



## Novi aspekti patofiziologije sepse kod kritično obolelih

### New aspects of sepsis pathophysiology in critically ill

Dragan Djordjević\*, Maja Šurbatović\*, Djordje Ugrinović†, Sonja Radaković‡,  
Jasna Jevdjić†, Nikola Filipović\*, Predrag Romić\*, Duško Jovanović\*

Vojnomedicinska akademija, \*Klinika za anesteziologiju i intenzivnu terapiju, †Institut za higijenu, Beograd, Srbija; ‡Medicinski fakultet, Univerzitet u Kragujevcu, Kragujevac, Srbija

#### Ključne reči:

sepsa; šok; kritična stanja; patologija; fiziologija; imunski faktori; prognoza.

#### Key words:

sepsis; shock; critical illness; pathology; physiology; immunologic factors; prognosis.

#### Uvod

Još od doba Hipokrata koji je 400. godine pne prvi opisao sepsu, imunopatofiziologija ovog kompleksnog oboljenja ostaje kontroverzna tema koja je predmet mnogih istraživanja. I autori ovog opšteg pregleda posvetili su se u poslednjoj dekadi ovoj intrigantnoj oblasti i to sa različitim aspektima. Naime, proučavali smo disfunkciju različitih organa u sepsi (miokarda i pluća), kao i sindrom multiple organske disfunkcije (MODS), zatim imunske kaskade sepse i ulogu pro- i antiinflamatornih citokina, odnos infekcije i inflamacije, acidobazni status bolesnika sa sepsom i genski polimorfizam kod različitih medijatora i receptora od značaja za težinu i ishod sepse<sup>1-23</sup>. Svojim istraživanjima u proteklih 10 godina obuhvatili smo veoma veliki broj bolesnika sa traumom i ratnom povredom koje su se veoma često komplikovale sekundarnom sepsom, kao i sepsom druge etiologije a, takođe, ispitali smo i skorove sepse kod različitih bolesnika.

#### Od čega umiru bolesnici sa sepsom?

Nova istraživanja iz ove oblasti dovela su do nekih neočekivanih otkrića, kao na primer da postoji diskrepancija između histološkog nalaza i stepena organske disfunkcije kod bolesnika koji su umrli od sepse. Čelijska smrt u srcu, bubrezima, jetri i plućima bila je veoma malo izražena i nije bila u korelaciji sa klinički veoma izraženom disfunkcijom ovih organa. Takva disfunkcija organa kod bolesnika sa sepsom može se objasniti „hibernacijom“ ćelija kao mehanizmom organske disfunkcije. Sepsa aktivira odbrambene mehanizme koji dovode do toga da se procesi u ćeliji svedu na bazični nivo održavanja.

Nijedno istraživanje obdukovanih bolesnika koji su umrli od sepse ne objašnjava zašto su oni umrli. U nekim slučajevima, bolesnik sa sepsom može umreti od refrakternog šoka, ali ovo je izuzetak. Iako bolesnici sa sepsom imaju izraženu disfunkciju miokarda, minutni volumen srca obično se održava dilatacijom srca i tahikardijom. Iako se akutni respiratorni distres sindrom (ARDS) često razvija kod bolesnika sa sepsom, oni retko umiru od hipoksemije ili hiperkarbije. Bubrežna insuficijencija je česta, ali sama po sebi nije fatalna zbog mogućnosti dijalize. Disfunkcija jetre retko progredira do hepatičke encefalopatije. Stoga se može reći da se tačan uzrok smrti bolesnika sa sepsom još uvek ne zna<sup>24, 25</sup>.

Odgovor organizma na patogene agense uključuje ukidanje signala između mnogih imunskih ćelija, kao što su makrofage, dendritične ćelije i CD4 T-limfociti. Makrofage i dendritične ćelije aktiviraju se ingestijom bakterija i stimulacijom preko citokina (npr. interferon IFN- $\gamma$ ) koje luče CD4 T-limfociti. Alternativno, CD4 T-limfociti koji imaju antiinflamatorni profil (tip 2 helper T-ćelija – Th2) proizvode interleukin (IL)-10 koji suprimira aktivnost makrofaga. CD4 T-ćelije aktiviraju se stimulacijom od strane makrofaga i dendritičnih ćelija. Na primer, makrofage i dendritične ćelije luče IL-12, koji aktivira CD4 T-ćelije koje onda proizvode proinflamatorne citokine (tip 1 helper T-ćelije – Th1). U zavisnosti od brojnih faktora (tip mikroorganizma i mesto insulata), makrofage i dendritične ćelije odgovorice indukcijom ili pro- ili antiinflamatornih citokina, ili će redukovati sintezu citokina (anergija). Makrofage ili dendritične ćelije, koje su prethodno ingestijom u sebe unele nekrotične ćelije, indukuju proinflamatorni profil citokina (Th1). Ingestija apoptotičnih ćelija može indukovati ili antiinflamatorni profil citokina (Th2) ili anergiju. Ovo je jedno od novijih objašnjenja

zbog čega kod nekih bolesnika sa traumom i/ili sepsom indukovanim MODS dominira proinflamatorni, a kod drugih antiinflamatorni imunski odgovor.

Do sada se smatralo da se sepsa javlja onda kada mikrobni produkti aktiviraju *Toll-like* receptore (TLR) na makrofagama, stimulišući tako sistemsku inflamaciju. Etiologija sepse sada se potpuno preokreće novim modelom koji predstavlja veliki izazov dosadašnjem kanonizovanom modelu sepse<sup>26</sup>. Lipopolisaharid (LPS), endotoksin gram-negativnih bakterija, uopšte se ne može detektovati kod većine bolesnika sa sepsom, a i kada se detektuje njegov nivo ne predviđa ni težinu ni ishod oboljenja, ni kod ljudi ni kod životinja. Takođe se postavlja pitanje da li peptidoglikan ili lipoteihoična kiselina gram-pozitivnih bakterija indukuju sepsu. Peptidoglikan može aktivirati inflamatorni odgovor u humanim ćelijama *in vitro* i može indukovati sepsu kod pacova, ali je količina peptidoglikana neophodna za ovu indukciju velika (10 mg/kg). Dalje, peptidoglikan može delovati preko aktivacije komplementa, a ne direktno preko TLR. Još je manja verovatnoća da lipoteihoična kiselina može prouzrokovati sepsu. Iako je veoma prečišćena lipoteihoična kiselina „trigger“ za oslobađanje tumor nekroze faktora (TNF)- $\alpha$  iz izolovanih humanih monocita, ovaj proces može se skoro potpuno inhibirati proteinima u krvi. Kada se kod miševa primeni doza od 50 mg/kg nema nikakvih znakova sindroma sistemskog inflamatornog odgovora (SIRS). Suština novog modela sepse je da endogene supstance, umesto LPS-a ili drugih molekula udruženih sa patogenom bakterijom (*pathogen-associated molecular patterns* – PAMP), mogu aktivirati TLR. Molekuli PAMP su podgrupa molekula udruženih sa oštećenjem tkiva (*damage-associated molecular patterns* – DAMP). I PAMP i DAMP medijatori nazivaju se alarminima – endogenim molekulima koji signaliziraju oštećenje tkiva i ćelija<sup>27</sup>. Aktivacija TLR ovim endogenim agonistima objasnila bi kako se sepsa javlja kod Gram-pozitivnih i gljivičnih infekcija ali i kod gram-negativnih infekcija kada je malo LPS-a prisutno ili ga uopšte nema. Novi model sepse sugerishe da TLR-4, a verovatno i drugi TLR, nije spreman da reaguje sa PAMP molekulom kao što je LPS. Da bi se to desilo, TLR-4 mora da se oslobodi od svoje konstitutivne supresije. Insult (infekcija, trauma) pospešuje inflamaciju, koja aktivira jednu ili više proteaza. Aktivacija proteaza oslobađa TLR-4 od konstitutivne inhibicije, a, takođe, oslobađa endogene agoniste od ovog receptora. Kada se jednom oslobodi, TLR reaguje sa svojim endogenim i/ili egzogenim aktivatorima, amplifikuje inflamaciju i inicira sepsu. Na osnovu novih istraživanja moglo bi se zaključiti da se većina infekcija ne komplikuje sepsom zbog toga što je signalni put TLR-4 suprimiran. Dakle, sepsa može biti, i često jeste, prouzrokovana endogenim supstancama. Lipopolisaharid je više marker nego trigger sepse. Kaskade i produkti za koje se zna da prouzrokuju sistemske manifestacije sepse takođe mogu inicirati sepsu: koagulaciona kaskada, kaskada komplementa (obuhvatajući proteaze i anafilatoksin), proteaze koje oslobađaju fagociti (npr. elastaza), proteaze koje se oslobađaju iz tkiva i/ili endotela (npr. metaloproteinaze) i citokini (TNF, interleukini). Ukratko, ne samo mikrobni produkti, nego i endogeni molekuli mogu aktivirati TLR. Receptor za endotoksin,

TLR-4, je konstitutivno suprimiran i prvi korak u sepsi bio bi oslobađanje TLR-4 od supresije. Ova otkrića sugerishe da endotoksin nije uvek inicijator sepse i objašnjavaju zašto su svi dosadašnji terapijski pokušaji usmereni protiv endotoksina neuspešili. Međutim, drugi terapijski pristup koji uključuje proces „detoksikacije“ endotoksina malim ili molekulom srednje veličine koji se vezuje za endotoksin i neutrališe ga – možda obećava. Klasično jedinjenje za postizanje ovog cilja u laboratorijskim uslovima je antibiotik polimiksin B. Način na koji bi se on mogao koristiti u kliničkim uslovima vezan je za proces hemofiltracije tokom koje bi se koristile specijalne kolone sa polimiksinom B. Povoljni rezultati postignuti su korišćenjem hemoperfuzionih kolona sa polimiksinom B, koje su u Japanu odobrene kao adjuvantno sredstvo u lečenju sepse i septičkog šoka. Jedno multicentrično kontrolisano istraživanje u kome su 64 bolesnika sa teškom sepsom i septičkim šokom podvrgnuti hirurškim intervencijama, zbog intraabdominalnih infekcija, bili randomizovani tako da su primali ili standardnu terapiju ili su bili lečeni hemoperfuzijom (24 i 48 sati postoperativno) uz korišćenje kolona koje vezuju endotoksin, pokazalo je da postoji statistički značajna razlika u preživljavanju<sup>28</sup>. Ove obećavajuće rezultate potvrdila je i metaanaliza korišćenja ovih specijalnih kolona u lečenju sepse<sup>29</sup>.

