCT, CRP i IL-6) i endokanabinoida anandamida i 2-AG u trenutku dolaska na liječenje. Isti rezultat uočili su Ladak i sur. u istraživanju endokanabinoida anandamida u sepsi (85).

Najviše su kao prognostički biljezi smrtnosti u sepsi ispitivani PCT i CRP. Rezultati tih istraživanja su kontradiktorni i ne nude čvrste dokaze o njihovoj upotrebi u ranoj prognozi smrtnog ishoda. PCT je većinom ispitivan u populaciji septičnih bolesnika liječenih u JIL-u. Suranadi i sur. su pokazali da $PCT \geq 7 \mu\text{g/L}$ predviđa smrtni ishod od sepse u JIL-u (93), dok su Zaccione i sur. pokazali da PCT, kao samostalan biljeg, nema zadovoljavajuću točnost u predviđanju smrtnosti od sepse u JIL-u (94). Međutim, u JIL se zaprimaju bolesnici s teškim oblikom sepse i septičnim šokom i takvi rezultati nisu u potpunosti usporedivi s ovim istraživanjem, u kojem je prognostička uloga biomarkera ispitana kod oboljelih od sepse po prijemu na liječenje. U ispitivanoj skupini nisu svi ispitanici razvili septični šok, niti su svi liječeni u JIL-u, iako je smrtnost među ispitanicima bila veća. Effendi i sur. ispitali su ulogu PCT-a u ranoj prognozi smrtnosti oboljelih od sepse uzrokovane gram negativnim bakterijama. AUC vrijednost PCT-a u predviđanju smrtnog ishoda bila je tek 0.45 (95% CI 0.36–0.54), što pokazuje slabu prognozu smrtnog ishoda temeljem vrijednosti PCT-a mjerene u trenutku prijema na liječenje (95).

Slično kao PCT, uloga CRP-a u prognozi smrtnog ishoda sepse ispitana je pretežno u oboljelih koji su liječeni u JIL-u. Koozi i sur. (42) te Mohamed i sur. (96) pokazali su da je porast CRP-a povezan s većom smrtnosti oboljelih od sepse u JIL-u. Iako su CRP i PCT široko dostupni biljezi upale, njihova je uloga u ranom predviđanju smrtnog ishoda sepse ograničena i uloga im je značajnija ukoliko se kombiniraju s drugim biljezima upale i oštećenja organa (97-98).

U usporedbi s opisanim biljezima upale, jedino je anandamid predvidio smrtni ishod septičnih bolesnika već po prijemu na liječenje. Ispitanici koji su po prijemu imali koncentraciju anandamida $>7.16 \mu\text{g/L}$, imali su veći rizik za smrtni ishod u sljedećih 28 dana. U ovom su

istraživanju oboljeli od sepse, u trenutku prijema i određivanja koncentracije biljega u krvi, bili u proupalnoj fazi sepse. Djelujući na CB2R, endokanabinoidi ostvaruju protuupalno djelovanje te tako reguliraju i sprječavaju pretjeranu upalnu reakciju. Međutim, kako se radi o biomarkerima čije je djelovanje vrlo ovisno o koncentraciji (99), pri većoj se koncentraciji endokanabinoidi mogu vezati i na periferne CB1R i tako ostvariti suprotan učinak od očekivanog utišavanja upale. Osim toga, mogu se metabolizirati djelovanjem COX ili LOX enzima u proupalne prostaglandine i leukotriene. Zbog sveprisutnosti ECS u ljudskom organizmu, veća koncentracija endokanabinoida utječe na mnoge organe. Pojačano djelovanje endokanabinoida pri većim koncentracijama na CB1R u endotelu krvnih žila, doprinosi poremećaju funkcije mikrocirkulacije i hemodinamskoj nestabilnosti. Navedeno se uočava kod preminulih ispitanika koji su već po prijemu imali izraženiji poremećaj sustava zgrušavanja, veća oštećenja funkcije bubrega i jetre te veću hemodinamsku nestabilnost. *In vivo* i *in vitro* pokusi pokazuju oprečne rezultate, što može biti zbunjujući čimbenik u prijenosu znanja o ECS. *In vitro* studije na bakterijama pokazale su izravan antibakterijski učinak endokanabinoida (100). Feldman i sur. dokazali su da anandamid smanjuje patogeno djelovanje MRSA-e u strukturama biofilma. Brojne bakterije, koje su višestruko otporne na antibiotike, otpornost ostvaruju i mehanizmom stvaranja biofilma. Biofilm je strukturirana zajednica mikroorganizama koja je zatvorena i zaštićena u izvanstaničnom prostoru. Formiranje biofilma čini mikroorganizme otpornijim na djelovanje antibiotika i imunološkog sustava. Anandamid smanjuje formiranje biofilma, metabolizam bakterija zaštićenih u biofilmu i njihovu međusobnu komunikaciju. Zbog amfifilnog svojstva, endokanabinoidi mogu prolaziti kroz stanične membrane mikroorganizama te tako mijenjati elastičnost i fluidnost stanične membrane, što utječe na pokretljivost bakterija (101-102).

Međutim, *in vivo* studije pokazale su suprotne rezultate i veću smrtnost pri većoj koncentraciji anandamida. U istraživanju Csoke i sur. miševi koji su imali inaktiviran CB2R imali su manju smrtnost od sepse (103). Utišavanje pretjerano aktiviranog imunološkog sustava u proupalnoj fazi sepse potrebno je kako bi se smanjila upalna reakcija, međutim, pretjerana inhibicija funkcije stanica imunološkog sustava endokanabinoidima, u prisutnosti bakterija, omogućit će njihovo razmnožavanje i širenje te daljnje oštećenje organa.

Iako je anandamid bio jedini rani prognostički biljeg smrtnog ishoda, u kombinaciji s drugim čimbenicima rizika, nije se pokazao kao nezavisni čimbenik rizika. U prvih 28 dana hospitalizacije, kao rani nezavisni čimbenici rizika za smrtni ishod pokazali su se smanjenje broja leukocita, aktivacija sustava zgrušavanja koja se očituje potrošnjom fibrinogena, smanjenje MCHC-a te povećanje SOFA sustava bodovanja. Rana aktivacija sustava

zgrušavanja praćena prokoagulantnom aktivnosti i potrošnjom trombocita i čimbenika zgrušavanja, rizik je za razvoj težeg oblika sepse i smrtnog ishoda. Uloga SOFA sustava bodovanja u prognozi neželjenih ishoda sepse ispitana je u brojnim studijama (104-105).

Po prijemu na liječenje uočena je značajna povezanost oba endokanabinoida i u skupinama preminulih i preživjelih ispitanika. Porast koncentracije endokanabinoida anandamida i 2-AG u skupini preživjelih ispitanika prati porast proupalnih biljega. Aktivacijom upale sintetiziraju se i oslobađaju endokanabinoidi te reguliraju mehanizme upalnog djelovanja stanica urođene i stečene imunosti. Dokaz zajedničke aktivacije proupalnih i protuupalnih mehanizama je i međusobna značajna povezanost proupalnog citokina IL-6 i protuupalnog citokina IL-10. Međutim, kod preminulih bolesnika oboljelih od sepse, u trenutku prijema na liječenje, uočena je potpuno drugačija slika povezanosti proupalnih i protuupalnih biljega. I u ovoj skupini bila je prisutna značajna povezanost dvaju endokanabinoida, ali oni nisu bili povezani niti sa proupalnim, niti sa protuupalnim biljezima. Poznato je da endokanabinoidi mogu regulirati upalni proces još jednim mehanizmom - aktivacijom apoptoze limfocita T i B (106). Također, moguće je i da postoje novi i drugačiji mehanizmi imunoregulacije u bolesnika s većim rizikom od smrtnog ishoda. Ispitanici sa smrtnim ishodom imali su značajno veće vrijednosti qSOFA i SOFA sustava bodovanja i primljeni su na liječenje u trenutku kada je upala jače uznapredovala, nego kod oboljelih s ishodom preživljenja. Kako je prethodno opisano, veća koncentracija endokanabinoida i njihovo imunosupresivno djelovanje mogu imati negativne posljedice na oštećenje organa ukoliko uzročnik upale još nije uklonjen iz organizma. Međudjelovanje ECS s proupalnim i protuupalnim mehanizmima imunološkog sustava u sepsi je složeno i zahtjeva daljnja istraživanja.

6.4. ISHOD 2a: Razvoj septičnog šoka

Tijekom hospitalizacije 23% ispitanika razvilo je najteži oblik komplikacije sepse – septični šok. Ovo stanje karakterizirano je pretjeranom upalnom reakcijom i opsežnom aktivacijom sustava zgrušavanja i kompleksa komplementa, što uzrokuje oštećenje malih krvnih žila i kapilara te posljedično višestruko zatajenje organa.

U ispitivanoj kohorti, ispitanici sa septičnim šokom već su u trenutku prijema imali značajnije oštećenje više organskih sustava, poput bubrega, jetre i pluća te su mjerene veće koncentracije proupalnih biljega, laktata i qSOFA i SOFA sustava bodovanja. Sustav

zgrušavanja krvi bio je aktiviran i očitovala se značajna potrošnjom trombocita i čimbenika zgrušavanja.

Prema literaturnim izvorima, ovo je prvo istraživanje prognostičke uloge ranog određivanja koncentracije anandamida i 2-AG na razvoj septičnog šoka. Koncentracija obaju endokanabinoida bila je značajno manja u skupini ispitanika sa septičnim šokom. Jedino objavljeno istraživanje koje je usporedilo koncentraciju anandamida i 2-AG između preživjelih i preminulih ispitanika oboljelih od septičnog šoka je istraživanje Kohra i sur. (107), koji su ispitali ulogu izravne hemoperfuzije s polimiksinom B (PMX- hemoperfuzija) na uklanjanje anandamida i 2-AG u septičnom šoku. U istraživanje su bili uključeni samo oboljeli od septičnog šoka kojima su endokanabinoidi određeni nakon postavljanja dijagnoze septičnog šoka. Kao i u ovom istraživanju, Kohro i sur. također su pokazali da je koncentracija anandamida i 2-AG manja kod ispitanika sa septičnim šokom koji su preminuli.

