

UNIVERZITET U BEOGRADU
MEDICINSKI FAKULTET

Jelena M. Kuzmanović

**Uloga interleukina 6, 8 i 18 u patogenezi
akutnog respiratornog distres sindroma**

Doktorska disertacija

Beograd, 2024.

UNIVERSITY OF BELGRADE
FACULTY OF MEDICINE

Jelena M. Kuzmanović

**The role of interleukins 6, 8 and 18 in pathogenesis
of acute respiratory distress syndrome**

Doctoral dissertation

Belgrade, 2024.

MENTORI I ČLANOVI KOMISIJE:

Mentor:

Prof. dr Slobodan Savić

Redovni profesor Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu

Komentor:

Prof. dr Sofija Glumac

Vanredni profesor Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu

Članovi komisije:

Doc. dr Tamara Martinović

Docent Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu

Doc. dr Milenko Bogdanović

Docent Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu

Prof. dr Stojan Petković

Redovni profesor Medicinskog fakulteta Univerziteta u Novom Sadu

Datum odbrane doktorske disertacije:

Zahvalnica

*Svom mentoru prof. dr Slobodanu Saviću na ukazanom poverenju i prijateljskoj saradnji.
Svesrdnoj pomoći i podršci u svim fazama izrade disertacije.*

Svojoj komentorki prof. dr Sofiji Glumac na podršci i pomoći u izradi disertacije, naročito u delu diskusije dobijenih rezultata.

Doc dr Milenku Bogdanoviću na pomoći u prikupljanju i obradi podataka.

Doc dr Tamari Martinović na svesrdnoj pomoći prilikom pisanja teze. Zajedno doktorima Bogdanoviću i Martinović na prijateljstvu i podršci i svim savetima koje su oboje davali u svim fazama izrade eksperimenta i teze.

Profesorki Tamari Kravić-Stevović na saradnji i podršci u ispitivanju ultrastrukturnih promena i pomoći u obradi uzoraka za elektronsku mikroskopiju na Institutu za histologiju i embriologiju.

Akademiku Vladimiru Bumbašireviću na prilici da deo istraživanja uradim u Institutu za histologiju i embriologiju „Dr Aleksandar Đ. Kostić“ Medicinskog fakulteta u Beogradu.

Svim kolegama koji su učestvovali u izradi ovog rada na tome što su imali poverenja, dozvolili i pomogli da oblikujem svoje ideje.

Mojoj porodici i suprugu na razumevanju i podršci prilikom izrade disertacije.

Isidori, Nikolini i Vasiliju

REZIME

Uvod: Razvoj respiratornog sistema, larinksa, traheje i pluća započinje u 4. nedelji embrionalnog razvoja odvajanjem laringotrahealnog divertikuluma od prednjeg creva i nastavlja se posle rođenja sve do oko osme godine života. Sazrevanje pluća se odvija kroz četiri histološke faze. Redom su to: pseudoglandularna, kanalikularna, sakularna i alveolarna faza razvoja. Tri glavne funkcije respiratornog sistema su: sprovođenje vazduha, njegova filtracija od mehaničkih nečistoća i razmena gasova na alveolarno-kapilarnoj membrani - disanje. U udahnutom vazduhu se nalazi veliki broj čestica, mikroorganizama, alergena i drugih potencijalno štetnih uzročnika koji mogu izvesti pluća iz ravnoteže i onemogućiti ili na drugi način ugroziti disanje. Najveći broj patogena koji dovode do nastanka bolesti respiratornog sistema upravo su inhalacioni, ali imunološki odgovor koji podrazumeva ćelijski i humoralni aspekt deluje isto i u slučajevima fizičkog, hemijskog ili imunološkog oštećenja. Najsitnije čestice dijametra od 0,5 - 0,25 μm dolaze do alveola, a oko 20-30% tih čestica može da zaostane u prostoru alveola. Tu se aktivira lokalni imunski odgovor nižih partija respiratornog sistema. Sitne delove, koji mogu biti uklonjeni ćelijskim varenjem, uklanjaju makrofagi. Međutim, postoji određeni broj čestica koji pobuđuje jedan veoma moćan odbrambeni mehanizam pluća. U pitanju je imunološka kaskada koja je posledica imunološke aktivnosti pneumocita oba tipa, ipak više tipa II. Akutni respiratorni distress sindrom (ARDS) predstavlja naglo otkazivanje funkcije pluća, koje nije posledica edema pluća kardiogenog porekla. Ova respiratorna insuficijencija karakteriše se smanjenjem oksigenacije i pojavom edema pluća. Privlači veliku pažnju i danas zbog visokog procenta smrtnosti koji uz sve mere potpore ide i do 50%, iako je ovo stanje primećeno i prvi put opisano još u prvoj polovini 19. veka. S obzirom na veliki broj uzroka koji mogu dovesti do nastanka ARDS-a, počela su istraživanja mogućih zajedničkih činilaca u imunološkom odgovoru, koji bi mogli doprineti razvoju ovog poremećaja funkcije. Imunologija je ponudila ulogu proinflamatornih citokina kao faktor koji doprinosi razvoju respiratorne insuficijencije. Veći broj istraživanja je izdvojio kao značajne proinflamatorne citokine 6, 8 i 18. Međutim, s obzirom na to da su pacijenti kod razvijenog ARDS-a najčešće na mehaničkoj potpori, uzorkovanje tečnosti i/ili tkiva pluća je otežano i postavlja se pitanje etičnosti izlaganja pacijenta koji je životno ugrožen dodatnom riziku od pogoršanja opšteg stanja. Pretpostavka ovog istraživanja bila je da su interleukini odgovorni za razvoj respiratorne insuficijencije - ARDS-a detektibilni u tkivu pluća umrlih pod kliničkom slikom ARDS-a.

Cilj rada:

1. Određivanje prisustva IL6, IL8 i IL18 u tkivu pluća odraslih bolesnika sa akutnim respiratornim distress sindromom.
2. Svetlosno i elektronsko mikroskopska analiza oštećenja epitelnih i endotelnih ćelija u tkivu pluća bolesnika sa akutnim respiratornim distress sindromom.

Materijal i metode: Tkivo pluća je uzorkovano na obdukcijama koje su rađene u Institutu za sudsku medicinu „Dr Milovan Milovanović“ Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu. Kriterijumi za ulazak u studiju su bili politrauma, bez povreda grudnog koša ili pluća, starost preko 18 godina, odsustvo komorbiditeta srca i pluća. Dobijeni uzorci su fiksirani u formalinu i dehidrirani u alkoholima rastuće koncentracije prema protokolu za histopatološku obradu tkiva, dalje kalupljeni u parafinske blokove, sečeni na mikrotomu i bojeni hematoksilin/eozin (HE) metodom. Dobijeni uzorci su analizirani na svetlosnom mikroskopu i uslov za dalju obradu je ispunjenje histoloških kriterijuma za ARDS: prisustvo hijalinih membrana, intersticijalni edem, destrukcija alveolarnih septi, kongestija krvnih sudova, zone svežeg krvarenja. Po utvrđivanju prisustva morfološkog supstrata za ARDS, uzorci su dalje bojeni imunohistohemijski na antigene interleukina (IL) od interesa za istraživanje IL6, IL8 i IL18. Na obdukciji je odmah uzorkovan i deo

tkiva pluća koji je obrađivan na transmisionom elektronskom mikroskopu (TEM). Ovi uzorci su fiksirani u glutaraldehidu, bojeni i obrađivani po protokolu za TEM.

Rezultati: Po obradi uzoraka tkiva pluća vršena je analiza na svetlosnom mikroskopu. Na analiziranim uzorcima bojenim HE metodom jasni su histološki elementi koji su karakteristični za ARDS. U uzorcima je uočen hijalin, u vidu hijalinih membrana, intersticijalni edem, kongestija krvnih sudova, disrupcija alveolarnih septi i zone svežeg krvarenja. Pozitivnost, prisustvo antigena, gradirana je od 0-3, pri čemu je nula negativno bojenje, a tri jako difuzno pozitivno bojenje. Tako je bojenje na interleukine pokazalo u grupi pacijenata sa ARDS-om jaku pozitivnost na IL6, IL8 i IL18, dok je bojenje u kontrolnoj grupi pokazalo nisku/umerenu pozitivnost. Transmisiona elektronsko mikroskopska analiza tkiva pluća sa ARDS-om pokazala je prisustvo edema i hijalinih membrana. Hijaline membrane su bile homogenog izgleda i prostirale su se preko nekrotičnog epitela alveolarnih septi.