Najvažnija nova terapijska meta je TLR-4. Antagonista TLR-4, TAK-242, je mali molekul visokospecifičan za ovaj receptor, koji ne blokira nijedan drugi TLR. Na dozozavisan način TAK-242 blokira oslobađanje citokina iz makrofaga stimulisanih LPS-om i interferonom- $\gamma$ . U istraživanjima na animalnom modelu, kada su miševima ubrizgavane letalne doze endotoksina, a TAK-242 primenjivan pre ili posle davanja LPS-a, dobijeni su veoma dobri rezultati, tj. dramatično se povećalo preživljavanje. Izgledalo je da je ovaj molekul netoksičan, da nije skup i da veoma obećava<sup>30</sup>. Međutim, uprkos pozitivnim prekliničkim rezultatima, faze 2 i 3 kliničkog ispitivanja na bolesnicima sa teškom sepsom razočarale su. Multicentrično istraživanje sprovedeno u 93 jedinice intenzivne terapije na ukupno 274 bolesnika pokazalo je da TAK-242 nije suprimirao oslobađanje interleukina (IL)-6 čiji je nivo trebao da se vrati na bazične vrednosti, a, takođe, nije smanjio mortalitet nakon 28 dana, pa je faza 3 kliničkog ispitivanja prekinuta<sup>31</sup>. Zbog toga je 2009. godine prekinuta proizvodnja ovog molekula, iako neki istraživači i dalje misle da bi on možda bio koristan kod lakših formi sepse ili u ranoj fazi ovog oboljenja.

Što se TLR-4 kao terapijske mete tiče, nije se odustalo od novih pokušaja, pa je najnoviji lek u fokusu kliničkog istraživanja eritoran. Eritoran je modifikovana forma lipida A. Vezuje se za TLR i tako prevenira vezivanje lipida A ili LPS-a. Eritoran nije agonista i ne aktivira signalne TLR puteve, on je klasični kompetitivni antagonist za TLR-4. Ove godine objavljeni su podaci faze 2 kliničkog ispitivanja eritorana kod bolesnika sa teškom sepsom<sup>32</sup>. Bolesnici su dobijali eritoran u dozi od 45 mg ili od 105 mg tokom 6 dana. Rezultati su pokazali trend smanjenja mortaliteta u odnosu na placebo, naročito sa dozom od 105 mg. Analiza prospektivno definisanih podgrupa pokazala je da eritoran ispoljava veće efekte među teže obolelim, ali rezultati nisu dostigli statistič-

ku značajnost. Takođe, postoji trend poboljšanog preživljavanja kod bolesnika koji su u šoku u odnosu na one koji nisu, kao i kod onih sa gram-pozitivnom infekcijom u odnosu na gram-negativnu. Još uvek se čekaju rezultati faze 3 kliničkog ispitivanja eritorana, koja obuhvata 2000 bolesnika u skoro 160 centara širom sveta.

### Protein visoke mobilnosti grupe B1 – HMGB1

Najnovija istraživanja pokazuju da su za inicijaciju imunoinflamatornog odgovora u sepsi i/ili traumi od presudnog značaja TLR-4 koji mogu aktivirati različiti ligandi. U ovom slučaju najvažniji je nuklearni protein (*high-mobility group box* – HMGB) 1. On ima svojstva proinflamatornog citokina. Povezivanje TLR-4 i HMGB1 je ključni događaj u inicijaciji imunskog odgovora na insult<sup>33–35</sup>.

HMGB1 je protein aktivan u transkripciji gena i vezuje se za DNK<sup>36</sup>. Ovaj medijator proizvode makrofage kasnije tokom sepse (nakon 24–32 sata) kada su izložene inflamatornom stimulusu kao što je LPS. HMGB1 aktivira monocite, nakon čega oni proizvode proinflamatorne medijatore i hemokine. HMGB1 funkcioniše kao kasni medijator LPS-om indukovane toksičnosti. Vezuje se za endotelne ćelije i pokreće intracelularni signalni put preko kinaza (JNK, ERK1/2 i p38MAPK), što dovodi do translokacije transkripcionih faktora (NF- $\kappa$ B i SP-1). Kao odgovor na tu stimulaciju na površini endotelnih ćelija dolazi do povećane ekspresije adhezivnih molekula (VCAM-1, ICAM-1) i produkcije TNF- $\alpha$  i hemokina. U enterocitima, HMGB1 povećava aktivnost intrinzičke azot-oksida sintetaze (iNOS), što rezultuje povećanjem produkcije NO i permeabilnosti creva sa posledičnom povećanom translokacijom bakterija kroz crevnu barijeru<sup>37, 38</sup>.

Etil-piruvat može inhibirati produkciju HMGB1 od strane makrofaga, najverovatnije inhibicijom intracelularnog signalnog puta preko p38MAPK i NF- $\kappa$ B. Na animalnim modelima sepse utvrđeno je veće preživljavanje kada se etil-piruvat primeni 24 časa nakon nastanka sepse<sup>39</sup>. Jedno istraživanje pokazuje da lečenje etil-piruvatom u animalnom modelu akutnog nekrotizirajućeg pankreatitisa ublažava oštećenje udaljenih organa<sup>40</sup>. Takvi rezultati izdvajaju HMGB1 kao terapijsku metu u sepsi i MODS-u koja obećava, a etil-piruvat neki autori nazivaju „Svetim Gralom“ terapije sepse<sup>41–48</sup>.

Četrdesetogodišnja istorija kliničkih ispitivanja antiinflamatornih strategija za lečenje sepse mogla bi se nazvati „grobljem“ za farmaceutske kompanije, pošto skoro nijedna od ovih strategija nije rezultovala značajnim poboljšanjem preživljavanja bolesnika. Često obećavajući inicijalni rezultati malih nekontrolisanih kliničkih studija faze I i II nisu mogli biti potvrđeni u većim randomiziranim kliničkim ispitivanjima. Neki od ovih neuspeha mogu se objasniti korišćenjem neadekvatnog animalnog modela i pogrešnim pretpostavkama vezanim za animalni model. Najbolji primeri za to su neuspesi anti-TNF- $\alpha$  i anti-LPS intervencija kod bolesnika sa sepsom. Nadu daju novija klinička istraživanja faze III koja su pokazala da se derivat fragmenta anti-TNF- $\alpha$  poliklonskog antitela (CytoFab<sup>TM</sup>) veže 100 puta jače za TNF- $\alpha$

od ranije ispitivanih antitela i tako ga uspešno neutrališe<sup>49</sup>. Zaključci bazirani na animalnom modelu ne mogu se primeniti na sepsu kod ljudi zbog pogrešne pretpostavke da je LPS glavni inicijator sepse i da je prisutan u velikim količinama u serumu tokom sepse. Sada se istraživači slažu da injekcija LPS-a u animalnom modelu može da služi kao model endotoksičnog šoka, ali ne i sepse. Animalni modeli sepse još uvek su previše heterogeni prema tipu i trajanju insulta, kao i prema suportivnoj terapiji da bi se smatrali reprezentativnim za sepsu kod ljudi, pa je zbog toga neophodna njihova bolja standardizacija<sup>50</sup>.

### Promena energetskeg metabolizma ćelija i disfunkcija epitelne barijere

Sindrom multiple organske disfunkcije veoma je kompleksan entitet i stoga je predmet stalnih istraživanja koja su poslednjih godina rasvetlila nove elemente njegove patogeneze.

Kod kritično obolelih, bez obzira na prirodu primarnog insulta (infekcija, trauma i dr) često se razvija klinička slika i biohemijski znaci MODS-a, iako organi čija je funkcija poremećena često nisu direktno oštećeni primarnim insultom. Ova disfunkcija tradicionalno se pripisivala efektu inflamatornih medijatora koji indukuju promene u cirkulaciji koje dovode do tkivne hipoksije i oštećenja ćelija. Međutim, tada bi disfunkcija bila ireverzibilna, naročito kod organa kao što su jetra i bubrež čije ćelije imaju mali regenerativni kapacitet. Ipak, fulminantna hepatička disfunkcija je veoma retka, preživeli sa tzv. akutnom tubularnom nekrozom veoma retko zahtevaju dugotrajnu potporu bubrežnoj funkciji, a ukupno preživljavanje je približno 50–60%. Naročito je fascinantna činjenica da organi i u najtežoj disfunkciji histološki često izgledaju normalno, sa minimalnom ili potpuno odsutnom apoptozom ili nekrozom, čak i kod bolesnika sa letalnim ishodom bolesti.

Sve ovo upućuje na poremećaj koji je u principu funkcionalan, a ne strukturan i potencijalno je reverzibilan. Što je sepsa teža, to je veći pad potrošnje kiseonika u tkivima, ali postoji porast pritiska kiseonika u tkivima (PO<sub>2</sub>). Paradoksalno, tkivni PO<sub>2</sub> raste u sepsi, a tkivna potrošnja kiseonika (VO<sub>2</sub>) raste u ranoj fazi, a zatim pada. To bi značilo da problem nije u dopremanju nego u redukovanoj korišćenju kiseonika u ćeliji. Preko 90% ukupnog dopremljenog kiseonika koristi se u mitohondrijama da bi se stvorio adenozintrifosfat (ATP). Preko 95% ATP-a stvaraju mitohondrije, što bi upućivalo na zaključak da problem leži u mitohondrijama. Dakle, postoji mala tkivna potrošnja kiseonika, a istovremno i visok tkivni pritisak kiseonika. Kiseonik je dostupan, ali se ne koristi u mitohondrijama. Tkivna koncentracija ATP-a predstavlja bilans između lokalne ponude i potražnje. Istraživanja su pokazala da su kod preživelih bolesnika sa sepsom koncentracije ATP-a u tkivima bile očuvane.