Rezultati ovog istraživanja slažu se sa prethodnim istraživanjima koja su pokazala da je koncentracija 2-AG u serumu veća od koncentracije anandamida. Međutim, u ovom je istraživanju uočeno da je u skupini ispitanika koji su razvili septični šok već po prijemu na liječenje razlika koncentracije dva endokanabinoida bila manja. Uočeno je značajnije smanjenje koncentracije 2-AG u odnosu na anandamid što bi upućivalo na mogući zaštitni učinak veće koncentracije 2-AG. Moguće pojašnjenje je u spoznaji da je 2-AG puni agonist CB2R, preko kojih se pretežno ostvaruju imunomodulatorni i regulacijski učinci na stanice imunološkog sustava. Također, u ovom su istraživanju oboljelima od septičnog šoka endokanabinoidi određeni prije nego li je došlo do komplikacija sepse i razvio se septični šok. U toj početnoj proupalnoj fazi sepse, oni ispitanici koji su razvili septični šok imali su nižu koncentraciju obaju endokanabinoida u krvotoku. Prema dosadašnjim spoznajama, smanjenje koncentracije 2-AG može rezultirati težom upalom i oštećenjem organa (108).

Ovu teoriju podupire i rezultat manje povezanosti dvaju endokanabinoida u oboljelih od septičnog šoka ($\rho=0.488$ u skupini sa septičnim šokom u odnosu na $\rho=0.804$ u skupini ispitanika bez septičnog šoka). Iako je pozitivna povezanost još prisutna u septičnom šoku, porast ili smanjenje jednog endokanabinoida nije nužno slijedilo drugi.

Oba endokanabinoida i proupalni biljezi CRP, PCT i IL-6 pokazali su se kao rani prognostički biljezi razvoja septičnog šoka, sa značajnijom prognostičkom specifičnosti u odnosu na osjetljivost. Do sličnih su rezultata došli Rayoo i sur. u istraživanju prognostičke uloge CRP-a i PCT-a u septičnom šoku (109). Smanjenje koncentracije anandamida i 2-AG te povećanje koncentracije PCT-a rano predviđa razvoj septičnog šoka kod oboljelih od sepse sa velikom prognostičkom specifičnosti, međutim zbog manje prognostičke osjetljivosti ovih

biljega, određeni broj ispitanika ne bi bio rano prepoznat. Druga su istraživanja pokazala slične rezultate za proupalne biljege koji su tek u kombinaciji s drugim biljezima upale i oštećenja tkiva te sustavima bodovanja točnije procijenili rizik razvoja septičnog šoka (94).

Iako su kao samostalni biljezi i anandamid i 2-AG čimbenici rizika za rano prepoznavanje oboljelih od sepse, koji će razviti stanje septičnog šoka, u kombinaciji s ostalim biljezima, nisu se pokazali kao nezavisni čimbenici rizika. Poremećaj funkcije dišnog sustava i sustava zgrušavanja krvi te oštećenje organa, glavne su značajke koje rano upućuju na razvoj septičnog šoka.

6.5. ISHOD 2b: Potreba za invazivnom mehaničkom ventilacijom

Pneumonija je jedan od najčešćih izvora sepse. Nekontrolirana upalna reakcija uzrokuje oštećenje endotela krvnih žila i alveola. Zbog pojačanog dotoka proupalnih stanica, poput neutrofila, makrofaga i oslobađanja medijatora upale, oštećuje se membrana između alveola i krvnih kapilara na kojoj se odvija izmjena plinova, nastaje edem i zatajenje funkcije pluća. Oštećenje plućnog tkiva značajno utječe na funkciju ostalih organskih sustava u sepsi zbog nedostatne opskrbe tkiva kisikom. Bolesnici s oštećenom funkcijom pluća u sepsi često zahtijevaju primjenu IMV.

U ovom istraživanju, kod 77% ispitanika koji su tijekom liječenja trebali IMV, izvor infekcije bio je u plućima. Već po prijemu na liječenje, ovi su bolesnici imali izraženije oštećenje organa. sO₂ pokazala je sustavnu hipoksiju. Oboljeli od sepse koji su tijekom liječenja trebali IMV imali su po prijemu manje koncentracije anandamida i 2-AG, a one su se pokazale kao rani prognostički biljezi potrebe za IMV u liječenju sepse. AEA se pokazao kao rani prognostički čimbenik rizika sa značajnom prognostičkom osjetljivošću u predviđanju potrebe za uvođenjem IMV. Iako je malo istraživanja uloge i promjene endokanabinoida u plućnom tkivu oboljelih od sepse, opisana su slična opažanja. Ladak i sur. također su uočili manju koncentraciju anandamida u septičnih bolesnika koji su trebali IMV. U skupini ispitanika koji su trebali IMV, mjerena koncentracija anandamida bila je 0.20 µg/L, u odnosu na 0.35 µg/L u skupini koja nije trebala IMV u liječenju (85). Staiano i sur. dokazali su prisutnost obaju kanabinoidna receptora i sintezu endokanabinoida anandamida te 2-AG u alveolarnim makrofagima izoliranim iz tkiva pluća pacijenta s adenokarcinomom. Izražaj CB2R bio je veći

od izražaja CB1R (110). Nadalje, u drugim stanicama u plućima, poput plućnih dendritičkih stanica, dokazana je prisutnost kanabinoidnih receptora i sinteza endokanabinoida (111).

Nekoliko istraživanja uloge endokanabinoida u sepsi i sepsom uzrokovanog ARDS-a ukazuju na moguću zaštitnu ulogu endokanabinoida u plućima tijekom upalne reakcije. Većina ovih spoznaja dolazi iz istraživanja učinjenih na životinjskim modelima sepse. Takva su istraživanja pokazala da blokiranje enzima koji sudjeluju u razgradnji anandamida i 2-AG, povećava njihovu koncentraciju u plućima te smanjuje upalu i oštećenje plućnog parenhima (112). U istraživanjima provedenim na miševima, kojima je sepsa izazvana dodatkom lipopolisaharida iz bakterija, povećana koncentracija endokanabinoida u plućima spriječila je pretjeranu reakciju stanica imunološkog sustava i oštećenje pluća. Anandamid je smanjio dotok upalnih stanica u pluća i oslobađanje proupalnih citokina IL-2, TNF- α i IFN- γ , a povećao aktivnost Treg limfocita, koji su poznati regulatori imunološkog odgovora (113-115).

Glavna sastavnica strukture endokanabinoida je arahidonska kiselina koja je izvor za sintezu različitih lipida iz porodice eikozanoida. Ovi lipidni medijatori imaju različite važne uloge u upalnom procesu. Metabolizam eikozanoida i endokanabinoida je usko povezan. 2-AG se u alveolarnim makrofagima metabolizira pomoću enzima COX-2 u prostaglandin D2 glicerol i prostaglandin E2 glicerol, za koje je također dokazano da smanjuju upalni odgovor i oštećenje plućnog tkiva (116).

Dva endokanabinoida pokazala su snažnu povezanost u skupini oboljelih od sepse koji nisu trebali pomoć IMV-a. Ovi rezultati dodatno potvrđuju prethodno opisane rezultate pozitivne povezanosti dvaju endokanabinoida i činjenicu da u regulaciji imunološkog odgovora djeluju zajedno. Ovakav obrazac djelovanja pojavljuje se ponovno samo kod ispitanika koji nisu razvili komplikacije sepse, dok je u slučaju onih ispitanika, koji su trebali potporu IMV, uočen promijenjen odnos između dvaju endokanabinoida već po prijemu na liječenje. Iako je koncentracija obaju endokanabinoida bila značajno manja u skupini oboljelih koji su trebali IMV, veće smanjenje koncentracije bilo je vidljivo za endokanabinoid 2-AG. Uzroci ovog opažanja nisu u potpunosti jasni i zahtijevaju dodatna istraživanja jer upućuju na moguće zaštitno djelovanje 2-AG na pluća u razvoju komplikacija sepse. *In vivo* istraživanja na životinjama potvrđuju izravno zaštitno djelovanje 2-AG na pluća. Costola-de-Souza i sur. ispitivali su učinak 2-AG na pluća u mišjem modelu ARDS-a uzrokovanog lipopolisaharidima bakterija. U skupini miševa kojima je blokirana aktivnost MAGL enzima koji razgrađuje 2-AG, upala je pluća bila blaža i praćen je ishod preživljenja. U plućnom tkivu tih životinja bilo je manje neutrofila, uočeno je manje oštećenje krvnih žila i dišnih putova te manja koncentracija proupalnih citokina (117). Međutim, autori nisu uočili promjenu ovog učinka nakon primjene

antagonista CB1R i CB2R, što upućuje na moguće djelovanje 2-AG preko drugih nekanabinoidnih receptora (poput GPR) ili njegov metabolizam s COX enzimom u prostaglandine s protuupalnim djelovanjem. Jedino istraživanje na ljudima je studija Weisa i sur. koji su dokazali negativnu povezanost 2-AG i potrebe za IMV-om kod pacijenata koji su podvrgnuti ugradnji srčano-plućne prenosnice ($\rho=-0.43$, $p=0.030$) (118).

Oba endokanabinoidea pokazala su se kao rani čimbenici rizika u prepoznavanju oboljelih od sepse koji će trebati mehanički potpomognutu ventilaciju, međutim, samo je anandamid, uz qSOFA i SOFA sustav bodovanja te sO_2 , bio nezavisni čimbenik rizika. Iako je jasno vidljivo značajno veće smanjenje koncentracije 2-AG u odnosu na anandamid kod onih bolesnika koji su trebali IMV, zaštitnu ulogu anandamida na funkciju pluća nije moguće zanemariti. Moguće je da u ovom istraživanju nije uočeno tako izraženo smanjenje koncentracije anandamida jer je dokazano da je koncentracija 2-AG u plazmi i do 10 puta veća, dok je za plućno tkivo opisana i do 200 puta veća koncentracija 2-AG (119). I Kase i sur. pokazali su da u teškoj sepsi i septičnom šoku koncentracija anandamida poraste pet puta iznad normalne vrijednosti, dok koncentracija 2-AG raste značajno više, i do 70 puta iznad normalne vrijednosti u serumu (120). Organizam ravnotežu anandamida održava u puno užim granicama te je i mala promjena koncentracije dovoljna za ostvarenje učinka. Pozitivan učinak anandamida na dišni sustav dokazali su Sultan i sur. Nakon intravenozne primjene anandamida, uočili su poboljšanje funkcije pluća na modelu ARDS-a izazvanog enterotoksinom B iz bakterije *Staphylococcus aureus*. Skupina miševa koja je primila anandamid imala je manje proupalnih citokina, manji dotok proupalnih T limfocita i NK stanica, dok je aktivnost protuupalnih i regulatornih limfocita bila povećana. Autori su pokazali da anandamid ostvaruje modulaciju aktivnosti stanica imunološkog sustava, regulirajući miRNA u tim stanicama (121).