Zaključak: Rezultati ovog istraživanja pokazali su da je u tkivu pluća uzetom sa autopsije moguće izvršiti adekvatnu histološku i ultrastrukturnu analizu. U radu je potvrđeno prisustvo IL6, IL8 i IL18, koji bi mogli biti potencijalni biomarkeri od uticaja u patogenezi ARDS-a. Ovo je naročito značajno zbog lakog uzorkovanja većeg broja uzoraka, s obzirom na to da se pacijent na mehaničkoj ventilacionoj potpori već nalazi u teškom opštem stanju, tako da je etički upitna opravdanost uzorkovanja. Autopsija omogućava kvantitativno zadovoljavajuće uzorkovanje, pri čemu su i uslovi za obradu zadovoljavajući u smislu kvaliteta dobijenih rezultata. Različitim oblicima fiksacije tkiva, alkoholni rastvori, glutaraldehid, krioprezervacija omogućava i primenu različitih molekularnih tehnika za analizu (genetski polimorfizmi).

Ključne reči: Akutni respiratorni distress sindrom (ARDS), politrauma, autopsija, IL6, IL8, IL18, transmisiona elektronska mikroskopija (TEM).

Naučna oblast: Medicina

Uža naučna oblast: Molekularna medicina

UDK broj:

ABSTRACT

Introduction: Development of lungs begins by branching of laryngeal tube in 4th week of embryonic development and it continues from birth until the age of eight. Maturation of lungs takes place through four histological stages. They are pseudoglandular, canalicular, terminal sac and alveolar stage. Three main functions of respiratory system are: conduction of air, filtration, and gas exchange - breathing. In inhaled air there are many particles, microorganisms, allergens and other potentially harmful agents that can disbalance lungs and endanger breathing in any way. Vast majority of pathogens that cause respiratory system diseases are inhaled, but the immune response, which includes cellular and humoral aspects, works the same in cases of physical, chemical or immunological damage. The smallest particles with the diameter of 0.5 - 0.25 μm reach alveoli, and 20-30% of those particles can stay in the alveolar space. This is the place of activation of immune response of the lower parties of lungs. Some of those particles can be neutralized by cell digestion of macrophages. But there is a certain number of particles that can induce very powerful immune defensive lung mechanism. This immunological cascade is the result of activation of pneumocytes (alveolar cells), especially type II. Acute respiratory distress syndrome (ARDS) is acute respiratory failure of non-cardiogenic origin. This respiratory insufficiency is characterized with onset of hypoxemia and lung edema. Acute respiratory distress syndrome intrigues due to high mortality rate and poor outcome, from beginning of 19th century till nowadays, with up to 50% deaths even with modern intensive care unit (ICU) protocols. Considering the long list of etiology factors, scientists started investigating potential immunology biomarkers which could contribute in develop of ARDS. The potential role of proinflammatory cytokines is promising in unravelling the mystery of ARDS. Significant number of authors offered theory with IL6, IL8 and IL18. However, considering that patients with ARDS are often in ICU and on mechanical ventilation, sampling is challenging, and not without ethical issues hence patients are unstable and very easy can deteriorate. Hypothesis of this study was that interleukins responsible for the development of respiratory failure - ARDS are detectable in the lung tissue of those who died under the clinical picture of ARDS.

Aim:

1. Detecting presence of IL6, IL8 and IL18 antigens in lung tissue of those who died with diagnosis of ARDS.
2. Light and transmission electron microscopic analysis of damage in epithelial and endothelial cells in patients with ARDS.

Material and methods: Lung tissue was sampled at autopsies performed at the Institute for Forensic Medicine „Dr Milovan Milovanović“, Faculty of Medicine, University of Belgrade. Criteria for entering the study were polytrauma, no chest or lung injuries, age over 18 years, absence of heart and lung comorbidities. The obtained samples were fixed in formalin and dehydrated in alcohols of increasing concentration according to the protocol for histopathological tissue processing, further embedded in paraffin block, cut on a microtome, and stained with the hematoxylin/eosin (HE) method. The obtained samples were analyzed under a light microscope and the condition for further processing is the fulfillment of the histological criteria for ARDS: the presence of hyaline membranes, interstitial edema, destruction of alveolar septa, congestion of blood vessels, zones of fresh bleeding. After determining the presence of a morphological substrate for ARDS, the samples were further stained for interleukin (IL) antigens of interest for research IL6, IL8 and IL18. At the autopsy, a part of the lung tissue was immediately sampled and processed for transmission electron microscopy (TEM). These samples were fixed in glutaraldehyde, embedded in Epoxy resins, stained with uranyl acetate and lead citrate, and analyzed on a transmission electron microscope.

Results: After processing the lung tissue samples, analysis was performed on a light microscope. On the analyzed samples stained by the HE method, the histological elements that are characteristic of ARDS are clear. Hyaline, in the form of hyaline membranes, interstitial edema, congestion of blood vessels, disruption of alveolar septa and zones of fresh bleeding were observed in the samples. Positivity, the presence of antigen, is graded from 0-3, where zero is negative staining and three is strong diffuse positive staining. Thus, staining for interleukins showed strong positivity for IL6, IL8 and IL18 in the group of patients with ARDS, while staining in the control group showed low/moderate positivity. Transmission electron microscopic analysis of lung tissue with ARDS showed the presence of edema and hyaline membranes. The hyaline membranes were homogeneous in appearance and spread over the necrotic epithelium of the alveolar septa.

Conclusion: The results of this research showed that it is possible to perform an adequate histological and ultrastructural analysis in the lung tissue taken from the autopsy. The work confirmed the presence of IL6, IL8 and IL18, which could be potential biomarkers of influence in the pathogenesis of ARDS. This is particularly significant due to the easy sampling of a larger number of samples, given that the patient on mechanical ventilation support is already in a serious general condition, and the ethical justification of sampling is questionable. Autopsy enables quantitatively satisfactory sampling, while the processing conditions are also satisfactory in terms of the quality of the obtained results. Various forms of tissue fixation, alcohol solutions, glutaraldehyde, and cryopreservation also enable the application of various molecular techniques for analysis (genetic polymorphisms).

Key words: Acute respiratory distress syndrome (ARDS), polytrauma, autopsy, IL6, IL8, IL18, transmission electron microscopy (TEM).

Research area: Medicine

Research field: Molecular medicine

UDC number:

SADRŽAJ

1. UVOD	1
1.1. Akutni respiratorni distres sindrom	1
1.2. Embrionalni razvoj pluća	3
1.3. Histološka građa pluća	5
1.4. Imunološke karakteristike pluća.....	9
1.5. Interleukini	10
2. CILJEVI ISTRAŽIVANJA.....	13
3. MATERIJAL I METODE	15
3.1. Selekcija ispitanika.....	15
3.2. Priprema uzoraka za patohistološku analizu	16
3.2.1. Uzorkovanje, fiksacija, hematoksin/eozin bojenje	16
3.2.2. Priprema i imunohistohemijsko bojenje IL6, IL8 i IL18.....	17
3.3. Priprema uzoraka za transmisionu elektronsku mikroskopiju	19
3.3.1. Priprema uzoraka i kalupljenje	19
3.3.2. Sečenje i kontrastiranje mrežica	19
3.4. Statistička analiza	19
4. REZULTATI.....	21
4.1. Karakteristike ispitanika.....	21
4.2. Histološka analiza.....	24
4.3. Analiza prisustva IL6	25
4.4. Analiza prisustva IL8	26
4.5. Analiza prisustva IL18	28
4.6. Ultrastrukturalna analiza	29
4.7. Korelacija IL6, IL8 i IL18 sa godinama života	30
5. DISKUSIJA	35
6. ZAKLJUČCI.....	41
7. LITERATURA.....	43