Istraživanja pokazuju da kod kritično obolelih postoji bifazni inflamatorni, imunski, hormonski i metabolički odgovor. Akutna faza karakteriše se naglim porastom sekrecije tzv. hormona stresa, što je udruženo sa povećanjem mitohondrijske i metaboličke aktivnosti. Pojačano lučenje adre-

nokortikotropnog hormona – ACTH i kortizola, kateholamina, vazopresina, glukagona i hormona rasta pomaže da se održi efikasna cirkulacija i tkivna oksigenacija. Povećava se stvaranje mitohondrijskog i ne-mitohondrijskog ATP-a – energetskog supstrata. Potrošnja kiseonika u tkivima je u početku povećana, kao i intracelularni metabolizam (čak za 200%). Takođe, javlja se rezistencija na insulin, kada normalne koncentracije insulina ostvaruju slab biološki efekat. U kasnoj fazi, koja kod kritično obolelih može nastati nakon nekoliko sati ili dana, hormonski profil drastično se menja: koncentracije vazopresina su niske, adrenalni odgovor na prisustvo ACTH je smanjen, često uprkos prisutnoj hiperkortizolemiji. Mogući uzročni faktori su dejstvo citokina i azot oksida (NO) na nivou hipotalamusa, pituitarne žlezde i disfunkcionalnih organa. U kasne endokrine promene spada i uticaj kortizola na metabolizam tireoidnih hormona. Kortizol ovaj metabolizam modulira delom indukujući formiranje metabolički inaktivnog, reverznog T3, a delom supresijom sekrecije tireostimulišućeg hormona.

Respiratorni lanac u mitohondrijama koristi elektrone oslobođene oksidacijom supstrata – produkata razgradnje makronutrimenata unetih hranom, a slobodnu energiju zarobljava procesom forforilacije adenosin-difosfata (ADP). U konačnoj reakciji ovog metaboličkog puta, u kome se kiseonik metaboliše do vode, koristi se preko 90% od ukupne potrošnje kiseonika u organizmu. ATP se stvara uglavnom procesom oksidativne fosforilacije, iako se manje količine stvaraju i glikolizom. Dostupnost ATP-a može se smatrati limitirajućim faktorom intenziteta ćelijskog metabolizma.

U laboratorijskim modelima intenzitet mitohondrijske respiracije često je povećan u ranoj fazi MODS-a, ali onda konzistentno pada u slučaju prolongirane inflamacije (12–16 sati). Danas se smatra da su promene mitohondrijske funkcije jedan od ključnih procesa koji vodi u MODS. Smanjenje proizvodnje energije može delom biti izazvano delovanjem citokina, a takođe i azot oksida, koji se sintetiše u velikim količinama kod bolesnika sa sepsom i ima veoma izražen inhibični efekat na mitohondrijske respiratorne enzime.

Manje se zna o efektima hormona na mitohondrijsku funkciju kod kritično obolelih. Mitohondrije poseduju receptore za glukokortikoide i za tireoidne hormone. Tireoidni status ključni je modulator mitohondrijske funkcije i koreliše sa brzinom potrošnje kiseonika, maksimalnom sintezom mitohondrijskog ATP-a i sa aktivnošću respiratornih enzima. Velike količine tireoidnih hormona povećavaju maksimalnu brzinu sinteze ATP-a, ali smanjuju njenu efikasnost. Efekti kortikosteroida zavise od dužine izlaganja mitohondrija ovim hormonima. U animalnom modelu, akutni stres povećava aktivnost kompleksa IV (citohrom oksidaza), dok hronični intermitentni stres indukuje hiperkortizolemiju i smanjenu funkcionalnost mitohondrija.

Direktna inhibicija funkcije mitohondrija azotnim i kiseoničkim slobodnim radikalima zajedno sa sniženom hormonskom stimulacijom i sniženom pozitivnom povratnom spregom zbog smanjenih metaboličkih potreba dovodi do smanjenja proizvodnje energije. Smanjenje količine ATP-a dalje negativno utiče na metaboličke puteve.

Istraživanja na animalnim modelima pokazala su da potrošnja kiseonika, surogat za stvaranje ATP-a u mitohondrijama, pada sa povećanjem težine sepse<sup>51, 52</sup>.

### Metabolička insuficijencija

Šok se trenutno definiše kao stanje neadekvatne perfuzije i oksigenacije tkiva. Ovu definiciju treba proširiti tako da obuhvata i/ili „ćelijsku nesposobnost da koristi kiseonik“, pošto je postalo očigledno da je MODS u osnovi teške sepse, a da i drugi teški kardiorespiratorni poremećaji direktno obuhvataju ćelijsku respiraciju. Metabolička insuficijencija predstavlja nesposobnost ćelije da vrši normalne procese kao što su sinteza proteina, reparacija DNK i održavanje aktivnosti membranskih pumpi. Kada je ova insuficijencija teška i raširena, funkcija organa je kompromitovana. Metabolička insuficijencija ponekad može biti vezana za izraženu smrt ćelija kao kod ireverzibilnog oštećenja mozga posle prolongiranog srčanog zastoja ili kod infarkta miokarda posle koronarne tromboze. Međutim, u većini šoknih stanja, insult nije toliko jak i ne nastaje toliko naglo da odmah kompromituje vijabilnost ćelija i tako prouzrokuje nekrozu ili apoptozu. Uprkos tome, insultom zahvaćeni organi, iako normalnog izgleda, postaju disfunkcionalni, dakle ne mogu da održe prihvatljiv nivo homeostaze, kako funkcionalno, tako ni biohemijski. Primer za to su anurija i azotemija kod akutne bubrežne insuficijencije. Mehanizam oštećenja dovodi do disfunkcije organa u odsustvu smrti ćelija. Takođe, postoji velika verovatnoća funkcionalnog oporavka, što se vidi kod većine preživelih kritično obolelih, čak i kod organa sa malim regenerativnim kapacitetom. Metabolički kolaps bi se mogao opisati kao rezultat neadekvatnog snabdevanja energijom koja je potrebna za različite procese u ćeliji. Pošto se preko 95% ATP-a, primarne energetske 'monete' organizma, obezbeđuje mitohondrijskom respiracijom, mehanizmi patoloških procesa koji zahvataju ove organele mogu objasniti razvoj disfunkcije organa nakon jakog sistemskog inflamatornog insulta.

Sepsa predstavlja niz paradoksa od kojih su mnogi nepravilno tumačeni, pa su i primenjene terapijske mere bile neadekvatne. Tokom 1980-tih, kod bolesnika sa sepsom uočena je povećana saturacija kiseonikom mešane venske krvi (SvO<sub>2</sub>) i istovremena laktacidoza, što je dovelo do koncepta izmenjene zavisnosti od snabdevanja kiseonikom. Tada je veoma agresivno promovisana terapijska strategija pospešivanja cirkulacije nadoknadom tečnostima i primenom visokih doza inotropnih agenasa da bi se postigli 'supranormalni' nivoi dopremanja i potrošnje kiseonika. Ova strategija pokazala se uspešnom kod visokorizičnih hirurških bolesnika, ali ishod je bio loš kada se primenjivala na kritično obolele sa ustanovljenom disfunkcijom organa.

Danas se smatra da je sepsom indukovana laktacidoza vezana za povećanu aktivnost natrijumskih pumpi u mišićima, a ne za predominaciju anaerobnog metabolizma usled neadekvatne perfuzije tkiva. Kod bolesnika sa sepsom postoji povećan tkivni pritisak kiseonika u crevima, epitelu bešike i u skeletnim mišićima. Ovde postoji velika razlika u odnosu na druga stanja šoka indukovana hemoragijom, hipotenzijom i drugim stanjima.

ksemijom ili srčanom insuficijencijom kod kojih je tkivni pritisak kiseonika smanjen. Pošto ova varijabla predstavlja bilans između lokalnog snabdevanja i potrošnje kiseonika, povećane vrednosti u sepsi ukazuju na to da se patološki proces odnosi na abnormalno iskorišćenje kiseonika od strane ćelija, a ne na mikrovaskularno „šantovanje“, pa tako dolazi do povećane saturacije mešane venske krvi kiseonikom. Kod preživelih uočeno je sniženje tkivnog  $PO_2$  do normalnih vrednosti, što ukazuje na to da ćelija poseduje inherentni kapacitet za ponovno uspostavljanje normalne metaboličke aktivnosti u povoljnim okolnostima. Postoje i drugi rezultati koji podržavaju ovu teoriju 'citopatske dizoksije'. Na primer, sepsa se obično smatra hipermetaboličkim stanjem zbog toga što su bolesnici često febrilni i imaju veliki minutni volumen cirkulacije. Međutim, rezultati istraživanja obično pokazuju sasvim suprotno stanje i kod dece i kod odraslih. Jedno od tih istraživanja pokazalo je da je teža sepsa bila udružena sa progresivnim smanjenjem potrošnje kiseonika, tako da su bolesnici u septičkom šoku imali isti nivo potrošnje energije u mirovanju kao i zdravi ljudi, iako je zabeleženo povećanje potrošnje energije u mirovanju tokom oporavka od sepe.

Mitohondrijska aktivnost kontroliše se brojnim spoljnim faktorima kao što su nivo ATP-a, lokalni  $PO_2$  i prisustvo reaktivnih kiseoničkih metabolita. Brojni hormoni (tiroidni hormoni, leptin, kateholamini i kortikosteroidi) svoja dejstva delom ispoljavaju i preko uticaja na mitohondrijsku respiraciju. Azot-oksidi i njegov metabolit peroksinitrit snažni su blokatori transportnog lanca elektrona, a to dejstvo je različito trajanja, u zavisnosti od sintetisanih količina. Sepsa je klasičan primer stanja u kome se sistemski stvaraju velike količine NO. Brojne studije potvrdile su inhibični efekat NO na mitohondrije i kod i u animalnim modelima. Osim inhibicije respiratornog lanca, u studijama je, takođe, opisano i fizičko oštećenje mitohondrija koje u različitim organizmima može biti različito intenziteta, zavisno od težine sepe.