U ovom istraživanju porast koncentracije anandamida za 1 $\mu\text{g/L}$ smanjio je rizik za kasniju potrebu uvođenja IMV podjednako kao sO_2 , jedna od glavnih mjera oksigenacije organa. Izračunati regresijski model za ranu prognozu moguće potrebe IMV u sepsi točno je prepoznao sve ispitanike kohorte koji su uistinu tijekom hospitalizacije trebali potporu mehaničke ventilacije. Visoka prognostička osjetljivost i specifičnost modela čini ga pogodnim algoritmom za ranu procjenu potrebe IMV kod oboljelih od sepse. Izbacivanjem anandamida iz modela smanjila se točnost prognoze, što govori u prilog njenoj važnosti u ranoj prognozi oštećenja plućnog tkiva u sepsi i potrebe za IMV-om. Važno obilježje prognostičkog modela je da moguću potrebu za IMV prepoznaje rano po prijemu bolesnika sa sepsom i mogao bi biti pomoć u ranom prepoznavanju bolesnika s većim rizikom za komplikacije dišnog sustava u sepsi, međutim, potrebna je daljnja klinička evaluacija njegove prognostičke uloge.

6.6. ISHOD 2c: Potreba za terapijom vazopresorima

Vazodilatacija i smanjena prokrvljenost i oksigenacija tkiva glavne su komplikacije sepse s visokom stopom smrtnosti. U terapiji sepse i septičnog šoka neophodno je povratiti i održati primjerenu prokrvljenost i oksigenaciju organa. Kada početni nadomjestak tekućine ne uspije uspostaviti zadovoljavajući krvni tlak, u terapiju je potrebno uvesti vazopresore.

Kod oboljelih od sepse, koji su tijekom liječenja trebali vazoaktivnu terapiju, uočen je značajno niži srednji arterijski tlak. U ovih ispitanika uočen je i poremećaj funkcije dišnog sustava, jetre i bubrega te veće vrijednosti proupalnih biljega PCT-a i IL-6, nego li u skupini koja nije zahtijevala upotrebu vazoaktivne terapije. Za razliku od prethodno opisanih ishoda, samo je u skupini ispitanika koji su trebali vazoaktivnu terapiju vrijednost imunosupresivnog citokina IL-10 bila značajno veća. McNamee i sur. dokazali su da kateholamin noradrenalin, djelujući preko β -adrenergičkih receptora, uzrokuje porast IL-10 (122).

Promjena koncentracije endokanabinoida uočena je i u ishodu potrebe za vazoaktivnom terapijom. Ispitanici koji su tijekom liječenja trebali terapiju vazoaktivnim lijekovima imali su značajno nižu koncentraciju anandamida, ali ne i 2-AG, već po prijemu na liječenje. Isti rezultat uočili su Ladak i sur. u svom istraživanju na oboljelima od sepse. U skupini oboljelih od sepse koji su tijekom liječenja trebali vazoaktivnu potporu, uočili su i veću koncentraciju proupalnog citokina TNF- α i protuupalnog citokina IL-10 (85).

Podatak da je kod oboljelih od sepse koji trebaju vazoaktivnu potporu za održavanje krvnog tlaka koncentracija endokanabinoida anandamida manja, suprotna je rezultatima dobivenim na životinjskim modelima hipotenzije u sepsi. Endokanabinoidi su dugo smatrani medijatorima koji isključivo uzrokuju vazodilataciju i smanjuju krvni tlak. Istraživanja su pokazala da učinke vazodilatacije ostvaruju djelovanjem na CB1R. Godlewski i sur. pokazali su da aktivacija presinaptičkih CB1R u živčanim završecima simpatikusa blokira djelovanje noradrenalina na glatke mišiće krvnih žila. Upotreba rimonabanta, antagonista CB1R, poništila je hipotenzivni učinak (123). Međutim, rezultate ovog istraživanja teško je interpretirati jer je istraživanje provedeno na anesteziranim štakorima. Kada su kanabinoidi dani životinjama koje nisu bile anestezirane, uočen je učinak povišenja krvnog tlaka (124). Wagner i Varga sa suradnicima proveli su više istraživanja na životinjskim modelima kojima je sepsa izazvana pomoću lipopolisaharida bakterija. Pokazali su da povećano oslobađanje anandamida i 2-AG iz makrofaga i trombocita u sepsi uzrokuje hipotenziju kod septičnih štakora aktivacijom CB1R (125-126). Međutim, i ovaj je učinak upitan jer je hipotenzija uočena u istom modelu sepse i kod životinja kojima je genetski uklonjen gen za oba kanabinoidna receptora (127). To je

pobudilo sumnju da endokanabinoidi ostvaruju hipotenziju preko nekih drugih receptora. Kasnija istraživanja više skupina istraživača pokazala su da metaboliti anandamida i 2-AG, poput N-arahidonoilglicina (AraG) i N-arahidonoilserina (AraS), uzrokuju vazodilataciju preko GPR18 receptora i vaniloidnih TRPV1 receptora. Djelujući na ove receptore, AraG i AraS uzrokuju opuštanje glatkih mišića krvnih žila tako što aktiviraju o kalciju ovisne kalijске kanale. Izlazak kalija iz stanica uzrokuje hiperpolarizaciju stanične membrane i posljedičnu vazodilataciju. Drugi mehanizam kojim dva metabolita endokanabinoida uzrokuju sniženje krvnog tlaka je pojačano oslobađanje NO zbog blokiranja aktivnosti enzima sintaze dušikovog II oksida (NOS) (128-130). Kwolek i sur. opisali su učinak intravenski primjenjenog anandamida na krvožilni sustav miševa. Odgovor krvožilnog sustava na anandamid opisali su kroz tri faze. U prvoj, ranoj fazi uočeno je kratkotrajno usporenje rada srca i pad krvnog tlaka, što je uzrokovano djelovanjem endokanabinoida na TRPV1 receptore. U drugoj fazi dolazi do porasta krvnog tlaka mehanizmima koji su posredovani djelovanjem metabolita endokanabinoida na kalcijске i kalijске kanale na stanicama glatkih mišića krvnih žila. U trećoj fazi uočena je dugotrajna hipotenzija koja je ponekada bila popraćena usporenim radom srca. Ovaj posljednji učinak također je ostvaren djelovanjem endokanabinoida i metabolita na TRPV1 receptore (131-132). Ovakav učinak endokanabinoida na tonus krvnih žila i krvni tlak ovisan je o njihovoj koncentraciji. U niskoj koncentraciji anandamid može uzrokovati širenje krvnih žila i smanjenje krvnog tlaka, dok pri visokoj koncentraciji uzrokuje suženje krvnih žila, što su dokazali i Tamaki i sur. (133). Ova posljednja istraživanja mogla bi objasniti izraženiju hipotenziju i potrebu za vazoaktivnom terapijom kod ispitanika, koji su u ovom istraživanju i istraživanju Ladak i sur. imali nižu koncentraciju anandamida. Pojačanim metabolizmom i potrošnjom endokanabinoida nastaju metaboliti koji su agonisti nespecifičnih kanabinoidnih receptora, preko kojih ostvaruju hipotenzivni učinak. Zbog oprečnih rezultata djelovanja i uloge ECS na krvožilni sustav ljudi i životinja, potrebna su dodatna istraživanja kako bi se bolje razumjela njihova uloga u razvoju i sprječavanju hipotenzije u teškom obliku sepse i septičnom šoku.

Kao i kod prethodno opisanih ishoda i komplikacija sepse, ovo je prvo istraživanje prognostičke uloge endokanabinoida u ranom prepoznavanju oboljelih od sepse koji će tijekom liječenja trebati vazoaktivnu terapiju. Snižena koncentracija anandamida te povećana koncentracija proupalnih biljega PCT i CRP i protuupalnog biljega IL-10, pokazala se kao rani prognostički biljeg potrebe za terapijom vazopresorima, u liječenju sepse. Ovaj rezultat podupire u literaturi opisanu teoriju o protuupalnom i zaštitnom djelovanju endokanabinoida anandamida. Rezultati istraživanja pokazali su također da je anandamid nezavisni čimbenik

rizika za teški oblik hipotenzije u sepsi koji će zahtijevati vazoaktivnu potporu. Prikazani model rane prognoze potrebe za vazopresorima točno je prepoznao 91% ispitanika. Međutim, modelu je najznačajnije doprinio SOFA sustav bodovanja, kao parametar koji daje uvid u poremećaje i zatajenje više organskih sustava.

6.7. Ograničenja i prijedlozi budućih istraživanja

Ograničenje ove studije je nepoznato vrijeme početka simptoma sepse kod ispitanika. Svi mjereni parametri temeljem kojih je učinjena prognostička procjena ishoda i komplikacija sepse određeni su u trenutku dolaska bolesnika u bolnicu. Ispitanici su na liječenje primljeni u različitim fazama razvoja sepse, neki sa blažim simptomima, a neki sa teškim simptomima sustavne upalne reakcije i sa značajnim poremećajima u funkciji krvožilnog sustava. Nehomogenost ispitivane skupine u intenzitetu simptoma utječe na mjerene vrijednosti praćenih biljega i vjerojatno je uzrok uočene veće varijacije i raspona mjerenih parametara. Međutim, to je klinička stvarnost odjela za hitnu dijagnostiku, a namjera ovog istraživanja bila je procijeniti prognostičku ulogu endokanabinoida kao ranih čimbenika rizika u stvarnim, svakodnevnim kliničkim uvjetima.

Ovo istraživanje uključilo je samo ispitanike koji su infekciju i sepsu razvili izvan bolničkih uvjeta. Upala pluća i mokraćnog sustava najčešći su izvori sepse u ispitivanoj skupini. Bolesnici koji su sepsu razvili postoperativno ili intrahospitalno nisu bili uključeni u ovo istraživanje. Takvi bolesnici primljeni su na liječenje puno prije razvoja prvih simptoma sustavne infekcije i sepse i moguć je značajan utjecaj prethodnog patološkog stanja i primljene terapije na koncentracije endokanabinoida. Promjene koncentracije endokanabinoida ovisno o različitim bolestima i terapiji već su literaturno opisane. Schelling i sur. uočili su značajan pad koncentracije anandamida nakon uvođenja etomidata i sevoflurana kao anestezije (134). Isto tako, opisan je i utjecaj kirurških zahvata na koncentraciju endokanabinoida (118).