1. UVOD

1.1. Akutni respiratorni distress sindrom

Akutni respiratorni distress sindrom (ARDS) predstavlja poremećaj funkcije pluća koji podrazumeva respiratornu insuficijenciju koja nije posledica kardiogenog plućnog edema (1, 2, 3). Ovakav poremećaj funkcije pluća prvi put je opisan 1967. godine (4). Opisao ga je *Auerbach* i tada kao glavne kliničke karakteristike naveo dispneju, tahipneju i smanjenu komplijansu pluća refrakternu na mehaničku ventilaciju. Radiografski su opisana obostrana zasenčenja (5, 6, 7). Ovaj poremećaj funkcije pluća je privukao pažnju lekara urgentne medicine i intenzivne nege, najpre naglim razvojem simptoma, kao i velikim procentom smrtnog ishoda. Naime, do danas je smrtnost od ARDS-a vrlo visoka i u različitim izvorima u literaturi navodi se procenat od 25-44% (6). Posle *Auerbach*-a, definiciju je 1994. godine ponudilo Američko-Evropsko udruženje (AECC - American-European Consensus Conference on ARDS) i definisalo ARDS kao prisustvo određenih kriterijuma: a) nagli razvoj kliničke slike uz poznat etiološki faktor, b) hipoksemiju težeg stepena gde je odnos PaO_2/FiO_2 manji od 200 mmHg, c) obostrani infiltrati na radiografiji pluća, d) odsustvo kardiogenog plućnog edema (2, 6, 7). Od tada je ponuđeno više verzija i dopuna definicije ARDS-a i poslednja aktuelna je Berlinska definicija koja obuhvata tri stepena težine poremećaja u odnosu na stepen hipoksije: blagi (PaO_2/FiO_2 200-300 mmHg), umereni (PaO_2/FiO_2 100- 200 mmHg) i teški (PaO_2/FiO_2 manji od 100 mmHg) (8). Razlika poslednje aktuelne definicije u odnosu na prethodnu je u tome što ona podrazumeva razvoj ARDS-a u roku od sedam dana od izloženosti etiološkom faktoru. Izvršena je i promena u kategoriji hipoksemije. Naime, ranije opisivana akutna povreda pluća (acute lung injury - ALI) sada je zamenjena blagim ARDS-om, dok je hipoksemija sa odnosom P/F ispod 100 mmHg definisana kao obeležje teškog ARDS-a. Ovakvim izmenama omogućena je trijaža pacijenata, uz mogućnost da se izbegne pogrešno postavljanje dijagnoze ARDS-a kod npr. atelektaze pluća (9, 10). Jasno definisanje ovog poremećaja dodatno otežava veliki broj etioloških faktora koji mogu dovesti do razvoja ARDS-a. Među najčešćim u literaturi se navode: sepsa, pneumonija, opekotine, politrauma, šok, aspiracija gastričnog sadržaja, kontuzija pluća, inhalaciona povreda pluća, reperfuzioni plućni edem, akutni pankreatitis, transfuzija krvnih derivata.

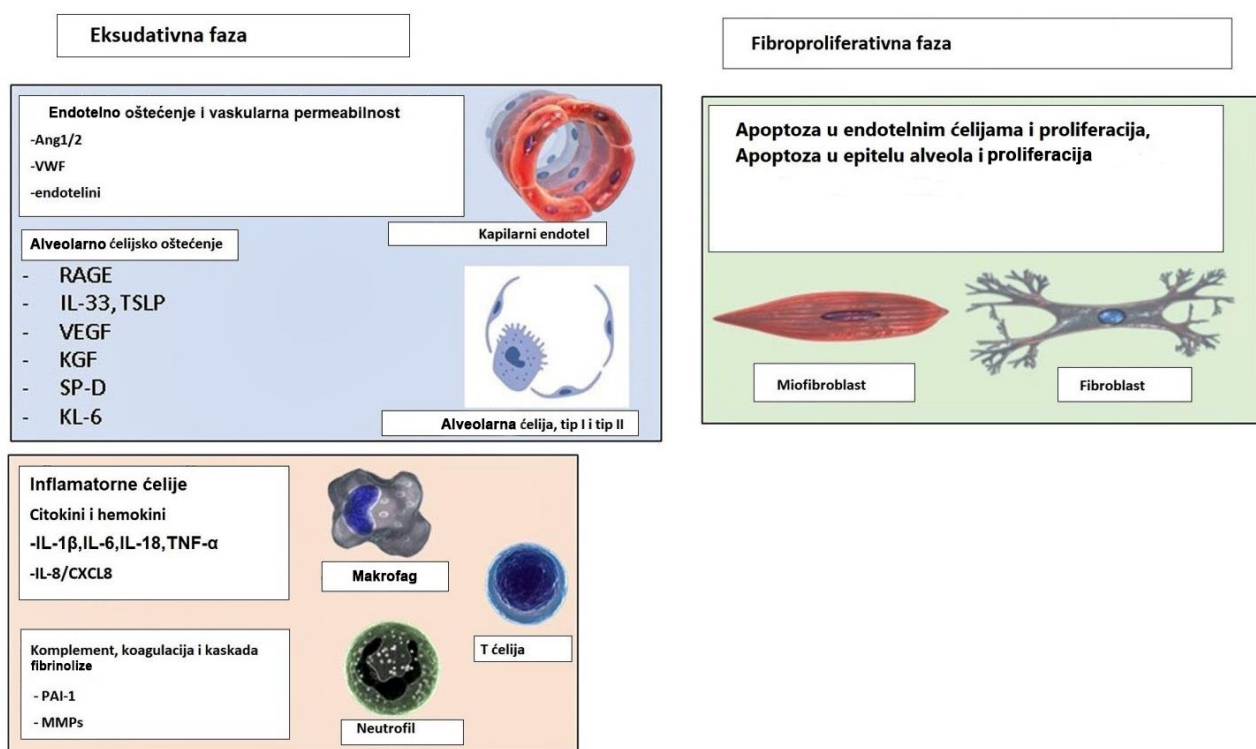
Tabela 1.1.1. Berlinska definicija akutnog respiratornog distress sindroma. Modifikovano iz Spadaro et al., 2011.

Akutni respiratorni distress sindrom	
Vreme početka	Unutar 7 dana od poznatog kliničkog uzroka ili pogoršanja respiratornih simptoma
Dijagnostičko snimanje grudnog koša*	Bilateralna zasenčenja, koja ne mogu da se objasne torakalnim izlivima, kolapsom ili plućnim nodusima
Poreklo plućnog edema	Respiratorna insuficijencija koja se ne pripisuje popuštanju srca ili višku tečnosti. Ukoliko nema faktora rizika, potrebna je objektivna procena (ehokardiografija)
Hipoksemija	
Blaga	$200 \text{ mmHg} < PaO_2/FiO_2 > 300 \text{ mmHg}$ sa PEEP-om ili CPAP-om $> 5 \text{ cmH}_2\text{O}$
Srednja	$100 \text{ mmHg} < PaO_2/FiO_2 > 200 \text{ mmHg}$ sa PEEP-om $> 5 \text{ cmH}_2\text{O}$
Teška	$100 \text{ mmHg} < PaO_2/FiO_2$ sa PEEP-om $> 5 \text{ cmH}_2\text{O}$

*Radiografija srca i pluća ili kompjuterizovana tomografija grudnog koša (CT)