Da bi normalno funkcionisale, ćelijama je neophodno adekvatno snabdevanje kiseonikom i supstratom u cilju normalnog odvijanja aerobne respiracije. Kod kritično obolelih, snabdevanje je limitirano usled smanjenja minutnog volumena srca, koncentracije hemoglobina ili saturacije arterijske krvi kiseonikom. Kontinuirano funkcionisanje ćelije u takvim stanjima (u odsustvu dovoljno energije za metabolizam) dovešće do toga da se zalihe ATP-a istope. Kada se pređe kritični prag niskih vrednosti ATP-a, aktiviraju se mehanizmi ćelijske smrti. U sepsi, u kojoj se oštećenje mitohondrija razvija tokom više sati, nivoi ATP-a u veoma teškim slučajevima se snižavaju, ali nikada do tačke koja neminovno vodi u smrt ćelije. Naprotiv, u sepsi često postoje normalni nivoi ATP-a uprkos istovremenom ultrastrukturnom i biohemijskom oštećenju i posledičnoj disfunkciji mitohondrija. Glikolitička (anaerobna) respiracija može da nadoknadi manjak aerobne produkcije ATP-a, ali samo do određenog stepena i u relativno kratkom vremenskom periodu. Sniženje potrošnje kiseonika i povećanje tkivnog  $PO_2$ , sa istovremenom mitohondrijskom disfunkcijom i održavanjem nivoa ATP-a ukazuje na smanjenje brzine generisanja i utilizacije ATP-a tokom prolongirane sepe. Ova 'energetska insuficijencija' redukuje ćelijsku metaboličku aktivnost što dovodi do stanja

poremećene funkcije koje se manifestuje kao disfunkcija organa. Međutim, možda bi bilo bolje to stanje smatrati adaptivnim 'programiranim' metaboličkim kolapsom u cilju omogućavanja dugotrajnog preživljavanja u uslovima kada je organizam suočen sa teškim i prolongiranim insultom. Ova adaptacija analogna je hibernaciji kod životinja, kao i promenama u ljudskom srcu tokom prolongirane ishemije. Prema ovoj teoriji, oporavak od disfunkcije organa bio bi ekvivalentan buđenju ćelije iz ovog uspavanog stanja. Ako je energetska insuficijencija primarni uzrok metaboličkog kolapsa, za oporavak je fundamentalna reparacija ili regeneracija mitohondrija. Ovaj proces poznat je kao mitohondrijalna biogeneza. Interesantno je da antibiotici koji deluju preko inhibicije sinteze proteina utiču na biogenezu. To nije iznenađujuće kada se uzme u obzir evolutivni odnos između bakterija i mitohondrija.

Ovaj koncept metaboličke insuficijencije otvara novi značajan terapijski koridor u kome bi se mogli preduzeti brojni koraci prevencije disfunkcije mitohondrija ranim merama reanimacije, da bi se potpuno izbegla ili svela na minimum tkivna hipoksija i to: pojačavanjem odbrambenih mehanizama mitohondrija (npr. glutation, magnezijum superoksid dizmutaza – Mg SOD); ili modifikovanjem (povećavanjem dostupnosti) supstrata sa kompleksom insulin/glukoza, hipertoničnim rastvorom laktata ili koenzimom  $Q_{10}$ . U već uspostavljenoj disfunkciji organa, tehnike za stimulisanje regeneracije mitohondrija (povećanje ekspresije faktora biogeneze, npr. leptina) mogle bi ubrzati oporavak.

Još uvek ne postoji rutinsko praćenje za procenu funkcije mitohondrija i metaboličke insuficijencije *in vivo*. Pošto hiperlaktatemija u sepsi nije povezana sa tkivnom hipoksijom, ne može se koristiti kao marker metaboličke insuficijencije. Monitoring potrošnje kiseonika može se izvesti na nivou celog organizma, ali merenje utilizacije kiseonika na nivou individualnog organa mnogo je invazivnije. Redoks status mitohondrijalnih respiratornih enzima može se procenjivati neinvazivno u različitim tkivima. Molekularni kiseonik (dioksigen,  $O_2$ ) veoma je snažan oksidativni agens. Dva snažna redukciona agensa, redukovani oblik nikotinamid adenin dinukleotida (NADH) i redukovani oblik flavin adenin dinukleotida (FAD) proizvode se u ćeliji tokom glikolize i ciklusa limunske kiseline. Ova dva redukovana agensa oksiduju se kiseonikom u mitohondrijama, a energija oslobođena tokom ovog procesa koristi se za sintezu ATP-a. Iako se apsolutne vrednosti ne mogu utvrditi, bitno je da se mogu pratiti njihove promene. Za procenu redoks stanja kompleksa I, prvog enzima u lancu transporta elektrona koji je najviše izmenjen u sepsi, može se koristiti NADH fluoroskopija, a redoks status citohrom oksidaze (enzima koji troši kiseonik na kraju respiratornog lanca) može se neinvazivno meriti spektroskopijom u opsegu bliskom infracrvenom spektru (*near-infrared spectroscopy* – NIRS), čime se određuje oksidativni status jedinjenja koja apsorbuju svetlost, a samim tim i lokalni tkivni protok krvi i korišćenje kiseonika na ćelijskom nivou. Tri relevantna jedinjenja menjaju svoj apsorpcioni spektar kada su oksigenisana: hemoglobin, mioglobin i citohrom  $aa_3$ <sup>53</sup>. U uzorcima tkiva mogla bi se proceniti mitohondrijska biohemijska funkcija i potrošnja kiseonika *ex vivo*. Međutim, do-

stupnost tkiva za uzimanje uzoraka kod bolesnika sa sepsom ograničena je samo na mišićno i masno tkivo, kao i ćelije krvi, s tim da eritrociti ne sadrže mitohondrije i funkcionišu potpuno anaerobno, glikolitički, dok neutrofili takođe proizvode veći deo ATP-a glikolizom i troše veću količinu kiseonika za svoj fagocitni respiratorni prasak.

Kombinacija teške inflamacije i sekundarnih promena u endokrinom profilu smanjuje proizvodnju energije, intenzitet metabolizma i odvijanje normalnih ćelijskih procesa, što dovodi do MODS-a. Ova očigledna disfunkcija organa mogla bi biti potencijalno protektivan reaktivni mehanizam, zbog toga što bi redukovano ćelijski metabolizam mogao povećati šanse za preživljavanje ćelija, a time i organa, u uslovima kada su suočeni sa teškim insultom. Glavni okidač za disfunkciju organa predstavlja smanjenje mitohondrijske aktivnosti i intenziteta oksidativne fosforilacije, što dovodi do sniženog ćelijskog metabolizma. Ovaj efekat na mitohondrije mogao bi biti posledica promena hormonskog statusa i sinteze inflamatornih medijatora u akutnoj fazi MODS-a<sup>54</sup>.

### Citopatska hipoksija

Kada se dopremanje O<sub>2</sub> smanji zbog niskog PO<sub>2</sub> u arterijskoj krvi, anemije i/ili hipoperfuzije, ćelije vrše ekstrakciju proporcionalno većeg dela dostupnog O<sub>2</sub> da bi očuvale aerobnu sintezu ATP-a. Kao posledica toga, vrednost tkivnog PO<sub>2</sub> se smanjuje. Nasuprot tome, kada je sinteza ATP-a snižena zbog unutrašnjeg poremećaja ćelijske respiracije, ćelije ekstrahuju manje O<sub>2</sub> od onog koji je dostupan. Posledica toga je promena u ekstrakciji O<sub>2</sub> uz porast vrednosti tkivnog PO<sub>2</sub>. Kada bi tkivna hipoperfuzija bila osnovni faktor ćelijske disfunkcije u sepsi, septičkom šoku ili endotoksemiji, tada bi trebalo da postoje abnormalno niske vrednosti tkivnog PO<sub>2</sub>. Ali, ako je osnovni faktor poremećena utilizacija O<sub>2</sub> u ćelijama, onda bi vrednosti tkivnog PO<sub>2</sub> bile normalne ili veće od normalnih. I zaista, istraživanja su pokazala da se tkivni PO<sub>2</sub> povećava u sepsi u odnosu na normalne vrednosti. To znači da je sniženje iskorišćenja O<sub>2</sub> u ćeliji (citopatska hipoksija) ključni faktor u nastanku disfunkcije organa u sepsi, a ne hipoperfuzija odnosno poremećaj makro- i mikrocirkulacije (iako je i ona prisutna u sepsi), kao što se mislilo protekle decenije. Takođe, utvrđen je vremenski sled javljanja citopatske hipoksije. Citopatska hipoksija nije prisutna na početku sepse, ali se razvija u toku nekoliko sati. Ovim se mogu objasniti pozitivni rezultati dobijeni primenom rane usmerene hemodinamske potpore, kao i negativni rezultati kada je to primenjeno kod bolesnika u kasnijoj fazi sepse.

Razvoj citopatske hipoksije u patološkim stanjima može se objasniti različitim, ali kompatibilnim mehanizmima. Ovi mehanizmi obuhvataju smanjenu isporuku piruvata u mitohondrijski ciklus trikarbonskih kiselina – TCA (Krebsov ciklus), inhibiciju ključnih mitohondrijskih enzima koji su uključeni ili u TCA ciklus ili u elektronski transportni lanac i aktivaciju enzima poli(ADP-ribozo) polimeraza-1 (PARP-1).

Idući od spoljne površine unutrašnje membrane nalaze se enzimi sa najnegativnijim redoks potencijalom (NAD dehidrogenaza), a na suprotnom kraju citohrom c-oksidaža i aktivisani kiseonik sa najvišim pozitivnim redoks potencijalom.