Na temelju rezultata i saznanja koje je donijela ova studija moguća su nova istraživanja uloge ECS u sepsi kod ljudi.

Najveći broj istraživanja uloge ECS u sepsi učinjen je na staničnim i životinjskim modelima sepse. Ti su modeli uključivali upotrebu različitih koncentracija anandamida i 2-AG te različite načine izazivanja sustavne upalne reakcije i sepse. Osim toga, moguće su razlike u funkciji ECS kod ljudi i životinja. Sve navedeno mogući je uzrok razlika u rezultatima

istraživanja, što otežava prenošenje saznanja o utjecaju ECS na fiziološke i patološke procese u ljudskom organizmu. Malo je objavljenih istraživanja o ulozi ECS u ljudi koji boluju od sepse. Dio tih istraživanja opisan je u ovom radu, ali sva su učinjena na malom broju ispitanika i pretežno su uključivala oboljele od sepse ili septičnog šoka koji su liječeni u JIL. Djelovanje ECS u sepsi kod ljudi još nije dovoljno istraženo. Mnogo je dokaza o njihovom protuupalnom i imunoregulatornom djelovanju, ali očito složeni i svestrani učinci endokanabinoida otežavaju jasnu sliku o njihovoj ulozi kod ljudi. Danas je poznato da endokanabinoidi djelovanje ostvaruju preko različitih receptora, a ne samo prvih poznatih, kanabinoidnih receptora. Njihovi učinci ovisni su o koncentraciji i primijenjenoj dozi što se najjasnije očituje u njihovoj ulozi u regulaciji krvnog tlaka. Osim toga, endokanabinoidi se metaboliziraju različitim enzimima i čine složenu mrežu međudjelovanja s drugim lipidnim medijatorima u organizmu.

Ovo istraživanje uključivalo je samo punoljetne odrasle osobe. Poznata je neizvjesnost razvoja i prognoze sustavne upale, posebno kod male djece. U toj populaciji uobičajeni biljezi upale CRP i PCT imaju još slabiju prognostičku vrijednost, nego u populaciji odraslih. Istraživanja promjene i uloge endokanabinoida u populaciji djece i mladih nisu još opisana.

Rezultati ove studije pokazali su da po smirenju sustavne upale do mjere koja više ne zahtjeva bolničko liječenje ne dolazi do promjene koncentracije endokanabinoida u odnosu na trenutak prijema na liječenje kada je sepsa u svojoj aktivnoj, proupalnoj fazi. Literaturno je opisano da se kod dijela bolesnika javlja relaps infekcije koja može ponovno napredovati u sepsu. Nova istraživanja dala bi uvid u moguću ulogu promjena koncentracije endokanabinoida kao prediktora rizika za relaps upale i sepse.

Ispitivanjem povezanosti dva endokanabinoida jasno je uočeno da je kod ispitanika s ishodom preživljenja promjena jednog endokanabinoida slijedila promjenu drugog. Međutim, tako snažna povezanost dva endokanabinoida nije uočena u skupini ispitanika sa smrtnim ishodom i razvojem komplikacija sepse. Potrebna su nova istraživanja o promjenama koncentracije endokanabinoida ovisno o intenzitetu upalne reakcije kako bi se dobio uvid u njihov značaj i uloge u mehanizmu razvoja sepse kod ljudi te otkrile mogućnosti novih terapijskih postupaka.

Ovaj novi, a ipak stari, sustav u ljudskom organizmu postavio je brojne izazove i otvorio prostor novim znanstvenim pitanjima i istraživanjima. Da bi se saznanja o pozitivnim učincima endokanabinoida mogla iskoristiti u svakodnevnom kliničkom radu, potrebna su nova istraživanja i dokazi o njihovoj promjeni i ulozi u ljudi oboljelih od sepse. Ova studija na humanim ispitanicima jedan je korak naprijed u upoznavanju uloge ovog evolutivno konzerviranog sustava za koji su istraživanja pokazala veliki potencijal imunomodulatornog i

protuupalnog djelovanja u sustavnoj upali kakva je sepsa. Prema saznanjima temeljenim na pretraženoj literaturi ovo je prvo opisano istraživanje uloge endokanabinoida anandamida i 2-AG u ranoj prognozi smrtnog ishoda i razvoja komplikacija sepse. Rezultati ove studije podupiru prijašnje spoznaje da su endokanabinoidi važni sudionici upalnog procesa u sepsi. Nova istraživanja na ljudskim ispitanicima su potrebna kako bi se otkrila uzročna veza endokanabinoida i upalnog procesa u sepsi. Mogućnost ranog prepoznavanja bolesnika koji imaju veći rizik smrtnog ishoda i razvoja komplikacija sepse važno je za pravovremene odluke o liječenju i omogućuje bolji ishod sepse.

7. ZAKLJUČCI

Temeljem provedenog istraživanja i dobivenih rezultata mogu se izvesti slijedeći zaključci:

- Koncentracija endokanabinoida anandamida i 2-AG ne mijenja se po oporavku i otpustu s liječenja pacijenata oboljelih od sepse.
- Endokanabinoidi anandamid i 2-AG djeluju zajedno u regulaciji imunološkog odgovora. Njihova međusobna pozitivna povezanost veća je kod pacijenata oboljelih od sepse koji su imali ishod preživljenja i nisu razvili komplikacije sepse.
- Kod oboljelih od sepse s ishodom preživljenja i bez razvoja komplikacija, u ranoj proupalnoj fazi sepse, endokanabinoidi anandamid i 2-AG se sintetiziraju zajedno s proupalnim i protuupalnim biljezima. Kod oboljelih od sepse sa smrtnim ishodom i razvojem komplikacija sepse, endokanabinoidi ne prate promjene upalnih biljega.
- Kod pacijenata oboljelih od sepse koji su razvili komplikacije bolesti koncentracija anandamida i 2-AG je manja.
- Endokanabinoidi imaju zadovoljavajuću specifičnost, ali slabu osjetljivost u ranoj prognozi razvoja septičnog šoka. Najveću specifičnost u ranom prepoznavanju oboljelih od sepse koji će razviti septični šok imao je proupalni biljeg PCT.
- Endokanabinoidi anandamid i 2-AG su rani prognostički biljezi potrebe za uvođenjem invazivne mehaničke ventilacije kod oboljelih od sepse.
- Endokanabinoid anandamid je rani nezavisni faktor rizika za potrebu uvođenja vazopresivne terapije u liječenje oboljelih od sepse.

8. SAŽETAK

Uvod: Sepsa je značajan klinički izazov zbog čestih komplikacija i visoke stope smrtnosti. Biljezi koji bi omogućili rano prepoznavanje oboljelih s velikim rizikom za smrtni ishod i komplikacije bolesti, važni su za pravovremene kliničke odluke i odabir terapije. Endokanabinoidni sustav prepoznat je kao važan regulator funkcije imunološkog sustava u upali. Dva glavna endokanabinoida su arahidonoiletanolamid (anandamid) i 2-arahidonoilglicerol (2-AG).

Nacrt i cilj studije: Istraživanje je organizirano kao prospektivna kohortna studija. Cilj istraživanja bio je ispitati prognostičku ulogu anandamida i 2-AG u ranoj procjeni smrtnosti i razvoja komplikacija sepse.

Ispitanici i metode: Komplikacije sepse definirane su kao razvoj septičnog šoka (SS) te potreba za uvođenjem invazivne mehaničke ventilacije (IMV) i vazoaktivne terapije (VT). U istraživanje je uključeno 106 ispitanika starijih od 18 godina kojima je dijagnosticirana sepsa. Ispitanici su podijeljeni u skupine ovisno o promatranom ishodu: preživjeli (N=53) i preminuli (N=53), SS (N=25) i non-SS (N=86) skupine, IMV (N=26) i non-IMV (N=80) skupine te VT (N=28) i non-VT (N=78) skupine. Uzorci krvi ispitanika prikupljeni su u trenutku bolničkog prijema. Ispitanicima s ishodom preživljenja uzorkovani su dodatni uzorci krvi po otpustu s liječenja.

Rezultati: U SS, IMV i VT skupini ispitanika uočena je značajno niža koncentracija anandamida i 2-AG već po prijemu na liječenje. Endokanabinoid anandamid pokazao se kao rani nezavisni čimbenik rizika uvođenja IMV i VT u liječenje sepse, s boljom ili podjednakom prognostičkom ulogom kao biljezi upale C-reaktivni protein, prokalcitonin i interleukin-6. Iako se anandamid pokazao i kao prognostički biljeg smrtnosti sepse, puno značajniju ulogu u prognozi smrtnosti imali su biljezi oštećenja tkiva i sustavi bodovanja u sepsi. Vrijednosti endokanabinoida nisu se promijenile po otpustu s liječenja što upućuje na moguću važnu ulogu u obnavljanju tkiva. U sva četiri promatrana ishoda sepse povezanost dva endokanabinoida bila je velika, osim u SS, IMV i VT skupinama ispitanika, što upućuje na različitu ulogu ova dva endokanabinoida u neželjenim ishodima sepse.

Zaključak: Početne koncentracije anandamida i 2-AG, mjerene po prijemu na liječenje, predviđele su razvoj SS i potrebu za uvođenjem IMV i VT u liječenje bolesnika oboljelih od sepse. Ovi rezultati potvrđuju ulogu endokanabinoida kao važnih regulatora upale i sepse kod ljudi.

Glavne riječi: citokini; endokanabinoidi; prognoza; sepsa; smrtnost; upala.

9. SUMMARY

Endocannabinoids anandamide and 2-arachidonoylglycerol as risk markers of sepsis outcome

Introduction: Sepsis remains a major clinical challenge due to its frequent complications and high mortality rates. Biomarkers with an ability to early identify septic patients with a higher risk of mortality and complications are crucial for timely interventions and therapy management. The endocannabinoid system is recognized as a key regulator of immune function during inflammation. The two main endocannabinoids are arachidonylethanolamide (anandamide) and 2-arachidonoylglycerol (2-AG).

Study design and aim: The study was designed as a prospective cohort study with the aim of assessing the prognostic value of anandamide and 2-AG in early sepsis mortality and complication prediction.

Subjects and methods: Sepsis complications were defined as septic shock (SS), and a need for invasive mechanical ventilation (IMV) and vasoactive therapy (VT). A total of 106 patients with sepsis aged >18 years were included in this study. Septic patients were divided into groups based on observed outcomes: survivors (N=53) and non-survivors (N=53), SS (N=25) and non-SS (N=81) group, IMV (N=26) and non-IMV (N=80) group, VT (N=28) and non-VT (N=78) group. Blood samples were collected at the time of admission to the emergency department. Additional blood samples were collected at the end of hospitalization from patients with the survival outcome.