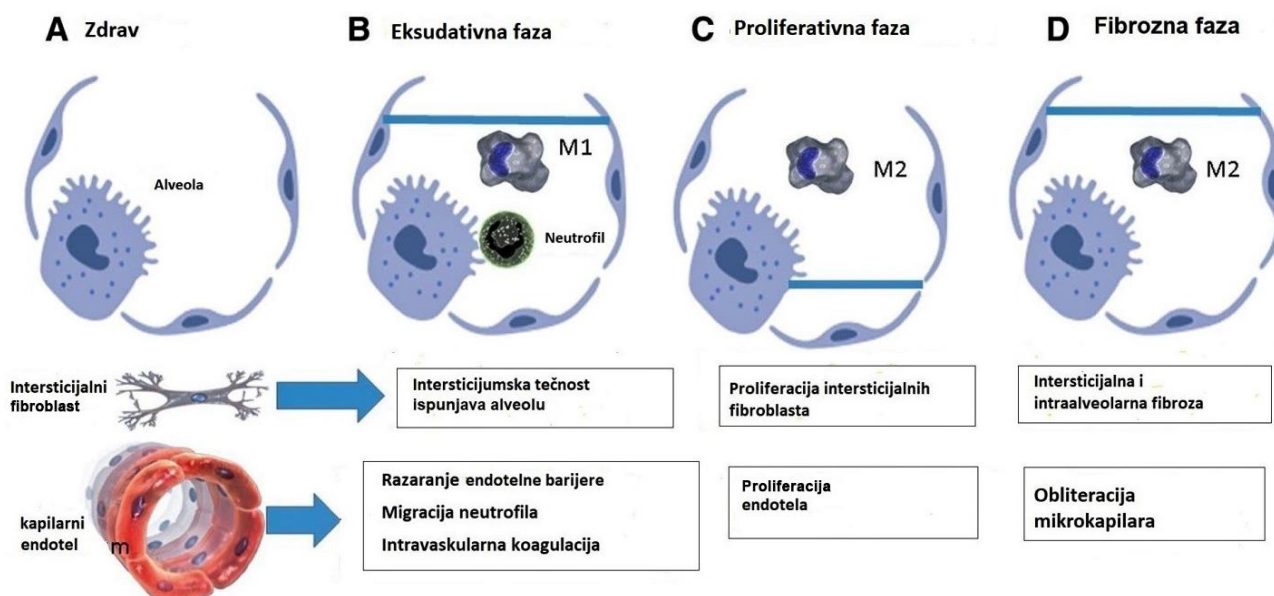
PEEP = pozitivni pritisak na kraju ekspirijuma, CPAP = kontinuirani pozitivni pritisak

Klinička slika ARDS-a se odlikuje progresivnim pogoršanjem plućne funkcije do respiratorne insuficijencije (11). Protiče kroz tri kliničke faze (9): 1. *Eksudativnu* koja se odlikuje alveolarnim edemom i infiltracijom neutrofila. Kasnije dolazi do formiranja hijalinih membrana koje su posledica difuznog oštećenja alveola. Razvija se hipoksemija, tahipneja i progresivna dispneja, a novonastali emfizem, koji je posledica spajanja raskidanih alveolarnih prostora, može pogoršati hipoksiju i dovesti do razvoja hiperkapnije. U ovoj fazi se najčešće razvija respiratorna insuficijencija. Na radiografiji se vide karakteristična zasenčenja (7). Ova faza traje od 12-36 sati od delovanja etiološkog faktora, do 7 dana. 2. *Proliferativnu* koja se karakteriše remodeliranjem plućnog parenhima. Dolazi do proliferacije pneumocita tipa II, proliferacije epitelnih ćelija i reaktivne proliferacije fibroblasta. Ova faza traje od 7-21 dana i tokom nje klinički mogu da se pojave hipoksija i dispneja. 3. *Fibrozna faza* tokom koje dolazi do zamene oštećenog parenhima pluća fibroznom tkivom. Ona traje od 21. do 28. dana. Po završetku ove faze jedan broj pacijenata razvije progresivnu fibrozu (9, 11). Ipak, najveći broj pacijenata umire tokom prve faze ARDS-a (6).



Slika 1.1.1. Dijagram ilustruje ključne molekule uključene u imunološku komponentu razvoja ARDS-a. Modifikovano iz Spadaro et al., 2011.

Patofiziologija ARDS-a je veoma složena i nedovoljno razjašnjena (8). Takođe, zanimljivo je i da sve ponuđene definicije, kao i kriterijumi za dijagnostiku ne obuhvataju imuno-patofiziološki aspekt razvoja ARDS-a, iako danas saznajemo da je u razvoju ARDS-a angažovano više poznatih mehanizama koji dovode do razvoja epitelne i endotelne povrede (8).



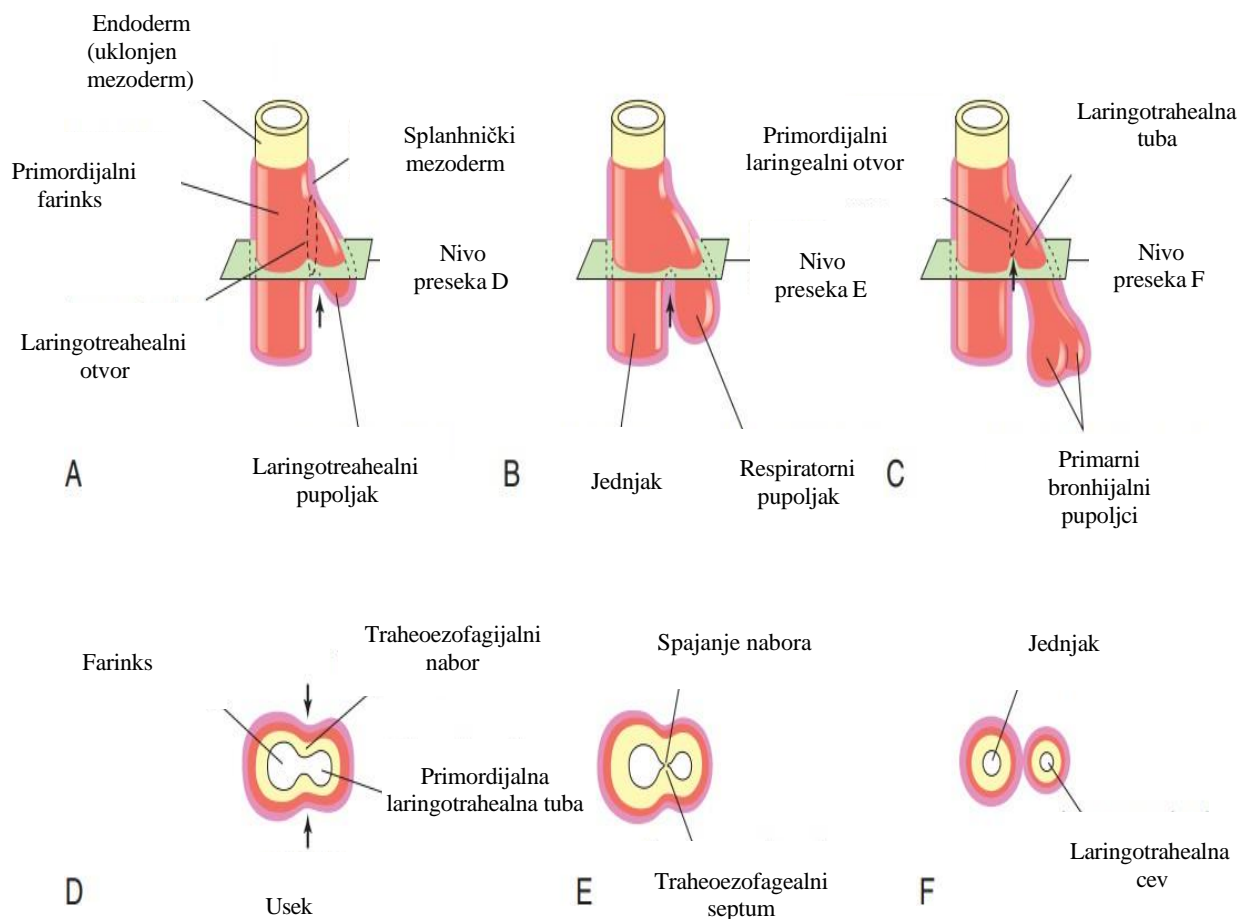
Slika 1.1.2. Imunopatologija i biomarkeri u ARDS-u. Modifikovano iz Spadaro et al., 2011.

Iako se protokoli veoma temeljno sastavljaju i unapređuju, ARDS odnese i danas oko 25-44% pacijenata u jedinicama intenzivne nege širom sveta (4). Radiografska slika ARDS-a odlikuje se prisustvom obostranih nodularnih zasenčenja koja su posledica direktnog oštećenja plućnog parenhima i krvnih sudova, a u korelaciji su sa histološkom slikom: intersticijskim edemom i prisustvom hijalinih membrana (11). Histološka slika ARDS-a ima tri osnovna oblika: difuzno alveolarno oštećenje, što je i najčešća histološka slika, organizujuća pneumonija (ranije obliterišući bronhiolitis sa organizujućom pneumonijom) i akutna eozinofilna pneumonija (12, 13, 14).