Ciklus limunske kiseline, Krebsov ciklus ili ciklus trikarbonskih kiselina predstavljaju niz reakcija u mitohondrijama putem kojih se acetil ostaci oksidativno razgrađuju do CO<sub>2</sub> i vode. Acetil ostaci su u obliku acetil CoA (aktivnog acetata) – estra koenzima A. Osnovna uloga ovog ciklusa je što predstavlja konačan zajednički metabolički put za okončanje oksidacije ugljenih hidrata, masti i proteina pošto se glukoza, masne kiseline i brojne aminokiseline metabolišu u acetil CoA. U Krebsovom ciklusu dolazi do oksidacije acetil CoA. Oksidacija navedenih supstrata odvija se u respiratornom lancu mitohondrija dehidrogenacijom (oduzimanjem vodonika), zatim dolazi do prenosa vodonika i elektrona do aktivisanog kiseonika, da bi se sintetisala voda kao konačni metabolički produkt. Ceo ovaj proces od izuzetnog je značaja jer oslobađa veliku količinu energije u iskoristljivom obliku kao što je ATP.

Krajnji produkt glikolize je pirogroždana kiselina, trikarbonska alfa keto kiselina. Ona se može ili redukovati do mlečne kiseline ili ući u Krebsov ciklus i konačno biti oksidovana do CO<sub>2</sub> i vode. Piruvat dehidrogenaza (PDH) katalizuje reakciju kojom se piruvat, u prisustvu NAD<sup>+</sup> i koenzima A, konvertuje u acetil-CoA. Inaktivacija PDH limitira fluks substrata kroz TCA ciklus, pa dolazi do ekscesivnog nakupljanja piruvata u ćelijama, što vodi do povećanog stvaranja laktata. Stoga, hiperlaktatemija u sepsi nije dokaz smanjene isporuke O<sub>2</sub>, kao što se ranije mislilo, nego kombinovanih efekata inhibicije PDH i ubrzanog transporta glukoze u ćeliju.

U sepsi postoji povećana aktivnost inducibilne azot-oksida sintetaze (iNOS) i povećana sinteza pluripotentnog signalnog i efektnog molekula NO. U fiziološki relevantnim koncentracijama (~ 1 µM) NO brzo, ali reverzibilno, inhibira enzimsku aktivnost citohroma, terminalnog kompleksa u mitohondrijskom elektronskom transportnom lancu. NO-posredovana inhibicija potrošnje O<sub>2</sub> od strane mitohondrija je rezultat kompeticije dva gasa (O<sub>2</sub> i NO) za isto mesto vezivanja na enzimskom kompleksu. Prema tome, inhibicioni efekat NO na citohrom oksidažu izraženiji je kada je PO<sub>2</sub> relativno nizak. Sve ovo smanjuje ćelijsku respiraciju.

Mnogo je opasnije kada NO brzo reaguje sa O<sub>2</sub><sup>-</sup> i formira peroksinitrit (ONOO<sup>-</sup>) koji je veoma snažan oksidativni i nitrozirajući agens. Kada je citohrom inhibiran dejstvom NO, mitohondrije proizvode veće količine O<sub>2</sub><sup>-</sup>. Kalcijum zavisna izoforma NOS prisutna je u mitohondrijama. Mitohondrije kao organele sposobne su tako da proizvode i NO i O<sub>2</sub><sup>-</sup>, i, pod odgovarajućim uslovima, velike količine peroksinitrita koji inhibira mitohondrijalne enzime i respiraciju. Singer i sar.<sup>1</sup> su u svom istraživanju pošli od toga da, iako dolazi do redistribucije mikrovaskularnog protoka, dokazan je povećan tkivni pritisak kiseonika kod bolesnika sa sepsom, što sugerise da je problem u iskorišćavanju kiseonika u ćelijama (tkivna dizoksija), a ne u samoj isporuci kiseonika. Mitohondrijska oksidativna fosforilacija odgovorna je za preko 90% ukupne potrošnje kiseonika u organizmu i stvaranja ATP-a. Respiratorni lanac u mitohondrijama obuhvata već pomenuta četiri enzimska kompleksa. Ovi enzimski kompleksi, naročito NADH-ubikvinon oksidoreduktaza (kompleks I) i citohrom c-oksidaža (kompleks IV), mogu biti inhibirani kiseoničkim i azotnim reaktivnim metabolitima. Obe vrste reakti-

vnih metabolita pojačano se stvaraju u sepsi, a takođe se stvaraju i u mitohondrijama.

Biopsija skeletnih mišića izvedena je kod 28 bolesnika sa sepsom u prva 24 sata od prijema u Jedinicu intenzivne terapije, a kontrolnu grupu predstavljalo je devet bolesnika podvrgnutih elektivnoj artroplastici kuka. U uzorcima je analizirano sledeće: aktivnost kompleksa respiratornog lanca mitohondrija, koncentracija ATP-a, koncentracija redukovanog glutationa (intracelularni antioksidant) i odnos koncentracija nitrata/nitrita (marker sinteze NO). Rezultati su pokazali da je koncentracija ATP-a bila značajno niža kod bolesnika sa sepsom koji su umrli, nego kod preživelih i kod bolesnika kontrolne grupe. Što je aktivnost kompleksa I bila niža, to je klinička slika sepse bila teža, sinteza NO veća, a koncentracija antioksidanta – redukovanog glutationa, manja. Respiratorni lanac, pored četiri kompleksa, sadrži i specijalizovane nosače elektrona. Prelazak elektrona sa kompleksa na kompleks niz respiratorni lanac stvara gradijent protona kroz unutrašnju membranu mitohondrija koji je dovoljan da aktivira ATP sintetazu (kompleks V) koja katalizuje fosforilaciju ADP-a u ATP. NO je pokazao veće inhibitorne efekte na kompleks I nego na kompleks IV. Inhibicija kompleksa I snizila je sposobnost mitohondrija da stvaraju ATP za 30%. Autori su zaključili da je ovaj bioenergetski kolaps važan patogenetski mehanizam u MODS-u indukovanom sepsom<sup>55</sup>. Dodatna analiza funkcije mitohondrija elektronskom paramagnetnom rezonancom (EPR) kod ovih bolesnika potvrdila je već postojeće nalaze<sup>56</sup>. Najnovije istraživanje iz ove oblasti pokazalo je da je kod kritično obolelih preživljavanje povezano sa biogene- zom mitohondrija i antioksidantnim odbrambenim odgovorom. Ovo pomaže očuvanju funkcionalnosti i energetskog statusa ćelije. Kod onih bolesnika koji nisu preživeli dokazana je povećana sklonost ka oštećenju mitohondrija i energetskoj insuficijenciji ćelije što veoma umanjuje sposobnost oporavka normalne ćelijske funkcije<sup>57</sup>.

PARP-1 je nuklearni enzim koji se može aktivirati pod uticajem reaktivnih kiseoničkih metabolita (uključujući i ONOO-) u stanjima akutne inflamacije. Ovaj enzim je uključen u metabolizam NAD<sup>+</sup>/NADH. Kada se aktivira PARP-1, smanjuje se količina NADH u ćeliji. Pošto je on glavni redukcion ekvivalent oksidativne fosforilacije, aktivacija PARP-1 može dovesti do velikog oštećenja sposobnosti ćelije da koristi O<sub>2</sub> za sintezu ATP, odnosno može dovesti do citopatske hipoksije. Primena selektivnih PARP-1 inhibitora u terapijske svrhe bila bi veoma značajna u lečenju sepse. Istraživanja su pokazala da aktivacija PARP-a dovodi do smrti ćelija tipa nekroze zbog toga što u ćelijama postoji energetski kolaps. Proinflamatorini citokini dovode do aktivacije polimorfonukleara i indukcije iNOS; sledeća karika u lancu kojim PARP vodi u nekrozu je stvaranje slobodnih radikala koji oštećuju jednolančanu DNK čime se aktivira PARP. Zbog toga farmakološka inhibicija PARP-a rezultuje pomakom od nekroze ka apoptozi ili čak ka normalizaciji ćelijske funkcije, što je utvrđeno metodom protočne citometrije na timocitima izloženim dejstvu peroksinitrita. Pomak ka smrti ćelija tipa apoptoze (a ne nekroze), u odsustvu funkcionalnog PARP-a smatra se korisnim zbog toga što nekrotične ćelije

(za razliku od apoptotičnih) oslobađaju svoj sadržaj u ekstralcelularni prostor i time pojačavaju inflamatorni proces.

Na animalnim modelima pokazano je da je potrošnja kiseonika u nekim tkivima poremećena kada se ubrizga endotoksin, LPS. Slične promene u brzini potrošnje kiseonika uočene su kada su humani enterociti inkubirani *in vitro* sa citomiksom, koktelom citokina koji sadrži TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  i IFN- $\gamma$ . Do smanjenja brzine potrošnje O<sub>2</sub> nije došlo zbog promene u isporuci kiseonika (npr. zbog smanjene mikrovaskularne perfuzije), već zbog stečenog poremećaja ćelijske respiracije, fenomena nazvanog citopatska hipoksija. Kod ovih imunostimuliranih ćelija potrošnja kiseonika smanjila se za više od 50%. Ovaj fenomen potpuno je reverzibilan: kada je citokinski koktel uklonjen, a ćelije inkubirane u normalnom medijumu, ponovo je uspostavljena normalna brzina potrošnje O<sub>2</sub>. Citokinima indukovano smanjenje potrošnje O<sub>2</sub> nije bilo prouzrokovano smrću ćelija nego subletalnim procesom koji je oštetiio normalnu ćelijsku respiraciju. Inhibicija PARP-a ublažava gubitak funkcije intestinalne barijere u MODS-u<sup>58</sup>.