Results: Early on admission, lower concentrations of anandamide and 2-AG were observed in the SS, IMV, and VT groups of patients with sepsis. Anandamide was found to be an independent risk factor for IMV and VT requirement with better or comparable performance to the inflammatory biomarkers C-reactive protein, procalcitonin, and interleukin-6. Although anandamide was recognised as a prognostic marker of sepsis mortality, markers and scores of organ damage in sepsis play a more important role in mortality prediction. At the end of hospitalization, endocannabinoids showed no change in plasma concentrations, indicating their possible important role in tissue regeneration. The correlation of the two endocannabinoids was high in all four observed outcomes, except for the SS, IMV, and VT groups, indicating different roles of anandamide and 2-AG in unwanted sepsis outcomes.

Conclusion: Early at hospital admission, baseline anandamide and 2-AG concentrations predicted SS development, as well as IMV and VT requirements in septic patients. These findings support the role of endocannabinoids as important regulators of inflammation and sepsis in humans.

Keywords: cytokine; endocannabinoids; inflammation; mortality; prognosis; sepsis

10. LITERATURA

1. Bishal G, Karan R, Amit SD. Sepsis: The evolution in definition, pathophysiology, and management. *SAGE Open Med.* 2019;7.
2. Reinhart K, Daniels R, Kissoon N, Machado FR, Schacher RD, Finfer S. Recognizing sepsis as a global health priority – A WHO resolution. *N Engl J Med.* 2017;377(5):414-417.
3. World Health Organization. Sepsis, 2020. Dostupno na adresi: <https://www.who.int/health-topics/sepsis>. Datum pristupa: 27.11.2022.
4. European Sepsis Alliance. European Sepsis Report 2021. Dostupno na adresi: <https://www.europeansepsisalliance.org/news/2021/9/9/the-first-esa-european-sepsis-report>. Datum pristupa: 27.11.2022.
5. Mellhammar L, Kahn F, Whitlow C, Kander T, Christensson B, Linder A. Bacteremic sepsis leads to higher mortality when adjusting for confounders with propensity score matching. *Sci Rep.* 2021;11:6972.
6. Bone RC, Balk RA, Cerra FB, Dellinger RP, Fein AM, Knaus WA, i sur. Definitions for sepsis and organ failure guidelines for the use of innovative therapies in sepsis: the ACCP/SCCM consensus conference committee. *Chest.* 1992;101(6):1644-1655.
7. Levy MM, Fink MP, Marshall JC, Abraham E, Angus D, Cook D, i sur. 2001 SCCM/ EISCM/ACCP/ATS/SIS international sepsis definitions conference. *Crit Care Med.* 2003;31:1250-1256.
8. Singer M, Deutschman CS, Seymour CW, Shankar-Hari M, Annane D, Bauer M, i sur. The third international consensus definitions for sepsis and septic shock (Sepsis-3). *JAMA.* 2016;315(8):801:810.
9. Cabrita JA, Pinheiro I, Menezes Falcao L. Rethinking the concept of sepsis and septic shock. *Eur J Intern Med.* 2018;54:1-5.
10. Kaukonen KM, Bailey M, Bellomo R. Systemic inflammatory response criteria for severe sepsis. *N Engl J Med.* 2015;373(9):881.

11. Seymour CW, Liu VX, Iwashyna TJ, Brunkhorst FM, Rea TD, Scherag A, i sur. 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.
12. Hotchkiss RS, Moldawer LL, Opal SM, Reinhart K, Turnbull IR, Vincent JL. Sepsis and septic shock. *Nat Rev Dis Primers*. 2016;2:16045.
13. Li Y, Yan C, Gan Z, Xi X, Tan Z, Li J, i sur. Prognostic values of SOFA score, qSOFA score, and LODS score for patients with sepsis. *Ann Palliat Med*. 2020;9(13):243-251.
14. Neubauer K, Zieger B. Endothelial cells and coagulation. *Cell Tissue Res*. 2022; 387:391-398.
15. Levi M, van der Poll T. Coagulation and sepsis. *Thromb Res*. 2016;149:38-44.
16. Shao Y, Cheng Z, Li X, Chernaya V, Wang H, Yang X. Immunosuppressive/anti-inflammatory cytokines directly and indirectly inhibit endothelial dysfunction – a novel mechanism for maintaining vascular function. *J Hematol Oncol*. 2014;7:80.
17. Fabri A, Kandara K, Coudereau R, Gossez M, Abraham P, Monard C, i sur. Characterization of circulating IL-10-producing cells in septic shock patients: A proof of concept study. *Front Immunol*. 2020;11:615009.
18. Gamper G, Havel C, Arrich J, Losert H, Pace NL, Müllner M, i sur. Vasopressors for hypotensive shock. *Cochrane Database of Systematic Reviews*. 2016;2:CD003709.
19. Vincent JL, Jones G, David S, Olariu E, Cadwell KK. Frequency and mortality of septic shock in Europe and North America: a systemic review and meta-analysis. *Crit Care*. 2019;23:196.
20. Pool R, Gomez H, Kellum JA. Mechanisms of organ dysfunction in sepsis. *Crit Care Clin*. 2018;34(1):63-80.
21. Sato R, Nasu M. A review of sepsis-induced cardiomyopathy. *J Intensive Care*. 2015;3:48.

22. Amnuaypattanapon K, Khansompop S. Characteristics and factors associated with the mortality of hypotensive patients attending the emergency department. *J Clin Med Res.* 2018;10(7):576-581.
23. Gyawali B, Ramakrishna K, Dhmoon AS. Sepsis: The evolution in definition, pathophysiology, and management. *SAGE Open Med.* 2019;7:2050312119835043.
24. Montiejunaite J, Amar L, Vidal-Petiot E. Adrenergic receptors and cardiovascular effects of catecholamines. *Ann Endocrinol.* 2021;82(3-4):193-197.
25. Evans L, Rhodes A, Alhazzani W, Antonelli M, Coopersmith CM, French C, i sur. Surviving Sepsis Campaign: International Guidelines for management of sepsis and Septic Shock 2021. *Crit Care Med.* 2021; 49(11):1063-1143.
26. Belletti A, Nagy A, Sartorelli M, Mucchetti M, Putzu A, Sartini C, i sur. Effect of continuous epinephrine infusion on survival in critically ill patients: a meta-analysis of randomized trials. *Crit Care Med.* 2020; 48(3):398:405.
27. De Backer D, Biston P, Devriendt J, Madl C, Cochrad D, Aldecoa C, i sur. Comparison of dopamine and norepinephrine in the threatment of shock. *N Engl J Med.* 2010;362(9):779-789.
28. De Backer D, Aldecoa C, Njimi H, Vincent JL. Dopamine versus norepinephrine in the treatment of the septic shock: a meta-analysis. *Crit Care Med.* 2012;40(3):725-730.
29. Mutlu GM, Factor P. Role of vasopressin in the management of septic shock. *Int Care Med.* 2004;30:1276-1291.
30. Shi R, Hamzaoui O, De Vita N, Monnet X, Teboul JL. Vasopressors in septic shock: which, when, and how much? *Ann Transl Med.* 2020;8(12):794.
31. Guerci P, Belveyre T, Mongardon N, Novy E. When to start vasopressin in septic shock: the strategy we propose. *Crit Care.* 2022;26:125.
32. Auriemma CL, Zhuo H, Delucchi K, Deiss T, Liu T, Jauregui A, i sur. Acute respiratory distress syndrome-attributable mortality in critically ill patients with sepsis. *Intensive Care Med.* 2020;46(6):1222-1231.

33. Bellani G, Laffey JG, Pham T, Fan E, Brochard L, Esteban A, i sur. Epidemiology, patterns of care, and mortality for patients with acute respiratory distress syndrome in intensive care units in 50 countries. *JAMA*. 2016;315(8):788-800.
34. Bauer PR, Gajic O, Nanchal R, Kashyap R, Martin-Loeches I, Sakr Y, i sur. Association between timing of intubation and outcome in critically ill patients: a secondary analysis of the ICON audit. *J Crit Care*. 2017;42:1-5.
35. Bellani G, Laffey JG, Pham T, Madotto F, Fan E, Brochard L, i sur. Noninvasive ventilation of patients with acute respiratory distress syndrome. Insights from the LUNG SAFE study. *Am J Respir Crit Care Med*. 2017;195(1):67-77.
36. De Montmollin E, Aboab J, Ferrer R, Azoulay E, Annane D. Criteria for initiation of invasive mechanical ventilation in septic shock: an international survey. *J Crit Care*. 2016;31(1):54-57.
37. Russotto V, Mayatra SN, Laffey JG, Tassistro E, Antolini L, Bauer P, i sur. Intubation practices and adverse peri-intubation events in critically ill patients from 29 countries. *JAMA*. 2021;325(12):1164-1172.
38. Jekarl DW, Lee S, Kim M, Kim Y, Woo SH, Lee WJ. Procalcitonin as a prognostic marker for sepsis based on SEPSIS-3. *J Clin Lab Ann*. 2019;33(9):e22996.
39. Kim MH, Choi JH. An update on sepsis biomarkers. *Infect Chemother*. 2020;52(1):1-18.
40. Lothar T, ur. Clinical laboratory diagnostics. Elektroničko izdanje, 2022. www.clinical-laboratory-diagnostics.com. Pristupljeno 05.02.2022.
41. Habib SH, Ansar W. Role of C-reactive protein (CRP) in sepsis: Severity and outcoma. U: Clinical significance of C-reactive protein. Ansar W, Ghosh S, ur. Springer, 2020.
42. Koozi H, Lengquist M, Frigyesi A. C-reactive protein as a prognostic factor in intensive care admissions for sepsis: A Swedish multicenter study. *J Crit Care*. 2020;56:73-79.