1.2. Embrionalni razvoj pluća

Razvoj respiratornog sistema, larinksa, traheje i pluća započinje u 4. nedelji embrionalnog razvoja odvajanjem laringotrahealnog divertikuluma od prednjeg creva (15). Ovaj divertikulum od prednjeg creva odvajaju traheoezofagusni nabori koji će se spojiti u traheoezofagusni septum, čime nastaju ezofagus i laringotrahealna cev (15).

Pluća se razvijaju prenatalno, kao i postnatalno do osme godine života (15). Endoderm laringotrahealne cevi će dati epitel i žlezde bronhijalnog stabla, dok ostali delovi zida bronhijalnog stabla nastaju od splanhnopleuralnog mezoderma (15).



Slika 1.2.1. Faze razvoja traheozofagealnog septuma tokom četvrte i pete nedelje intrauterinog razvoja. Na dijagramu od A do C prikazani su bočni preseki kaudalnog dela primordijalnog farinksa. Na dijagramu od D do F prikazani su transverzalni preseki na kojima se vidi traheozofagealni septum koji odvaja laringotrahealni prostor od jednjaka. (Modifikovano iz Moore Keith, ISBN: 978-0-323-60849-7).

Pluća će nastati od laringotrachealnog divertikuluma, čiji razvoj počinje oko 4. nedelje intrauterinog života (15). Plućni pupoljak će se ubrzo podeliti na dve glavne grane iz kojih će nastati principalni bronhi (15, 16). Dalje će se principalni bronhi deliti na lobarne, segmentne i intersegmentne grane. Segmentni bronhi se formiraju oko 7. nedelje, a do 24. nedelje intrauterinog razvoja nastaje 17 sukcesivnih grananja i počće razvoj respiratornih bronhiola (15, 16, 17). Po rođenju, grananje se nastavlja još za sedam generacija (17). Po završenom formiranju bronhija, iz splanhničkog mezoderma koji okružuje grane budućeg traheobronhijalnog stabla nastaje bronhijalne hrskavice, glatki mišići, vezivno tkivo i kapilari (17). Pluća tokom razvoja povlače i sloj splanhničkog mezoderma koji će dati visceralnu pleuru, dok parijetalnu pleuru daje somatski mezoderm (17).

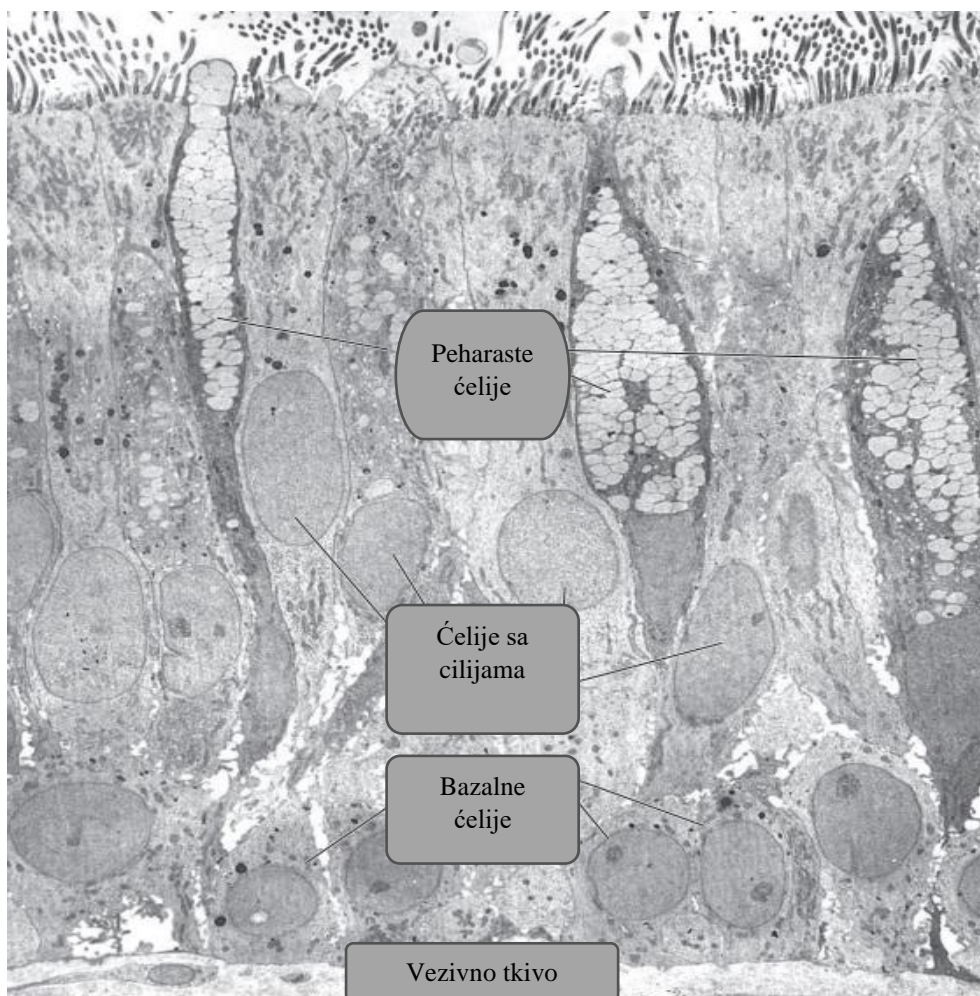
Sazrevanje pluća se odvija kroz četiri histološke faze (15, 16, 17). Redom su to: pseudoglandularna, kanalikularna, sakularna i alveolarna faza razvoja (15, 16, 17).

Pseudoglandularna faza obuhvata period od 5-17 nedelje intrauterinog razvoja. Tokom ove faze, pluća histološki najviše podsećaju na egzokrine žlezde i razmena gasova u njima nije moguća, pa tako ni preživljavanje ukoliko dođe do rođenja (15, 16, 17). Kanalikularna faza se nastavlja i obuhvata period od 16-25 nedelje (17). Ovo preklapanje u vremenu sazrevanja je zbog toga što kranijalni delovi pluća nešto brže ulaze u ovaj stadijum, pa se u 16. nedelji u plućima histološki mogu videti obe faze i glandularna i kanalikularna. Ovu fazu karakteriše intenzivno grananje bronhija i vaskularizacija zidova primordijalnih alveola (15, 16). Ipak, zbog ekstremne nezrelosti pluća niska je stopa preživljavanja dece rođene u ovom periodu (17). Sakularna faza traje od 24.

nedelje do kraja trudnoće. Tokom ove faze dolazi do razvoja alveola i dalje vaskularizacije njihovih zidova (15, 16, 17). Formira se kontakt između epitelnih i endotelnih ćelija, čime se omogućava razmena gasova (17). U ovoj fazi dolazi do intenzivne sinteze surfaktanta - monomolekularnog filma koji oblaže unutrašnji zid alveola i reguliše alveolarni pritisak, onemogućavajući da dođe do kolapsa alveola (15, 16). Surfaktant se luči od 20. nedelje, ali u veoma malim količinama, za razliku od kasnog fetalnog doba (15, 16, 17). Alveolarni period traje od kasnog fetalnog doba do osme godine života (15, 16, 17). Najveći broj alveola sazri do treće godine života, ali sazrevanje traje sve do osme godine, tako da se u ovom periodu čak može duplirati broj zrelih alveola (15, 16, 17).