Dakle, citopatska hipoksija dovodi do disfunkcije organa uprkos adekvatnoj oksigenaciji tkiva. Do disfunkcije organa dolazi zbog energetskog kolapsa i mitohondrijske disfunkcije. U animalnom modelu endotoksičnog šoka registrovan je povećani pritisak kiseonika u tkivima kod endotoksičnih životinja u odnosu na kontrolne. Takođe, utvrđeno je da kod umerene endotoksemije postoji acidoza i blagi porast pritiska kiseonika u tkivima, a kod teške endotoksemije još teža acidoza i još veći porast pritiska kiseonika u tkivima. Iako postoji mikrovaskularna disfunkcija, ona ne doprinosi deficitu tkivne oksigenacije. Naprotiv, nivo kiseonika u tkivima je supranormalan kod bolesnika sa sepsom. Jedno od objašnjenja je da tkivo ne iskorišćava kiseonik na normalan način. Kod umrlih od sepse postoji mitohondrijska disfunkcija, a količina ATP-a u tkivima manja je od normalne. Citokinski koktel i hipoksija značajno povećavaju količinu ATP u tkivima. Neočekivano, pokazalo se da imunostimulisana ćelija sa citopatskom hipoksijom ima dva puta veću brzinu metabolizma ATP-a od normalne ćelije. Ova povećana brzina metabolizma ATP-a održava se zahvaljujući značajnom porastu brzine glikolize. Kada se u obe ćelije blokira sinteza proteina i nukleinskih kiselina (za šta se troši ATP), intenzitet metabolizma ATP-a se smanjuje. Normalizacija intenziteta metabolizma ATP-a jednaka je u obe ćelije, što znači da se metabolizam ATP-a i sinteza nukleinskih kiselina i proteina brže odvijaju u imunostimulisanim ćelijama. U tim ćelijama aktiviraju se geni za faktor 1 (*hypoxia-inducible factor* – HIF-1) indukovani hipoksijom, ključni transkripcioni faktor koji je odgovoran za akutnu adaptaciju ćelije na hipoksične uslove. Istovremeno, kodiraju se proteini značajni za proces glikolize. Kod sepse postoji pomak ka anaerobnom stvaranju ATP-a. Imunostimulisane ćelije ponašaju se kao da su hipoksične i prelaze na anaerobni metabolizam glukoze gde je krajnji proizvod laktat<sup>59</sup>.

Ćelija se permanentno suočava sa dva problema: sa jedne strane je izlaganje visokoj koncentraciji kiseonika, što nosi rizik od peroksidacije, a sa druge strane su vrlo niske koncentracije ATP-a i rizik od metaboličkog kolapsa. Postoje

tri osnovna načina da se postigne neophodni kompromis: regulacija protoka elektrona kroz respiratorni lanac; regulacija sinteze ATP-a (pošto ATP ne može da se skladišti u ćeliji, osnovna determinanta brzine potrošnje kiseonika je potrošnja ATP-a) i regulacija različitih procesa pri kojima se troši ATP. Postoje dva važna ćelijska senzora koji kontinuirano moduliraju sistem: redoks status/sinteza kiseoničkih slobodnih radikala i mitohondrijski membranski potencijal. Za održavanje homeostaze neophodno je da vrednosti produkcije slobodnih kiseoničkih radikala, redoks status, fosfatni potencijal i mitohondrijski membranski potencijal budu unutar veoma uskih granica<sup>60-64</sup>.

### Disfunkcija epitelne barijere

Bolesnici umiru od sepse i MODS-a, ali njihove ćelije ne umiru. Postavljena je hipoteza disfunkcije epitelne mem-

Pošto mnogi organi koji su disfunkcionalni u MODS-u (pluća, jetra, bubrezi, creva) zavise od pravilnog funkcionisanja epitelne komponente, disfunkcija epitelnih ćelija je važna u patogenezi ovog sindroma. Pravilno funkcionisanje epitela ne zavisi samo od čvrstih spojnica nego i od adekvatne ekspresije, lokalizacije i aktivnosti mnogih drugih ćelijskih konstituenata (npr. membranskih pumpi, proteina citoskeleta, receptora na površini ćelije). Polarizacija epitela, vektorski transport i funkcija barijere, međutim, zavise od funkcije čvrstih spojnica. Neki ključni molekularni procesi (izmenjena ekspresija  $\text{Na}^+\text{K}^+$ -ATP-aze, oštećeni proteini čvrste spojnice) su zajednički faktori koji doprinose ćelijskoj disfunkciji u različitim tkivima u MODS-u.

Normalna funkcija pluća, bubrega, jetre i creva zavisi od stvaranja i održavanja različitih kompartmenta. U tabeli 1 prikazane su fiziološke i kliničke posledice epitelne disfunkcije čvrste spojnice.

Tabela 1

Fiziološke i kliničke posledice epitelne disfunkcije čvrste spojnice (TJ) kod multiple organske disfunkcije

| Zahvaćeni organ | Kompartimenti                             | Fiziološke posledice TJ disfunkcije                                      | Kliničke posledice TJ disfunkcije                               |
|-----------------|-------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------|
| Pluća           | Krv/vazduh                                | Punjenje alveola tečnošću                                                | Edem pluća, oštećena razmena gasova, arterijska hipoksemija     |
| Bubreg          | Bubrežni intersticijum/tečnost u tubulima | Vraćanje tubularne tečnosti u intersticijum                              | Azotemija                                                       |
| Jetra           | Krv/žuč                                   | Vraćanje žuči u krv                                                      | Intrahepatična holestatska žutica                               |
| Creva           | Lumen/intersticijum<br>lamine proprie     | Paracelularna propustljivost za<br>proteine mikroba (DNK, flagelin, LPS) | Endotoksemija, perzistentna aktivacija<br>sistemske inflamacije |

brane u MODS-u jer su svi organi koji su u disfunkciji epitelni (pluća, jetra, bubrezi, creva). Epitelne ćelije su polarizovane, imaju vektorski transcelularni transport, selektivno su permeabilne. Održavaju različite kompartimente, npr. urinarni prostor, bilijarni prostor, jer su to specijalizovane ćelije koje između sebe formiraju čvrste spojnice (*tight junction* – TJ) u apikalnom delu. Funkcija barijere čvrstih spojnica neophodna je da bi se održali koncentracioni gradijenti koji postoje između dva kompartimenta definisana epitelom. U nekim organima, naročito crevima i plućima, funkcija barijere je važna zbog prevencije sistemske kontaminacije mikrobima i toksinima koji su prisutni u spoljnom okruženju. Na molekularnom nivou ova čvrsta spojница sastoji se od najmanje devet različitih perifernih membranskih proteina i najmanje tri različita integralna membranska proteina. U periferne membranske proteine spadaju, npr. proteini slični gvanilatkinazi: ZO-1, ZO-2 i ZO-3; u integralne membranske proteine spada okludin i velika klasa proteina nazvanih kladini. I okludin i kladini sadrže četiri transmembranska domena za koje se smatra da su tačke kontakta između dve ćelije unutar čvrste spojnice. ZO-1 je u interakciji sa citoplazmatskim 'repovima' okludina i kladina, kao i sa ZO-2 i ZO-3, a oni su u interakciji sa različitim proteinima koji vezuju aktin i tako se čvrsta spojница vezuje za citoskelet. ZO-1 se lokalizuje u plazmatskoj membrani pre okludina i smatra se da ima centralnu ulogu u zreloj čvrstoj spojnici.

Permeabilnost jednoslojnog epitela u kulturi tkiva povećava se kada se ćelije inkubiraju sa koktelom različitih proinflamatornih citokina u toku 24 do 48 časova<sup>65</sup>. Jedan od mehanizama ove povećane permeabilnosti je spontano oslobađanje NO. Ako se na intestinalne epitelne ćelije u kulturi tkiva deluje citokinima kao što su  $\text{TNF-}\alpha$ ,  $\text{IFN-}\gamma$  i  $\text{IL-1}\beta$ , doći će do povećane ekspresije iNOS i povećanog stvaranja NO i sledstvenog stvaranja peroksinitrita. Smatra se da je peroksinitrit odgovoran za štetne efekte NO na funkciju intestinalne barijere. Na supcelularnom nivou ova povećana permeabilnost je povezana sa promenom ekspresije i lokalizacije ključnih proteina čvrste spojnice. Kada se citokini uklone, ove promene proteina povlače se u toku 24 sata.

Azot-oksidi mogu menjati ekspresiju i lokalizaciju različitih proteina čvrste spojnice moduliranjem aktivnosti membranske pumpe,  $\text{Na}^+\text{K}^+$ -ATP-aze. Intraćelijska koncentracija natrijuma i volumen ćelija povećavaju se posle izlaganja proinflamatornim citokinima, što znači da je smanjena ekspresija i aktivnost  $\text{Na}^+\text{K}^+$ -ATP-aze. Izmenjeni su i proteini čvrste spojnice (npr. okludin) i dolazi do hiperpermeabilnosti epitela.

Kada se *in vivo* koriste male količine LPS-a, odnosno subletalne doze, ne dolazi do promena u krvnom pritisku i hemodinamici u modelu sistemskog inflamatornog odgovora. Kada se LPS-om deluje na epitel, na primer ileuma, dolazi do povećanja njegove permeabilnosti kod miševa koje

počinje šest sati nakon indukcije endotoksemije, a najizraženije je posle 18 sati. Ako se dodaju blokatori iNOS, taj efekat se prevenira. Isto to važi i za jetru, odnosno za hepatobilijarnu barijeru: povećane koncentracije bilirubina u serumu povezane su sa endotoksemijom koja izaziva oštećenje bilijarne barijere (prelazak žuči iz kanala u plazmu). Bolji marker disfunkcije jetre, od koncentracije bilirubina u serumu, predstavlja koncentracija žučnih kiselina koja se povećava 10 puta u endotoksemiji. Isti šablon postoji i u plućima, povećana permeabilnost alveolokapilarne membrane kod endotoksemije dokazana je imunohistohemijski, primenom fluorescentnog markera nakon 12 sati. LPS smanjuje ekspresiju nekoliko proteina čvrste spojnice (ZO-1, okcludin)<sup>66</sup>.