43. Müller B, White JC, Nylén ES, Snider RH, Becker KL, Habener JF. Ubiquitous expression of the Calcitonin-1 gene in multiple tissues in response to sepsis. *J Clin Endocrinol Metab.* 2001;86(1):396-404.
44. Hassan J, Khan S, Zahra R, Razaq A, Zain A, Razaq L, i sur. Role of procalcitonine and C-reactive protein as predictors of sepsis and in managing sepsis in postoperative patients: A systematic review. *Cureus.* 2022;14(11):e31067.
45. Kopterides P, Siempos II, Tsangaris I, Tsantes A, Armaganiolis A. Procalcitonin-guided algorithms of antibiotic therapy in the intensive care unit: A systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. *Crit Care Med.* 2010;38:2229-2241.
46. Wirz J, Meier MA, Bouadma L, Luyt CE, Wolff M, Chastre J, i sur. Effect of procalcitonine-guided antibiotic treatment on clinical outcomes in intensive care unit patients with infection and sepsis: A patient-level meta-analysis of randomized trials. *Crit Care.* 2018;22:1-11.
47. Jain S, Sinha S, Sharma SK, Samantaray JC, Aggrawal P, Vikram NK, i sur. Procalcitonin as prognostic marker for sepsis: a prospective observational study. *BMC Res Notes.* 2014;7:458.
48. Tanaka T, Narazaki M, Kishimoto T. Interleukin-6 in inflammation, immunity, and disease. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2014;6(10):a016295.
49. Vivas MC, Guerrero Villamarin HC, Tascon AJ, Valderrama-Aguirre A. Plasma interleukin-6 level correlate with survival in patients with bacterial sepsis and septic shock. *Interv Med Appl Sci.* 2021;11(4):224-230.
50. Agnello L, Giglio RV, Bivona G, Scazzone C, Gambino CM, Iacona A, i sur. The value of complete blood count (CBC) for sepsis diagnosis and prognosis. *Diagnostics.* 2021;11(10):1881.
51. Farkas JD. The complete blood count to diagnose septic shock. *J Thorac Dis.* 2020;12(Suppl 1):S16-S21.
52. Kilaru A, Chapman KD. The endocannabinoid system. *Esseys Biochem.* 2020;64(3):485-499.

53. Hanus LO. Pharmacological and therapeutic secrets of plant and brain (endo) cannabinoids. *Med Res Rev.* 2008;29:213-271.
54. Mechoulam R, Feigenbaum JJ, Lander N, Segal M, Järbe TU, Hiltunen AJ, i sur. Enantiomeric cannabinoids-stereospecificity of psychotropic activity. *Experientia.* 1988;44:726-764.
55. Devane WA, Hanus L, Breuer A, Pertwee RG, Stevenson LA, Griffin G, i sur. Isolation and structure of a brain constituent that binds to the cannabinoid receptor. *Science.* 1992;258:1946-1949.
56. Sugiura T, Kondo S, Sukagawa A, Nakane S, Shinoda A, Itoh K, i sur. 2-arachidonoylglycerol: a possible endogenous cannabinoid receptor ligand in brain. *Biochem Biophys Res Commun.* 1995;215:89-97.
57. Matheson J, Zhou XMM, Bourgault Z, LeFoll B. Potential of fatty acid amide hydrolase (FAAH), monoacylglycerol lipase (MAGL), and diacylglycerol lipase (DAGL) enzymes as targets for obesity treatment: a narrative review. *Pharmaceuticals.* 2021;14(12):1316.
58. Urquhart P, Nicolaou A, Woodward DF. Endocannabinoids and their oxygenation by cyclo-oxygenases, lipoxygenases and other oxygenases. *Biochim Biophys Acta.* 2015;1851:366-376.
59. Baggelaar MP, Maccarrone M, van der Stelt M. 2-arachidonoylglycerol: A signaling lipid with manifold actions in the brain. *Prog Lipid Res.* 2018;71:1-17.
60. Oddi S, Fezza F, Pasquariello N, D'Agostino A, Catanzaro G, De Simone C, i sur. Molecular identification of albumin and Hsp70 as cytosolic anandamide-binding proteins. *Chem Biol.* 2009;16(6):624-632.
61. Huang H, McIntosh AL, Martin GG, Landrock D, Chung S, Landrock KK, i sur. FABP1: a novel hepatic endocannabinoid and cannabinoid binding protein. *Biochemistry.* 2016;55:5243-5255.
62. Kumar KK, Shalev-Benami M, Robertson MJ, Hu H, Banister SD, Hollingsworth SA, i sur. Structure of signaling cannabinoid receptor 1-G protein complex. *Cell.* 2019;176(3):448-458.

63. Ibsen MS, Connor M, Glass M. Cannabinoid CB1 and CB2 receptor signaling and bias. *Cannabis Cannabinoid Res.* 2017;2(1):48-60.
64. Chianese R, Meccariello R, ur. *Cannabinoids in health and disease.* IntechOpen Limited, London, Ujedinjeno Kraljevstvo; 2016.
65. Navarro G, Morales P, Rodriguez-Cueto C, Fernandez-Ruiz J, Jagerovic N, Franco R. Targeting cannabinoid CB2 receptors in the central nervous system. *Medicinal chemistry approaches with focus on neurodegenerative disorders.* *Front Neurosci.* 2016;10:406.
66. Basu S, Dittel BN. Unraveling the complexities of cannabinoid receptor 2 (CB2) immune regulation in health and disease. *Immunol Res.* 2011;51:26-38.
67. Howlett AC, Abood ME. CB1 and CB2 receptor pharmacology. *Adv Pharmacol.* 2017;80:169-206.
68. Chavez AE, Chiu CQ, Castillo PE. TRPV1 activation by endogenous anandamide triggers postsynaptic long-term depression in dentate gyrus. *Nat Neurosci.* 2010;13:1511-1518
69. Yang H, Zhou J, Lehmann C. GPR55 – a putative “type 3” cannabinoid receptor in inflammation. *J basic Clin Physiol Pharmacol.* 2016;27(3):297-302.
70. Cristino L, Bisogno T, Di Marzo V. Cannabinoids and the expanded endocannabinoid system in neurological disorders. *Nat Rev Neurol.* 2020;16:9-29.
71. Donvito G, Nass SR, Wilkerson JL, Curry ZA, Schurman LD, Kinsey SG, i sur. The endogenous cannabinoid system: a budding source of targets for treating inflammatory and neuropathic pain. *Neuropsychopharmacology.* 2018;43:52-79.
72. Robinson RH, Meissler JJ, Fan X, Yu D, Adler MW, Eisenstein TK. A CB2-selective cannabinoid suppresses T-cell activities and increases Tregs and IL-10. *J Neuroimmune Pharmacol.* 2015;10:318-332.
73. Sardinha J, Lehman C, Kelly M. Targeting endocannabinoid system to treat sepsis. *Signa Vitae.* 2013;8(1):9-14.
74. Sun S, Hu F, Wu J, Zhang S. Redox biology cannabidiol attenuates OGD/R-induced damage by enhancing mitochondrial bioenergetics and modulating glucose

- metabolism via pentose-phosphate pathway in hippocampal neurons. *Redox Biol.* 2017;11:577-585
75. Khodadadi H, Salles EL, Jarrani A, Chibane F, Costigliola V, Yu JC, i sur. Cannabidiol modulates cytokine storm in acute respiratory distress syndrome induced by stimulated viral infection using synthetic RNA. *Cannabis and Cannabinoid Res.* 2020;5(3):197-201.
 76. Nagre N, Nicholson G, Cong X, Lockett J, Pearson AC. Activation of cannabinoid-2 receptor protects against *Pseudomonas aeruginosa* induced acute lung injury and inflammation. *Resp Res.* 2022;23(1):1-13.
 77. Villanueva A, Yilmaz SM, Millington WR, Cutrera RA, Stouffer DG, Parsons LH, i sur. Central cannabinoid 1 receptor antagonist administration prevents endotoxic hypotension affecting norepinephrine release in the preoptic anterior hypothalamic area. *Shock.* 2009;32:614-620.
 78. Clinical and laboratory Standards Institute (CLSI). Studies to evaluate patient outcomes; Approved guideline. CLSI document GP45-A. Clinical and Laboratory Standards Institute, Pennsylvania, SAD. 2004. (ISBN: 1-56238-549-6).
 79. Shawver L, Mazur N, O'Neil S, Reed B, Meram S, Paxton J. The impact of comorbidities on mortality in pre-shock sepsis. *Ann Emerg Med.* 2021;78(4):S17.
 80. Ahlström B, Frithiof R, Larsson IM, Strandberg G, Lipcsey M, Hultström M. A comparison of impact of comorbidities and demographics on 60-day mortality in ICU patients with COVID-19 sepsis and acute respiratory distress syndrome. *Sci Reports.* 2022;12:15703.
 81. Mellhamier L, Kahn F, Whitlow C, Kander T, Christensson B, Linder A. Bacteremic sepsis leads to higher mortality when adjusting for confounders with propensity score matching. *Sci Reports.* 2021;11:6972.
 82. Nannan Panday RS, Lammers EMJ, Nanayakkora PWB. An overview of positive cultures and clinical outcomes in septic patients: a sub-analysis of the prehospital Antibiotics Against Sepsis (PHANTASi) trial. *Crit Care.* 2019;23(8):182.

83. Ladak N, Lam PMW, Serrano-Gomez A, McDonald J, Konje JC, Thompson JP, i sur. Plasma endocannabinoid concentrations in sepsis. *Br J Anaesth.* 2010;105(5):719P.
84. Raff H, Kramer DJ, Hillard CJ. Increase in the circulating endocannabinoid 2-arachidonoylglycerol is associated with gabapentin use in septic ICU patients. *Endocrine.* 2017;58:203-204.
85. Ladak N. The role of cannabinoid system in sepsis. University of Leichester. 2012.
86. Turcotte C, Chouinard F, Lefebvre JS, Flamand N. Regulation of inflammation by cannabinoids, the endocannabinoids 2-arachidonoylglycerol and arachidonylethanol-amide, and their metabolites. *J Leuk Bio.* 2015;97:1049-1066.
87. Correa F, Mestre L, Docagne F, Guaza C. Activation of cannabinoid CB2 receptor negatively regulates Il-12p40 production in murine macrophages: Role of IL-10 and ERK1/2 kinase signaling. *Br J Pharmacol.* 2005;145(4):441-448.
88. Angelina A, Perez-Diego M, Lopez-Abente J, Rückert B, Nombela I, Akdis A, i sur. Cannabinoids induce functional Treg by promoting tolerogenic dendritic cells via autophagy and metabolic reprogramming. *Mucosal Immunology.* 2022;15:96-108.
89. Clayton P, Hill M, Bogoda N, Subah S, Venkatesh R. Palmitoylethanolamide: A natural compound for health management. *Int J Mol Sci.* 2021;22:5305.
90. D'Aloia A, Arrigoni F, Tisi R, palmioli A, Ceriani M, Artusa V, i sur. Synthesis, molecular modeling, and biological evaluation of metabolically stable analogues of the endogenous fatty acid amide palmitoylethanolamide. *Int J Mol Sci.* 2020;21(23):9074.
91. Hillard CJ. Circulating endocannabinoids: From whence do they come and where are they going? *Neuropsychopharmacology Rev.* 2018;43:155-172.
92. Berdyshev EV, Schmidt PC, Krebsbach RJ, Schmidt JJ. Activation of PAF receptors results in enhanced synthesis of 2-arachidonoylglycerol (2-AG) in immune cells. *FASEB J.* 2001;15:2171-2178.