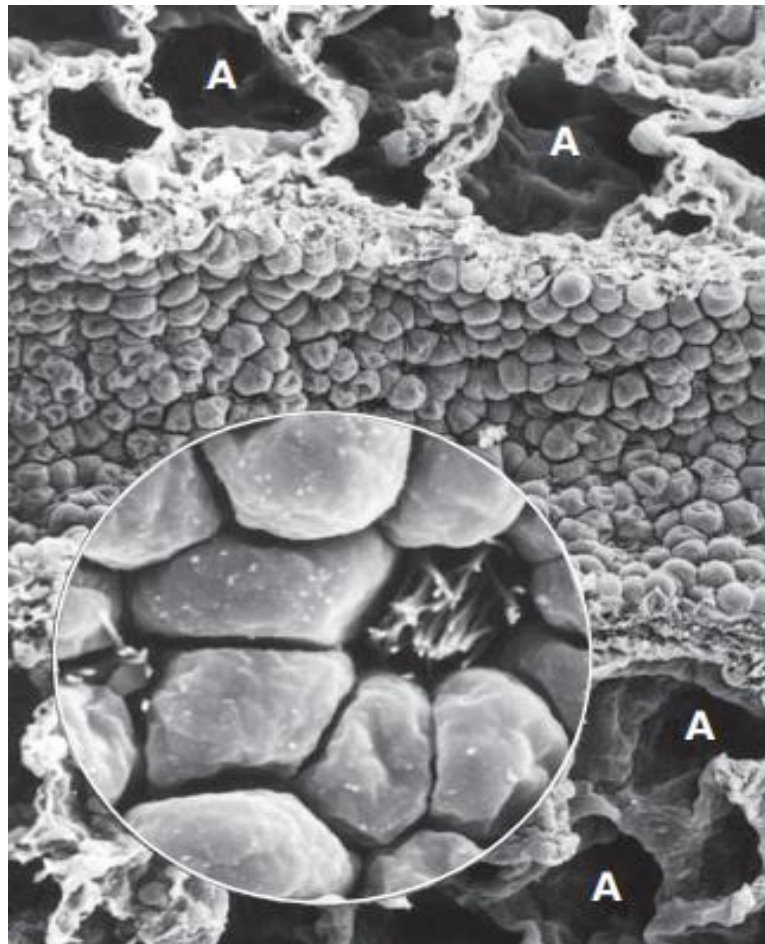
1.3. Histološka građa pluća

Tri glavne funkcije respiratornog sistema su: sprovođenje vazduha, njegova filtracija od mehaničkih nečistoća i razmena gasova na alveolarno-kapilarnoj membrani – disanje (18). Za bolje razumevanje ovih procesa neophodan je osvrt na histološku građu pojedinih delova ovog organskog sistema. Polazeći od najvećih disajnih puteva počinje grananje koje za krajnji cilj ima usmeravanje vazduha prema kapilarno-vazdušnoj barijeri (15, 18). Prolazeći kroz velike disajne puteve vazduh se prvo filtrira od najkrupnijih čestica. Mehaničke čestice na ovom nivou uklanja trepljasti epitel traheje. Osnovnu građu respiratornog epitela najbolje možemo videti na transmissionom elektronskom mikroskopu (TEM). Na slici ispod prikazan je deo respiratornog epitela sa vidljivim osnovnim ćelijama: trepljastim ćelijama na površini, peharastim ćelijama sa mucinogenim granulama i bazalnim ćelijama (18).

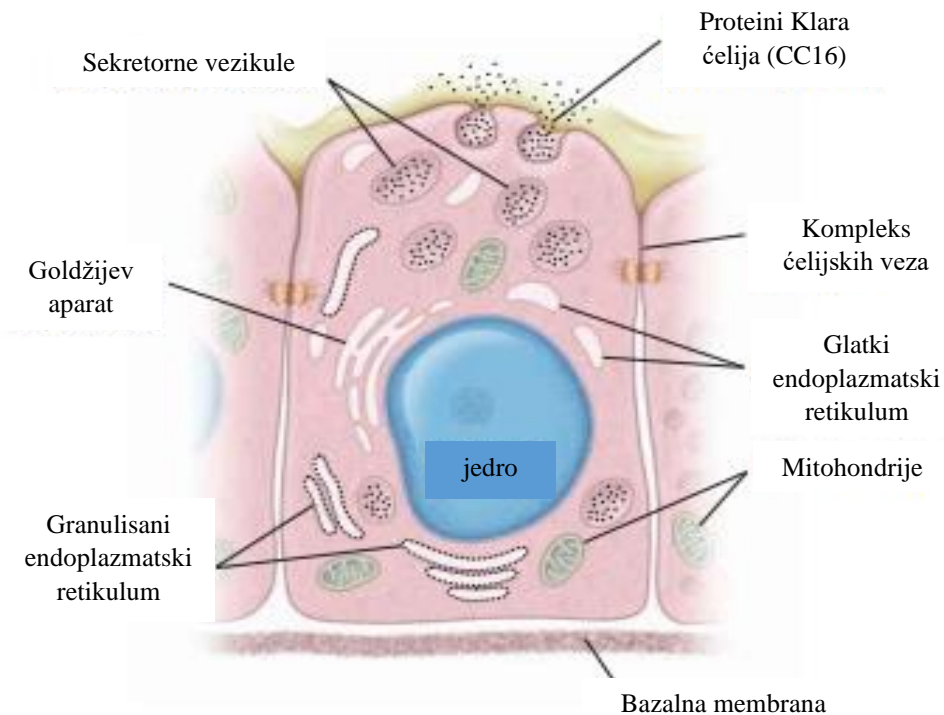


Slika 1.3.1. Prikaz građe epitela traheje (Modifikovano iz Ross Histology text and atlas, 7th edition, 2016)

Kako se grananje disajnih puteva nastavlja, idući ka dubljim partijama i manjim disajnim putevima, menja se izgled i funkcija epitela. Tako je poslednji nivo kondukcije vazduha respiratorna bronhiola (18). Takođe, ovo je i mesto na kome počinje zona razmene gasova (18). Kako ovaj segment ima dvojaku funkciju, nosi naziv tranzitorna zona (18). Ovde još uvek dominira kockasti epitel sa prisutnim ćelijama sa cilijama i Klara ćelijama. Kako se dalje granaju disajni putevi prema alveolama u epitelu, sve je veći broj Klara ćelija (15, 18). Ove ćelije nemaju cilije i imaju karakterističan ovalni oblik. Na TEM se uočava njihova priroda. Kako su one protein sekretujuće ćelije, imaju veoma razvijen granulirani endoplazmatski retikulum i Goldžijev aparat (15, 18).



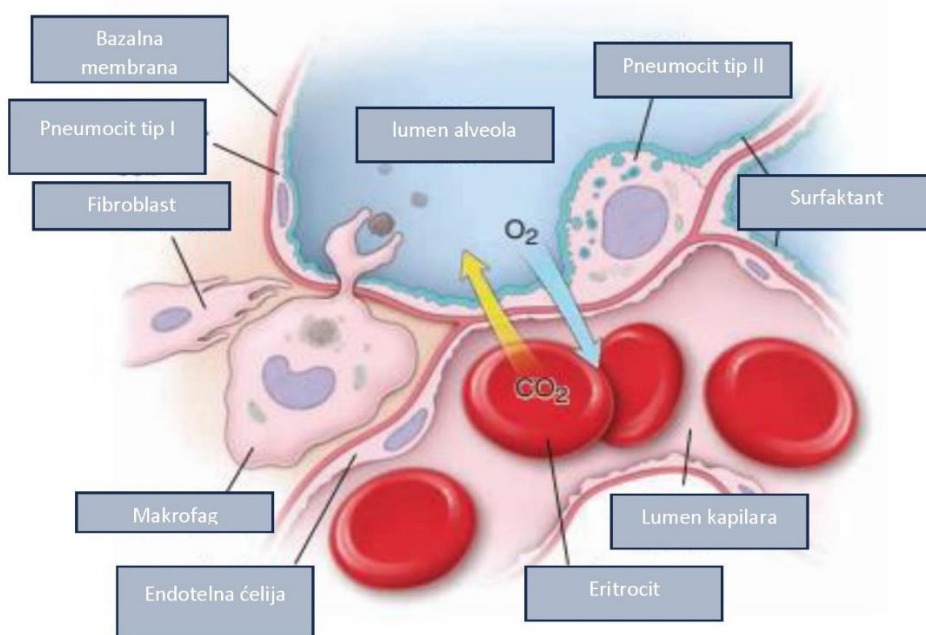
Slika 1.3.2. Prikaz građe epitela prelazne zone. U uvećanju ovalne Klara ćelije sa prisutnom ćelijom sa trepljama. (Modifikovano iz Ross, Histology text and atlas, 7th edition, 2016)