Drugi način na koji epitel doprinosi disfunkciji organa je lučenjem citokina<sup>67,68</sup>. *Lamina propria* i mukoza creva sadrže veliki broj imunskih ćelija: T- i B- limfocite, plazma ćelije, makrofage, mastocite i neutrofile. U stanju inflamacije sve ove ćelije mogu lučiti različite citokine. Imunostimulirane epitelne ćelije (enterociti) aktivno luče proinflamatorni citokin HMGB1 isključivo u apikalnom delu kada su izložene 24-satnom dejstvu koktela proinflamatornih citokina, bez obzira na to da li je stimulirana apikalna ili bazolateralna strana ćelije. Lučenje je najveće nakon 48 časova. To ne nastaje zbog nekroze, pošto ćelija ostaje vijabilna. Sekretacija HMGB1 odvija se putem formiranja egzozoma u citosolu enterocita. Nakon imunostimulacije te vezikule se oslobađaju iz ćelije i dovode do autokrine amplifikacije epitelne disfunkcije. Ako se daju antitela na HMGB1 onda se povećanje permeabilnosti snizi za 50%<sup>69</sup>.

Dakle, epitelne ćelije čine površinu creva, pluća, bubrega i jetre i formiraju granice između kompartmenta u organizmu. Formiranjem barijere između različitih sredina, epitelne ćelije imaju brojne važne uloge u regulisanju fizioloških procesa: sprečavaju opadanje koncentracionih gradijenata između kompartmenata koje odvajaju, takođe sprečavaju prodiranje endogenih bakterija, mikrobnih produkata i bioaktivnih supstanci iz lumena creva i pluća delujući kao ograda koja sprečava translokaciju ovih produkata u sistemsku cirkulaciju ili limfu. Epitelne ćelije imaju ključnu ulogu u nadzoru nad mikrobima i u komunikaciji sa imunskim ćelijama preko citokina i hemokina. Epitelne ćelije u crevima regulišu apsorpciju i sekreciju tečnosti, elektrolita i nutrijenata<sup>70-72</sup>. Iz

svega ovoga proističe da disfunkcija epitela igra ključnu ulogu u patogenezi MODS-a na sledeći način:

proinflamatorni citokini → indukcija iNOS → produkcija NO → inhibicija Na<sup>+</sup>K<sup>+</sup>-ATPaze → izmenjena ekspresija i/ili supcelularna lokalizacija TJ proteina → povećana permeabilnost

Kod kritično obolelih sa sepsom i MODS-om utvrđena je povećana apoptoza crevnog epitela, što koreliše sa povećanim mortalitetom. Prevencija intestinalne apoptoze *in vitro* ne utiče ni na translokaciju bakterija, ni na koncentracije citokina u sistemskoj cirkulaciji, smanjenje intestinalne apoptoze povećava preživljavanje i kod neinfektivne inflamacije. Plućni epitel takođe je podložan apoptozi kod bolesnika sa akutnim respiratornim distres sindromom kao jednom od manifestacija MODS-a<sup>73</sup>.

Danas su principi intenzivne terapije u suštini suportivni. Ipak mnoge intervencije kod kritično obolelih, kao što su sedacija, imunonutricija, mehanička ventilacija, višestruke transfuzije krvi, primena inotropa i endokrina suplementacija, povezane su sa lošim ishodom. Bolje razumevanje vremenske i reaktivne sekvence hormonskih, metaboličkih inflamatornih i imunskih promena tokom akutne i kasne faze teške bolesti stvorilo bi logičniju bazu za terapijsku intervenciju koja bi se onda mogla individualno prilagođavati svakom bolesniku. Momenat primene i intenzitet svake intervencije su ključni; amplifikacija primarno protektivnog odgovora na početku bolesti je korisna, ali može biti štetna ako se primeni kasnije. Na primer, pokušaji da se stimuliše metabolizam (glukoza-insulin ili tireoidni hormoni) mogu biti adekvatni kao deo ranog lečenja, ali mogu biti potencijalno opasni ako je organizam ušao u fazu definitivnog uspostavljenog MODS-a, u kojoj su ćelije redukovale svoj intracelularni metabolizam da bi popravile šanse za preživljavanje<sup>74</sup>.

## Zaključak

Multipla organska disfunkcija može se smatrati adaptivnim, endokrino posredovanim metaboličkim odgovorom na masivnu sistemsku inflamaciju čiji su ključni patogenetski mehanizmi citopatska hipoksija i disfunkcija endotelne barijere, što je jedna od najnovijih teorija.

## L I T E R A T U R A

1. Šurbatović M, Filipović N, Jevđić J. Infection, the syndrome of systemic inflammatory response, sepsis, septic shock, the syndrome of multiple organic disfunction. Anestezija, reanimacija, transfuzija 2000; 28(1-2): 111-2. (Serbian)
2. Šurbatović M, Jevđić J, Filipović N. Application of the score of sepsis in 30 patients with sepsis of various severity. Anestezija, reanimacija, transfuzija 2000; 28(1-2): 113-7. (Serbian)
3. Šurbatović M, Krgović M. Myocard disfunction in sepsis. Anestezija, reanimacija, transfuzija 2001; 29(1-2): 19-23.
4. Šurbatović M, Filipović N, Protić S, Jovanović K. Is the concentration of tumor necrosis factor - alpha (TNF alpha) more reliable than SAPS II score for the prediction of mortality risk in severe sepsis. Anestezija, reanimacija, transfuzija 2001; 29(1-2): 25-8. (Serbian)
5. Šurbatović M, Jovanović K, Kataranovski M, Vojvodić D, Filipović N. Significance of pro- and anti-inflammatory cytokine for the development of the syndrome of multiple organic disfunction in trauma and sepsis. Anaesth Iug 2002; 18(3-4): 92-103. (Serbian)
6. Šurbatović M, Jovanović K, Vojvodić D, Filipović N, Babić D. Proinflammatory cytokine in polytraumatized patients with sepsis caused by various bacteria and the correlation between clinical image severity and outcome and the type of bacterial cause. Anestezija i intenzivna terapija 2003; 26: 109-20. (Serbian)