93. Surandi IW, Sinardja CD, Suryadi IA. Role of procalcitonine in predicting mortality and organ dysfunction at intensive care admission. *Int J Gen Med.* 2022;15:4917-4923.
94. Zaccone V, Falsetti L, Nitti C, Gentili T, Marchetti A, Piersantelli MN, i sur. The prognostic role of procalcitonin in critically ill patients admitted in a medical stepdown unit: A retrospective cohort study. *Sci Rep.* 2020;10(1):4531.
95. Effendi B, Pitoyo CW, Sinto R, Suwanto S. Procalcitonin prognostic value in predicting mortality among adult patients with sepsis due to gram-negative bacteria. *MJI.* 2022;31:1.
96. Mohamed AKS, Mehta AA, James P. Predictors of mortality of severe sepsis among adult patients in the medical Intensive Care Unit. *Lung India.* 2017;34(4):330-335.
97. Walborn A, Hoppensteadt D, Rondina MT, Fareed J. Development of an algorithm to predict mortality in patients with sepsis and coagulopathy. *Blood.* 2018;132:3791.
98. Spoto S, Cella E, de Cesaris M, Locorriere L, Mazzaroppi S, Nobile E, i sur. Procalcitonin and MR-proadrenomedullin combination with SOFA and qSOFA scores for sepsis diagnosis and prognosis: a diagnostic algorithm. *Shock.* 2018;50(1):44-52.
99. Eisenstein TK, Meissler JJ Jr, Wilson Q, Gaughan JP, Adler MW. Anandamide and Δ^9 -tetrahydrocannabinol directly inhibit cells of the immune system via CB2 receptors. *J Neuroimmunol.* 2007;189(1-2):17-22.
100. Hernandez-Cervantes R, Mendez-Diaz M, Prospero-Garcia O, Morales-Montor J. Immunoregulatory role of cannabinoids during infectious disease. *Neuroimmunomodulation.* 2017;24:183-199.
101. Feldman M, Smoum R, Mechoulam R, Steinberg D. Antimicrobial potential of endocannabinoid and endocannabinoid-like compounds against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Nat Sci Rep.* 2018;8:17696
102. Friedman L, Smoum R, Feldman M, Mechoulam R, Steinberg D. Does the endocannabinoid anandamide affect bacterial quorum sensing, vitality, and motility? *Cannabis Cannabinoid Res.* 4(2):102-109.

103. Csoka B, Nemeth ZH, Mukhopadhyay P, Spolarics Z, Rajesh M, Federici S, i sur. CB2 cannabinoid receptors contribute to bacterial invasion and mortality in polymicrobial sepsis. *PloS ONE*. 2009;4(7):e6409.
104. Karakike E, Kyriazopoulou E, Tsangaris I, Routsis C, Vincent JL, Giamarellos-Bourboulis EJ. The early change of SOFA score as a prognostic marker of 28-day sepsis mortality: analysis through a derivation and validation cohort. *Crit Care*. 2019;23:387.
105. Williams JM, Greenslade JH, Chu K, Brown AFT, Lipman J. Severity scores in emergency department patients with presumed infection: a prospective validation study. *Crit Care Med*. 2016;44:539-547.
106. Maccarrone M, Lorenzon T, Bari M, Melino G, Finazzi-Agro A. Anandamide induces apoptosis in human cells via vanilloid receptors. *J Biol Chem*. 2000;275(41):31938-31945.
107. Kohro S, Imaizumi H, Yamakage M, Masuda Y, Namiki A, Asai Y, i sur. Anandamide absorption by direct hemoperfusion with polymyxin B-immobilized fiber improves the prognosis and organ failure assessment score in patients with sepsis. *J Anesth*. 2006;20:11-16
108. Turcotte C, Blanchet MR, Laviolette M, Flamand N. The CB2 receptor and its role as a regulator of inflammation. *Cell Mol Life Sci*. 2016;73(23):4449-4470.
109. Rayoo SM, Han KS, Ahn S, Shin TG, Hwang SY, Chung SP, i sur. The usefulness of C-reactive protein and procalcitonin to predict prognosis of septic shock patients: a multicenter prospective registry-based observational study. *Sci Rep*. 2019;9:6579.
110. Staiano RI, Loffredo S, Borriello F, Iannotti FA, Piscitelli F, Orlando P, i sur. Human lung-resident macrophages express Cb1 and CB2 receptors whose activation inhibits the release of angiogenic and lymphangiogenic factors. *J Leukoc Biol*. 2016;99:531-540.
111. Turcotte C, Blanchet MR, Laviolette M, Flamand N. Impact of cannabis, cannabinoids, and endocannabinoids in the lungs. *Front Pharmacol*. 2016;7:317.

112. Wu K, Xiu Y, Zhou P, Qiu Y, Li Y. A new use for an old drug: carmofur attenuates lipopolysaccharide (LPS)-induced acute lung injury via inhibition of FAAH and NAAA activities. *Front Pharmacol.* 2019;10:818.
113. Bozkurt TE. Endocannabinoid system in the airways. *Molecules.*2019;24:4626.
114. Liu AP, Yuan QH, Zhang B, Yang L, He QW, Chen K, i sur. Cannabinoid receptor 2 activation alleviates septic lung injury by promoting autophagy via inhibition of inflammatory mediator release. *J Cell Signal.* 2020;69:109556-109600.
115. Khodadadi H, Salles EL, Jarrahi A, Chibane F, Costigliola V, Yu JC, i sur. Cannabidiol modulates cytokine storm in acute respiratory distress syndrome induced by stimulated viral infection using synthetic RNA. *Cannabis Cannabinoid Res.* 2020;5(3):197-201.
116. Alhouayek M, Masquelier J, Cani PD, Lambert DM, Muccioli GG. Implication of the anti-inflammatory bioactive lipid prostaglandin D2-glycerol ester in the control of macrophage activation and inflammation by ABHD6. *Proc Natl Acad Sci.* 2013;110:17558-17563.
117. Costola-de-Souza C, Ribeiro A, Ferraz-de-Paula V, Calefi AS, Aloia TPA, Gimenes JA-mladi, i sur. Monoacylglycerol lipase (MAGL) inhibition attenuates acute lung injury in mice. *PLoS ONE.* 2013;8:e77706.
118. Weis F, Beiras-Fernandez A, Hauer D, Hornuss C, Sodian R, Kreth S, i sur. Effect of anaesthesia and cardiopulmonary bypass on blood endocannabinoid concentrations during cardiac surgery. *Br J Anaesth.* 2010;105(2):139-144.
119. Wahn H, Wolf J, Kram F, Frantz S, Wagner JA. The endocannabinoid arachidonylethanolamide (anandamide) increases pulmonary arterial pressure via cyclooxygenase-2 products in isolated rabbit lungs. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2005;289:H2491-H2496.
120. Kase Y, Obata T, Okamoto Y, Iwai K, Saito K, Yokoyama K, i sur. Removal of 2-arachidonoylglycerol by direct hemoperfusion therapy with polymyxin B immobilized fibers benefits patients with septic shock. *Ther Apher Dial.* 2008; 12(5):374-380.

121. Sultan M, Alghetaa H, Mohammed A, Abdula OA, Wisniewski PJ, Singh N, i sur. The endocannabinoid anandamide attenuates acute respiratory distress syndrome by downregulating miRNA that target inflammatory pathways. *Front Pharmacol.* 2021;12:644281.
122. McNamee EN, Rayn KM, Griffin EW, Gonzales-Reyes RE, Ryan KJ, Harkin A, i sur. Noradrenaline action at central beta-adrenoreceptors induces interleukin-10 and supressor of cyokine signaling-3 expression in rat brain: implication for neurodegeneration. *Brain Behav Immun.* 2010;24(4):660-671.
123. Godlewski G, Malinowska B, Schlicker E. Presynaptic cannabinoid CB(1) receptors are involved in the inhibition of the neurogenic vasopressor response during septic shock in pithed rats. *Br J Pharmacol.* 2004;142:701-708.
124. Richter JS, Quenardelle V, Rouyer O, Raul JS, Beaujeux R, Geny B, i sur. A systematic review of the complex effects of cannabinoids on cerebral and peripheral circulation in animal models. *Front Physiol.* 2018;9:622.
125. Wagner JA, Hu K, Bauersachs J, Karcher J, Wiesler M, Goparaju SK, i sur. Endogenous cannabinoids mediate hypotension after experimental myocardial infarction. *J Am Coll Cardiol.* 2001;38(7):2048-54.
126. Varga K, Wagner JA, Ellis EF, Rzigalinski BA, Martin BR, Kunos G. Activation of peripheral CB1 cannabinoid receptors in haemorrhagic shock. *Nature.* 1997;390(6659):518-21.
127. Batkai S, Pacher P, Jarai Z, Wagner JA, Kunos G. Cannabinoid antagonist SR-141716 inhibits endotoxic hypotension by a cardiac mechanism not involving CB1 and CB2 receptors. *Am J Physio-Heart.* 2004;287:H595-H600.
128. Pacher P, Kogan NM, Mechoulam R. Beyond THC and endocannabinoids. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 2020;60:637-659.
129. Bondarenko AI, Panasiuk O, Drachuk K, Montecucco F, Brandt KJ, Mach F. The quest for endothelial atypical cannabinoid receptor: BKCa channels act as cellular sensors for cannabinoids in in vitro and in situ endothelial cells. *Vasc Pharmacol.* 2018;102:44–55.