Slika 1.3.3. građa Klara ćelije (Modifikovano iz Ross, Histology text and atlas, 7th edition, 2016)

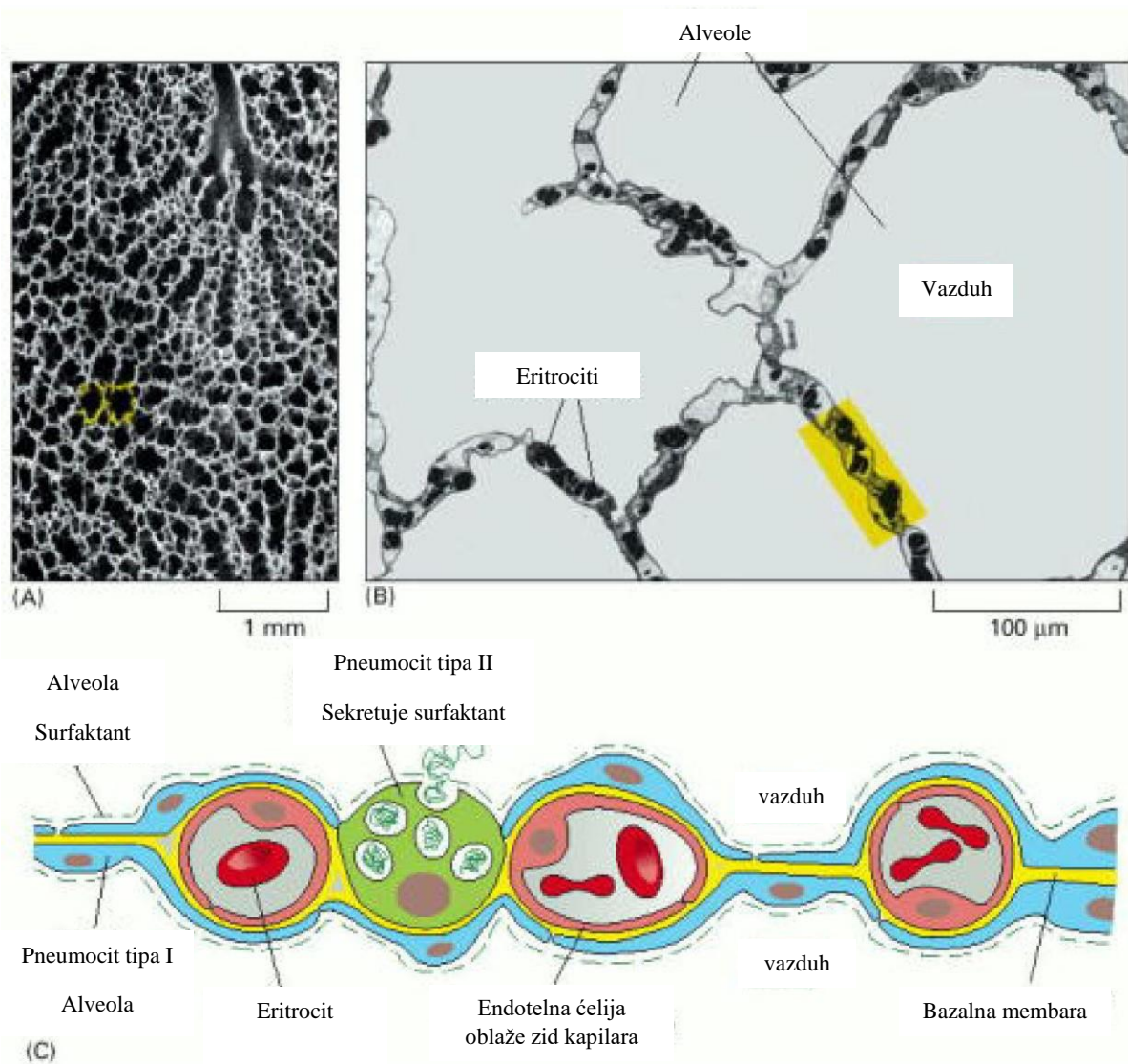
Grananje se dalje nastavlja formirajući alveolarne duktuse na čijem kraju su alveolarne vreće, koje čini veći broj alveola (18).

Epitel alveola formiraju dve vrste ćelija: pneumociti tipa I i II. Pneumociti tipa I su relativno krupne, ljuspaste epitelne ćelije promera oko 70 nm, oskudne citoplazme. Ovaj sloj gusto poređanih i međusobno čvrsto povezanih ćelija naslanja se na mrežu kapilara, čineći alveolarno-vaskularnu barijeru (15). Tako je alveolarno-vaskularna membrana, koju čine pneumociti tipa I, kapilarni endotel i bazalna membrana, mesto razmene gasova i epicentar funkcije respiratornog sistema.



Slika 1.3.4. Prikaz alveolarno-kapilarne membrane (Modifikovano iz Ross, Histology text and atlas, 7th edition, 2016)

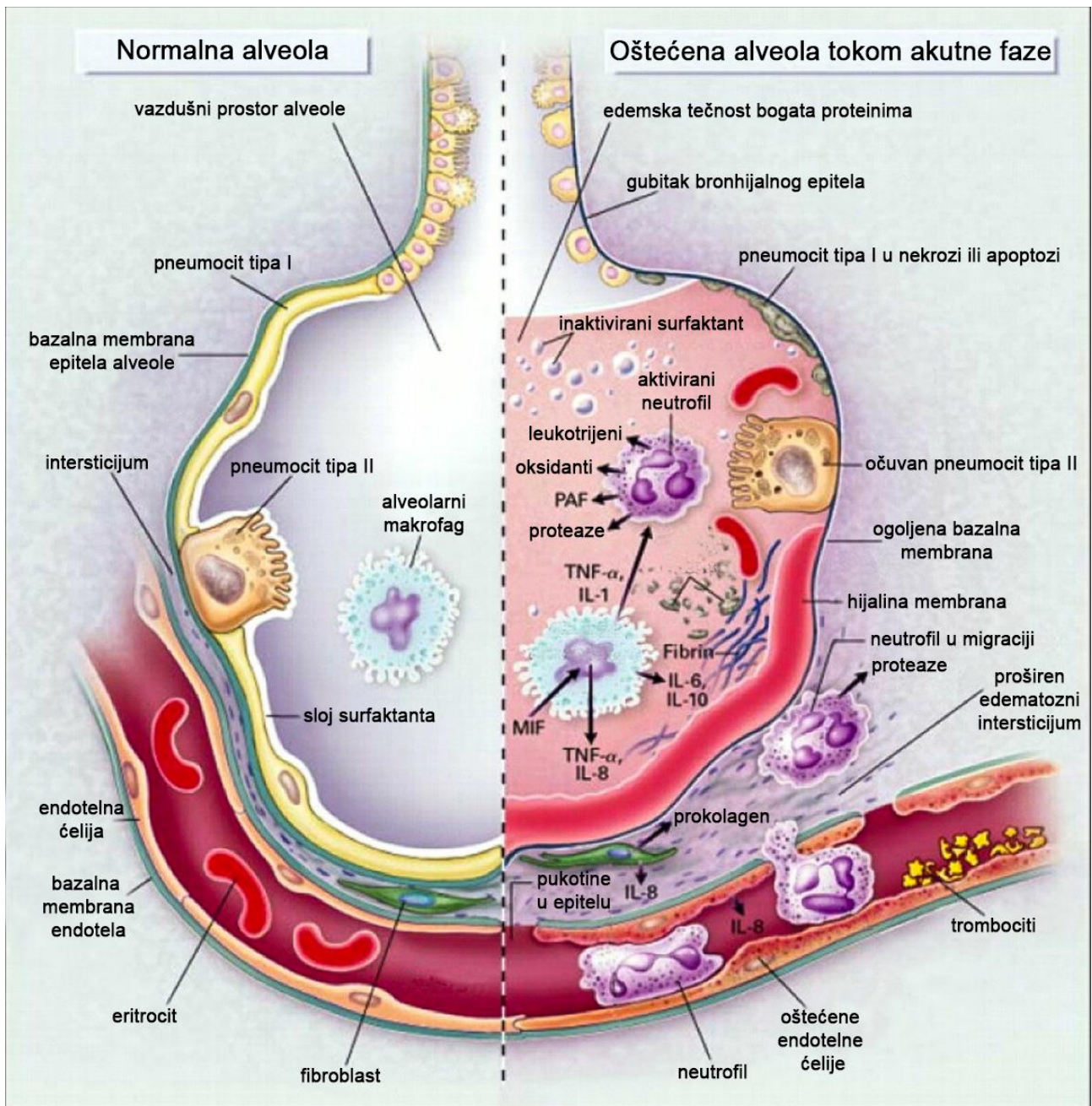
Do kraja 26. nedelje intrauterinog života terminalne alveole su obložene ljustastim epitelnim ćelijama endodermalnog porekla - pneumocitima tipa I preko kojih se vrši razmena gasova. Kapilarna mreža brzo proliferiše u mezenhimu koji okružuje alveole (17). Drugi tip ćelija jesu pneumociti tipa II koji se značajno razlikuju i izgledom i funkcijom od pneumocita tipa I (18). Ove su ćelije ovalne, manjeg promera 10-15nm, sa dobro razvijenim organelama, granulisanim endoplazmatskim retikulumom i Goldžijevim aparatom (15). Osnovna funkcija pneumocita tipa II je lučenje surfaktanta. Izlučeni surfaktant snižava površinski napon u alveolama i na taj način omogućava njihovo otvaranje, njegovo lučenje počinje od 6. meseca trudnoće, kada se povećavaju šanse za preživljavanje (17). Ćelije koje imaju ulogu u homeostazi alveola su alveolarni makrofagi. Ove ćelije delujući u sinergiji uklanjaju prljavštinu i mikroorganizme koji se unose prilikom disanja (15, 16, 18). Alveolarni makrofagi dolaze migracijom putem krvi, potiču iz monocita i predstavljaju deo mononuklearnog fagocitnog sistema (19). Pored ovih, prisutan je i manji broj neuroendokrinih ćelija koje luče lokalne medijatore, serotonin i peptide (15, 17).