7. Šurbatović M, Jovanović K, Vojvodić D. Correlation between tumor necrosis factor- $\alpha$  and the severity and outcome of sepsis. *Anestezija i intenzivna terapija* 2003; 26: 31–49. (Serbian)
8. Šurbatović M, Jovanović K, Vojvodić D, Filipović N, Babić D. Importance of determination of proinflammatory cytokines in the blood of polytraumatized patients with sepsis. *Vojnosanit Pregl* 2004; 61(2): 137–43. (Serbian)
9. Šurbatović M, Jovanović K, Filipović N, Radaković S. Significance of interleukin 8 (IL)-8 as a predictor of clinical image severity and the outcome of multiple organ dysfunction syndrome in sepsis and/or asepsis. *Anestezija i intenzivna terapija* 2005; 28(1): 7–17. (Serbian)
10. Šurbatović M, Jovanović K, Radaković S, Filipović N. Pathophysiological aspects of severe acute pancreatitis-associated lung injury. *Srp Arh Celok Lek* 2005; 133(1–2):76–81. (Serbian)
11. Šurbatović M, Radaković S, Jovanović K, Romić P. New strategies in multiple organ dysfunction syndrome therapy for sepsis. *Srp Arh Celok Lek* 2005; 133(7–8):379–83. (Serbian)
12. Jevđić J, Šurbatović M, Filipović N, Radaković S. Characteristics of immune response in urosepsis. *Vojnosanit Pregl* 2006; 63(6): 601–3 (Serbian)
13. Šurbatović M, Filipović N, Radaković S. Sepsis, is there anything new? *Anestezija i intenzivna terapija* 2006; 56(Suppl. 2): 35–7.
14. Šurbatović M, Filipović N, Slavković Z, Radaković S. Infection and inflammation in sepsis. *Vojnosanit Pregl* 2006; 63(2):163–8
15. Šurbatović M, Filipović N, Radaković S, Stanković N, Slavković Z. Immune cytokine response in combat casualties: blast or explosive trauma with or without secondary sepsis. *Mil Med* 2007; 172(2): 190–5.
16. Šurbatović M, Jevđić J, Filipović N, Radaković S. Imuno-inflamatorna kaskada sepe. *Anestezija reanimacija transfuzija* 2007; 35(1–2): 114–7. (Serbian)
17. Šurbatović M, Jevđić J, Filipović N, Radaković S. Could sepsis mediators be a therapeutic target? *Anestezija reanimacija transfuzija* 2007; 35(1–2):107–10. (Serbian)
18. Šurbatović M, Đorđević D. Pathophysiology of severe acute pancreatitis as a systemic disease. *Anestezija i intenzivna terapija* 2008; (Suppl):113–7
19. Jevđić J, Šurbatović M, Drakulić-Miletić S, Vukičević V. Application of new therapy strategies in treating sepsis and septic shock in the Intensive treatment unit, Clinical center Kragujevac. *Srp Arh Celok Lek* 2008; 136(5–6): 248–52. (Serbian)
20. Šurbatović M, Radaković S, Jevđić J, Filipović N, Romić P, Popović N, et al. Predictive value of serum bicarbonate, arterial base deficit/excess and SAPS III score in critically ill patients. *Gen Physiol Biophys* 2009; 28 Spec No: 271–6.
21. Vučeljić M, Šurbatović M, Vujanović S. S-100 $\beta$  protein in patients with severe sepsis. *J Med Biochem* 2009; 28(1): 46–9. (Serbian)
22. Šurbatović M, Jevđić J, Filipović N, Radaković S, Marković M. Sepsis mediator interactions. *Anestezija reanimacija transfuzija* 2009; 37(1–2):74–7. (Serbian)
23. Šurbatović M, Grujić K, Cikota B, Jevđić J, Filipović N, Romić P, et al. Polymorphisms of genes encoding tumor necrosis factor- $\alpha$ , interleukin-10, cluster of differentiation-14 and interleukin-1ra in critically ill patients. *J Crit Care* 2010; 25(3): 542.e1–8.
24. Hotchkiss RS, Karl IE. The pathophysiology and treatment of sepsis. *N Engl J Med* 2003; 348(2): 138–50.
25. Hotchkiss RS, Chang KC, Grayson MH, Tinsley KW, Dunne BS, Davis CG, et al. Adoptive transfer of apoptotic splenocytes worsens survival, whereas adoptive transfer of necrotic splenocytes improves survival in sepsis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003; 100(11): 6724–9.
26. Brunn GJ, Platt JL. The etiology of sepsis: turned inside out. *Trends Mol Med* 2006; 12(1): 10–6.
27. Bianchi ME. DAMPs, PAMPs and alarmins: all we need to know about danger. *J Leukoc Biol* 2007; 81(1): 1–5.
28. Cruz DN, Antonelli M, Fumagalli R, Foltran F, Brienza N, Donati A, et al. Early use of polymyxin B hemoperfusion in abdominal septic shock: the EUPHAS randomized controlled trial. *JAMA* 2009; 301(23): 2445–52.
29. Cruz DN, Perazella MA, Bellomo R, de Cal M, Polanco N, Corradi V, et al. Effectiveness of polymyxin B-immobilized fiber column in sepsis: a systematic review. *Crit Care* 2007; 11(2): R47.
30. Kawamoto T, Li M, Kitazaki T, Izawa Y, Kimura H. TAK-242 selectively suppresses Toll-like receptor 4-signaling mediated by the intracellular domain. *Eur J Pharmacol* 2008; 584(1): 40–8.
31. Rice TW, Wheeler AP, Bernard GR, Vincent JL, Angus DC, Aikawa N, et al. A randomized, double-blind, placebo-controlled trial of TAK-242 for the treatment of severe sepsis. *Crit Care Med* 2010; 38(8):1685–94.
32. Tidswell M, Tillis W, Larosa SP, Lynn M, Witte AE, Kao R, et al. Phase 2 trial of eritoran tetrasodium (E5564), a toll-like receptor 4 antagonist, in patients with severe sepsis. *Crit Care Med* 2010; 38(1): 72–83.
33. Bianchi ME. HMGB1 loves company. *J Leukoc Biol* 2009; 86(3): 573–6.
34. Hreggvidsdottir HS, Ostberg T, Wahamäa H, Schierbeck H, Avelerger AC, Klevenvall L, et al.: The alarmin HMGB1 acts in synergy with endogenous and exogenous danger signals to promote inflammation. *J Leukoc Biol* 2009; 86(3):655–62.
35. Yang H, Hreggvidsdottir HS, Palmblad K, Wang H, Ocbani M, Li J, et al. A critical cysteine is required for HMGB1 binding to Toll-like receptor 4 and activation of macrophage cytokine release. *Proc Natl Acad Sci USA* 2010; 107(26): 11942–7.
36. Robert SM, Sjodin H, Fink MP, Aneja RK. Preconditioning with High Mobility Group Box 1 (HMGB1) induces lipoteichoic acid (LTA) tolerance. *J Immunother* 2010; 33(7): 663–71.
37. Levy RM, Mollen KP, Prince JM, Kaczorowski DJ, Vallabhaneni R, Liu S, et al. Systemic inflammation and remote organ injury following trauma require HMGB1. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2007; 293(4): R1538–44.
38. Yu M, Wang H, Ding A, Golenbock DT, Latz E, Czura CJ, et al. HMGB1 signals through toll-like receptor (TLR) 4 and TLR2. *Shock* 2006; 26(2): 174–9.
39. Ulloa L, Ocbani M, Yang H, Tanovic M, Halperin D, Yang R, et al. Ethyl pyruvate prevents lethality in mice with established lethal sepsis and systemic inflammation. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002; 99(19): 12351–6.
40. Yang R, Uchiyama T, Alber SM, Han X, Watkins SK, Delude RL, et al. Ethyl pyruvate ameliorates distant organ injury in a murine model of acute necrotizing pancreatitis. *Crit Care Med* 2004; 32(7): 1453–9.
41. Yang H, Tracey KJ. High mobility group box 1 (HMGB1). *Crit Care Med* 2005; 33(12 Suppl): S472–4.
42. Fink MP. Ethyl pyruvate: a novel anti-inflammatory agent. *J Intern Med* 2007; 61(4): 349–62.
43. Fink MP. Ethyl pyruvate. *Curr Opin Anaesthesiol* 2008; 21(2): 160–7.
44. Yang R, Shanfl AL, Killeen ME, Fink MP. Ethyl pyruvate ameliorates liver injury secondary to severe acute pancreatitis. *J Surg Res* 2009; 153(2): 302–9.
45. Cruz RJ Jr, Harada T, Sasatomi E, Fink MP. Effects of ethyl pyruvate and other  $\alpha$ -keto carboxylic acid derivatives in a rat model of multivisceral ischemia and reperfusion. *J Surg Res* 2011; 165(1): 151–7.
46. Kao KK, Fink MP. The biochemical basis for the anti-inflammatory and cytoprotective actions of ethyl pyruvate and related compounds. *Biochem Pharmacol* 2010; 80(2): 151–9.
47. Fink MP. The therapeutic potential of pyruvate. *J Surg Res* 2010; 164(2): 218–20.
48. Cai B, Deitch EA, Ulloa L. Novel insights for systemic inflammation and hemorrhage. *Mediators Inflamm* 2010; 2010: 642462.

49. Mann H. The pharmacologic horizon of sepsis therapy. *Critical Connections* 2006; 5(4): 17.
50. Dyson A, Singer M. Animal models of sepsis: why does preclinical efficacy fail to translate to the clinical setting? *Crit Care Med* 2009; 37(1 Suppl): S30–7.
51. Singer M, De Santis V, Vitale D, Jeffcoate W. Multiorgan failure is an adaptive, endocrine-mediated, metabolic response to overwhelming systemic inflammation. *Lancet* 2004; 364(9433): 545–8.
52. Singer M. Cellular dysfunction in sepsis. *Clin Chest Med* 2008; 29(4): 655–60, viii–ix.
53. Huang YCT. Monitoring Oxygen Delivery in the Critically ill. *Chest* 2005; 128(5 Suppl 2): 554S–60S.
54. Singer M. Metabolic failure. *Crit Care Med* 2005; 33(12 Suppl): 539–42.
55. Brealey D, Brand M, Hargreaves I, Heales S, Land J, Smolenski R, et al. Association between mitochondrial dysfunction and severity and outcome of septic shock. *Lancet* 2002; 360(9328): 219–23.
56. Srivastava D, Davies N, Brealey D, Singer M, Cooper CE. Mitochondrial dysfunction in patients with severe sepsis: an EPR interrogation of individual respiratory chain components. *Biochim Biophys Acta* 2006; 1757(4): 262–72.
57. Carré JE, Orban JC, Re L, Felsmann K, Iffert W, Bauer M, et al. Survival in critical illness is associated with early activation of mitochondrial biogenesis. *Am J Respir Crit Care Med* 2010; 182(6): 745–51.
58. Szabo C. Cytopathic Hypoxia in Circulatory Shock: The Role of Poly (ADP-Ribose) Synthetase Activation. In: Evans T, Fink M, editors. *Mechanisms of organ dysfunction in critical illness*. Berlin: Springer-Verlag; 2002. p. 40–51.
59. Fink MP. Bench-to-bedside review: Cytopathic hypoxia. *Crit Care* 2002; 6(6): 491–9.
60. Leverve XM. Derangements in Cellular Oxygen Metabolism. In: Evans T, Fink M, editors. *Mechanisms of organ dysfunction in critical illness*. Berlin: Springer-Verlag; 2002. p. 52–68.
61. Singer M. Mitochondrial function in sepsis: acute phase versus multiple organ failure. *Crit Care Med* 2007; 35(9 Suppl): S441–8.
62. Fink MP. Administration of exogenous cytochrome c as a novel approach for the treatment of cytopathic hypoxia. *Crit Care Med* 2007; 35(9): 2224–5.
63. Hoye AT, Davoren JE, Wipf P, Fink MP, Kagan VE. Targeting mitochondria. *Acc Chem Res* 2008; 41(1): 87–97.
64. Balestra GM, Legrand M, Ince C. Microcirculation and mitochondria in sepsis: getting out of breath. *Curr Opin Anaesthesiol* 2009; 22(2): 184–90.
65. Al-Sadi R, Boivin M, Ma T. Mechanism of cytokine modulation of epithelial tight junction barrier. *Front Biosci* 2009; 14: 2765–78.
66. Fink MP, Delude RL. Epithelial barrier dysfunction: a unifying theme to explain the pathogenesis of multiple organ dysfunction at the cellular level. *Crit Care Clin* 2005; 21(2): 177–96.
67. Yang R, Miki K, Oksala N, Nakao A, Lindgren L, Killeen ME, et al. Bile high-mobility group box 1 contributes to gut barrier dysfunction in experimental endotoxemia. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2009; 297(2): R362–9.
68. Fink MP. Sepsis, ghrelin, the cholinergic anti-inflammatory pathway, gut mucosal hyperpermeability and high mobility group box 1. *Crit Care Med* 2009; 37(8): 2421–6.
69. Fink MP. Intestinal epithelial hyperpermeability: update on the pathogenesis of gut mucosal barrier dysfunction in critical illness. *Curr Opin Crit Care* 2003; 9(2): 143–51.
70. Costantini TW, Peterson CY, Kroll L, Loomis WH, Putnam JG, Wolf P, et al. Burns, inflammation, and intestinal injury: protective effects of an anti-inflammatory resuscitation strategy. *J Trauma* 2009; 67(6): 1162–8.
71. Costantini TW, Loomis WH, Putnam JG, Drusinsky D, Derue J, Choi S, et al. Burn-induced gut barrier injury is attenuated by phosphodiesterase inhibition: effects on tight junction structural proteins. *Shock* 2009; 31(4): 416–22.
72. Zhang JB, Du XG, Zhang H, Li ML, Xiao G, Wu J, et al. Breakdown of the gut barrier in patients with multiple organ dysfunction syndrome is attenuated by continuous blood purification: effects on tight junction structural proteins. *Int J Artif Organs* 2010; 33(1): 5–14.
73. McConnell KW, Coopersmith CM. Epithelial cells. *Crit Care Med* 2005; 33(12 Suppl): S520–2.
74. Mongardon N, Dyson A, Singer M. Is MOF an outcome parameter or a transient, adaptive state in critical illness? *Curr Opin Crit Care* 2009; 15(5): 431–6.

Primljen 24. VIII 2010.  
Prihvaćen 30. VIII 2010.