130. Parmar N, Ho W-SV. N-arachidonoyl glycine, an endogenous lipid that acts as a vasorelaxant via nitric oxide and large conductance calcium-activated potassium channels. *Br J Pharmacol.* 2010;160:594–603.
131. Kwolek G, Zakrzeska A, Kozłowska H, Malinowska B. Influence of anandamide, the endogenous agonist of cannabinoid receptors, on the circulatory system. *Postepy Hig med Dosw.* 2005;59:208-218.
132. Malinowska B, Baranowska-Kuczko M, Schlicker E. Triphasic blood pressure responses to cannabinoids: do we understand the mechanism? *Br J Pharmacol.* 2012;165:2073-2088.
133. Tamaki C, Nawa H, Takatori S, Oda S, Sendo T, Zamami Y, i sur. Anandamide induces endothelium-dependent vasoconstriction and adrenergic nerve-mediated vasodilation in the rat mesenteric vascular bed. *J Pharmacol Sci.* 2012;118:496-505.
134. Schelling G, Hauer D, Azad SC, Schmoelz M, Chouker A, Schmidt M i sur. Effects of general anesthesia on anandamide blood levels in humans. *Anesthesiology.* 2006;104:273-277.

11. ŽIVOTOPIS

Ime i prezime: Ines Šahinović

Zvanje: mag. med. biochem., specijalist medicinske biokemije i laboratorijske medicine, EuSpLM

Datum i mjesto rođenja: 04.09.1986., Našice, Hrvatska

e-mail: sahinovic.ines@kbco.hr, isahinovic@gmail.com

Zaposlenje: Odjel za imunološku i alergološku dijagnostiku, Klinički zavod za laboratorijsku dijagnostiku, Klinički bolnički centar Osijek

Školovanje:

- od 2013. do danas poslijediplomski doktorski studij Biomedicina i zdravstvo, Medicinski fakultet Osijek, Sveučilište J.J. Strossmayer u Osijeku
- 2013.-2017. poslijediplomski specijalistički studij Medicinske biokemije i laboratorijske medicine, Farmaceutsko-biokemijski fakultet, Sveučilište u Zagrebu
- 2010.-2011. pripravnički staž iz medicinske biokemije, Klinički zavod za laboratorijsku dijagnostiku, Klinički bolnički centar Osijek
- 2005.-2010. integrirani diplomski studij Medicinske biokemije, Farmaceutsko-biokemijski fakultet, Sveučilište u Zagrebu
- 2001.-2005. opća gimnazija Stjepan Ivšić, Orahovica

Radno iskustvo

- 2013. do danas Odjel za imunološku i alergološku dijagnostiku, Klinički zavod za laboratorijsku dijagnostiku, Klinički bolnički centar Osijek
- 2014.-2020. vanjski suradnik-asistent na Katedri za medicinsku biokemiju, biokemiju i kliničku kemiju, Medicinski fakultet Osijek, Sveučilište J.J. Strossmayer u Osijeku
- 2012. voditelj medicinsko-biokemijskog laboratorija, Ustanova za zdravstvenu skrb Bonifarm zdravlje, Zagreb
- 2010.-2011. vanjski suradnik-asistent na Zavodu za medicinsku biokemiju i hematologiju, Farmaceutsko-biokemijski fakultet, Sveučilište u Zagrebu

Članstva i aktivnosti u znanstvenim i stručnim udrugama:

- Hrvatsko društvo za medicinsku biokemiju i laboratorijsku medicinu, od 2010.

- Hrvatska komora medicinskih biokemičara, od 2011.
- Član Povjerenstva za stručna pitanja, Hrvatske komore medicinskih biokemičara, 2018.-2022.
- Član radne grupe „Young Scientists“ Europske federacije za laboratorijsku medicinu, EFLM, 2019. do danas
- Član Povjerenstva za trajno usavršavanje, Hrvatske komore za medicinskih biokemičara, 2022. do danas

Nagrade:

- 2010. Dekanova nagrada Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu za najbolji studentski rad

Publikacije iz teme doktorske disertacije

1. Šahinović I, Mandić S, Mihić D, Duvnjak M, Loinjak D, Sabadi D, Majić Z, Perić Lj, Šerić V. Endocannabinoids, anandamide and 2-arachidonoylglycerol, as prognostic markers of sepsis outcome and complications. *Cannabis and Cannabinoid Research*, 2022; 1-10. DOI: 10.1089/can.2022.0046.
2. Šahinović I, Mandić S, Mihić D, Duvnjak M, Loinjak D, Sabadi D, Majić Z, Perić Lj, Šerić V. Plasma concentration of endocannabinoid anandamide as sepsis mortality predictor. 1st Biomedicine and health PhD Students Congress with international participation, Rijeka, Croatia, 2022.
3. Šahinović I, Mandić S, Mihić D, Loinjak D, Sabadi D, Duvnjak M, Šerić V. Circulating calprotectin as early marker of sepsis mortality. *Biochemia Medica* 2022; 32(Suppl 1): S1-S235. 10th Congress of the Croatian Society of Medical Biochemistry and Laboratory Medicine with international participation, Zagreb, Croatia.
4. Šahinović I, Mandić S, Majić Z, Duvnjak M, Mihić D, Vlahović N, Perić Lj, Šerić V. Endocannabinoids anandamide and 2-arachidonoylglycerol in sepsis. *Clin Chem Lab Med* 2021; 59, Special Suppl, pp S94-S835. 24nd IFCC-EFLM European Congress of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine. EuroMedLab 2021, Munich, Germany.
5. Šahinović I, Mandić S, Majić Z, Perić Lj, Šerić V. Low plasma concentration of endocannabinoid 2-arachidonoylglycerol increases the risk for invasive mechanical ventilation in septic patients. 2021. On-line IFCC Global Conference on COVID-19.

Ostale publikacije:

1. Oršić Frič V, Borzan V, Šahinović I, Borzan A, Kurbel S. Real-world study on vedolizumab serum concentration, efficacy, and safety after the transition from intravenous to subcutaneous vedolizumab in inflammatory bowel disease patients: single-center experience. *Pharmaceuticals*. 2023;16:239. DOI: 10.3390/ph16020239
2. Mihić D, Loinjak D, Maričić L, Smolić R, Šahinović I, Steiner K, Viland S, Šerić V, Duvnjak M. The relationship between Nrf-2 and HO-1 with severity of COVID-19 disease. *Medicina*, 2022; 58(11):1658. DOI: 10.390/medicina58111658.
3. Kardum Ž, Milas-Ahić J, Šahinović I, Masle AM, Uršić D, Kos M. Serum levels of interleukin 17 and 22 in patients with systematic sclerosis: a single-center cross-sectional study. *Rheumatology International*,2022. DOI:10.1007/s00296-022-05250-w
4. Sušić L, Maričić L, Klobučar L, Šahinović I, Kralik K, Sušić T, Vincelj J. Endothelial dysfunction, left ventricular diastolic dysfunction and the Systemic Coronary Risk Evaluation2 algorithm – a cross-sectional study. *Cardiologia Croatica*, 2022.;17(9-10):256. 14th Congress of the Croatian Cardiac Society with international participation Zagreb, Croatia.
5. Požgajn Z, Dulić G, Kondža G, Bogović S, Šerić I, Hil D, Trogrlić B, Bednjajić A, Perković-Kovačević M, Šahinović I. Is postoperative cognitive decline after cardiac surgery associated with plasma beta amyloid 1-42 levels? *J Cardiothor Sur*, 2022; 17:6. DOI: 10.1186/s13019-022-01755-4.
6. Šahinović I, Mihić D, Loinjak D, Sarić I, Sabadi D, Duvnjak M, Mandić S, Šerić V. Atellica COVID-19 severity algorithm in early prognosis of COVID-19 disease severity. *Biochemia Medica* 2022; 32(Suppl 1): S1-S235. 10th Congress of the Croatian Society of medical Biochemistry and Laboratory Medicine with international participation, Zagreb, Croatia.
7. Šahinović I, Loinjak D, Mihić D, Sarić I, Mandić S, Šerić V. Changes in the oxyhaemoglobin dissociation curve in severe COVID-19 disease. *Biochemia Medica* 2022; 32(Suppl 1): S1-S235. 10th Congress of the Croatian Society of Medical Biochemistry and Laboratory Medicine with international participation, Zagreb, Croatia.
8. Šahinović I, Oršić Frič V, Konjik V, Borzan V, Pavela J, Šerić V. Serum concentration of infliximab in a child born to mother treated with infliximab and vaccination safety. *Biochemia Medica*, 2022; 32(Suppl 1): S1-S235. 10th Congress of the Croatian Society

- of Medical Biochemistry and Laboratory Medicine with international participation, Zagreb, Croatia.
9. Šahinović I, Pavela J, Šerić V. Verification of insulin and C-peptide immunoassays on the Maglumi 800 analyser. *Biochemia Medica* 2022; 32(Suppl 1): S1-S235. 10th Congress of the Croatian Society of Medical Biochemistry and Laboratory Medicine with international participation, Zagreb, Croatia.
 10. Šahinović I, Oršić Frič V, Konjik V, Pavela J, Borzan V, Šerić V. Point-of-care testing in therapeutic drug monitoring of infliximab. *J Crohn's and Colitis*, 2022; vol 16/S1.
 11. Šahinović I, Oršić Frič V, Konjik V, Pavela J, Borzan V, Šerić V. Analytical validation of ProCise Dx POC analyser for therapeutic drug monitoring of infliximab. *Clin Chem Lab Med* 2021; 59, Special Suppl, pp S94-S835. 24nd IFCC-EFLM European Congress of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine. EuroMedLab 2021, Munich, Germany.
 12. Bosnić Z, Yildirim P, Babić F, Šahinović I, Wittinger T, Martinović I, Trtica Majnarić Lj. Clustering inflammatory markers with sociodemographic and clinical characteristics of patients with diabetes type 2 can support family physicians' clinical reasoning by reducing patients' complexity. *Healthcare*, 2021; 6;9(12):1687. DOI: 10.3390/healthcare9121687.
 13. Kopic V, Barbić J, Petrović S, Šahinović I, Mihaljević D, Kopic A, Bošnjak A. Periodontal disease in different stages of chronic kidney disease. *Acta Clin Croat*, 2019; 58:709-715. DOI: 10.20471/acc2019.58.04.18
 14. Šahinović I, Sinčić-Petričević J, Oršić-Frič V, Borzan V, Pavela J, Fijačko M, Šerić V. Therapeutic monoclonal antibody interference in electrophoretic and immunofixation techniques. *Clin Chim Acta*, 2019; 493:S1-S776. 23rd IFCC-EFLM European Congress of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine. EuroMedLab 2019, Barcelona, Spain.
 15. Šimundić T, Jelaković B, Džumhur A, Turk T, Šahinović I, Dobrošević B, Takač B, Barbić J. Interleukin 17A and Toll-like receptor 4 in patients with arterial hypertension. *Kidney Blood Press Res*, 2017; 42:99-108.