Slika 1.3.5. TEM prikaz plućnog alveolusa. (A) Prikaz odnosa bronhiole i alveolusa. (B) Detalj: Deo zida alveole u kome se vrši razmena gasova. (C) Dijagram građe prikazanog detalja sa slike (A) Modifikovano iz Nikolić I. Embriologija čoveka, ISBN 978-86-7478-035-0.

1.4. Imunološke karakteristike pluća

Pluća su vrlo važan organ čija je primarna funkcija razmena gasova. U toku dana kroz pluća prođe oko 10.000 L vazduha (19). U njemu se nalazi veliki broj čestica, mikroorganizama, alergena i drugih potencijalno štetnih uzročnika koji mogu izvesti pluća iz ravnoteže i onemogućiti ili na drugi način ugroziti disanje (19). Najveći broj patogena koji dovode do nastanka bolesti respiratornog sistema upravo su inhalacioni, ali imunološki odgovor koji podrazumeva ćelijski i humoralni aspekt deluje isto i u slučajevima fizičkog, hemijskog ili imunološkog oštećenja (20). Ovaj odgovor može biti sistemski i lokalni. Lokalni imunski odgovor u bronhijama obezbeđuje limfoidno tkivo, dok u nižim partijama ovu ulogu preuzimaju makrofagi i neutrofilni granulociti (22). Što se tiče inhalacionih čestica, upravo od veličine čestice koja dolazi u kontakt sa epitelom alveola zavisi koji će se odbrambeni mehanizam pokrenuti (20). Najkrupnije čestice, veličine preko 10 μ m bivaju zaustavljene u gornjim partijama respiratornog trakta (20). Njihova eliminacija je jednostavna, jer se najveće čestice lako izbacuju turbulentnim kretanjem vazduha u velikim disajnim putevima (21). Da bi ovaj mehanizam funkcionisao potrebno je da mukusni sloj oblaže epitel, kao i da cilijarni aparat funkcioniše ispravno (21). Kako se smanjuje promer inhaliranih čestica, tako one idu u dublje partije disajnih puteva. One se ovde zalepe na mukus peharastih ćelija i radom treplji, uz refleks kijanja ili kašljanja, bivaju izbačene nazad u spoljašnju sredinu (19). Najsitnije čestice dijametra od 0,5-0,25 μ m dolaze do alveola. Oko 20-30% tih čestica može da zaostane u prostoru alveola (20). Tu se aktivira lokalni imunski odgovor nižih partija respiratornog sistema. Sitni delovi koji mogu biti uklonjeni ćelijskim varenjem uklanjaju makrofagi. Ali postoji određen broj čestica koji pobuđuje jedan veoma moćan odbrambeni mehanizam pluća. U pitanju je imunološka kaskada koja je posledica imunološke aktivnosti pneumocita oba tipa, ipak više tipa II (19). Usled anatomskih i fizioloških razloga, gde je prioritet površine alveola razmena gasova, ima vrlo malo mesta za druge tipove ćelija. Ali iako malobrojne, ove ćelije mogu biti vrlo moćne u svom delovanju. U pitanju su makrofagi koji svoju funkciju mogu ostvariti na nekoliko načina (19, 20, 22). Uništavaju nepoželjne čestice direktnim delovanjem fagocitozom, sekretuju veliki broj antimikrobnih supstanci, ali i različite citokine (interleukin 1 i 6, tumorski faktor nekroze), kao i hemokine uključujući i interleukin 8 koji regrutuje neutrofilne granulocite (20, 21). Kada dođe do povrede endotela, prvo endotelne ćelije luče hemokine i adhezivne molekule, čime aktiviraju makrofage (21). Aktivacijom makrofaga dolazi do pojačanja imunološkog odgovora, povećane sinteze proinflamatornih citokina, koja opet pozitivnom povratnom spregom indukuje povećanje broja makrofaga (21, 25). Osnovni nosioci zaštite homeostaze alveola jesu makrofagi, ali u imunskom odgovoru pluća učestvuju i hiperplazija limfoidnog tkiva, povećana sinteza imunoglobulina i povećanje broja makrofaga i neutrofilnih granulocita (24, 25). Ipak, uloga imunoloških mehanizama i faktori ćelijske preosetljivosti ostaju nepoznati (22).



Slika 1.4.1. Prikaz građe zdravih alveola i alveola u toku akutne faze ARDS-a. Modifikovano Bakowitz et al, 2012.

1.5. Interleukini

Imunski sistem je složen mehanizam i podeljen je na dve kategorije (26): urođeni i stečeni imunski sistem. Urođeni ili nespecifični imunski sistem se aktivira vrlo brzo, u roku od nekoliko sati ili dana od početka delovanja štetnih agenasa (27) i predstavlja prvu liniju odbrane. Ovaj tip imunskog odgovora sačinjen je od nekoliko komponenti: međućelijske barijere i fagocita (neutrofili, makrofagi) i serumskih proteina povezanih sa inflamacijom (sistem komplementa, C-reaktivni protein) (27). Kada organizam dođe u kontakt sa patogenom, aktivira se kaskada koja pojačava imunski odgovor i aktivira specifične mehanizme (27).

Grupa sekretujućih proteina koji imaju ulogu u komunikaciji između leukocita nazvana je interleukini (27, 30). Predstavlja vrstu citokina za koje se u početku smatralo da su produkt

leukocita (30, 31). Ovu grupu citokina luči veći broj ćelija (28). S obzirom na veći broj izvora i uloga interleukina je višestruka. Naime, oni su neodvojiv deo diferencijacije imunskih ćelija, ali i proliferacije, migracije, maturacije i adhezije (28-31). U pitanju su moćni imunomodulatori koji ostvaruju širok spektar dejstava u organizmu, najviše zahvaljujući tome što ih luči veliki broj ćelija, ali i zahvaljujući tome što svoje efekte ostvaruju i preko sekundarnih glasnika (32). Mogu imati proinflamatorno i antiinflamatorno dejstvo (28). Prema tome koje ćelije ih luče i na koje receptore deluju, interleukini su podeljeni na porodice (27, 29).

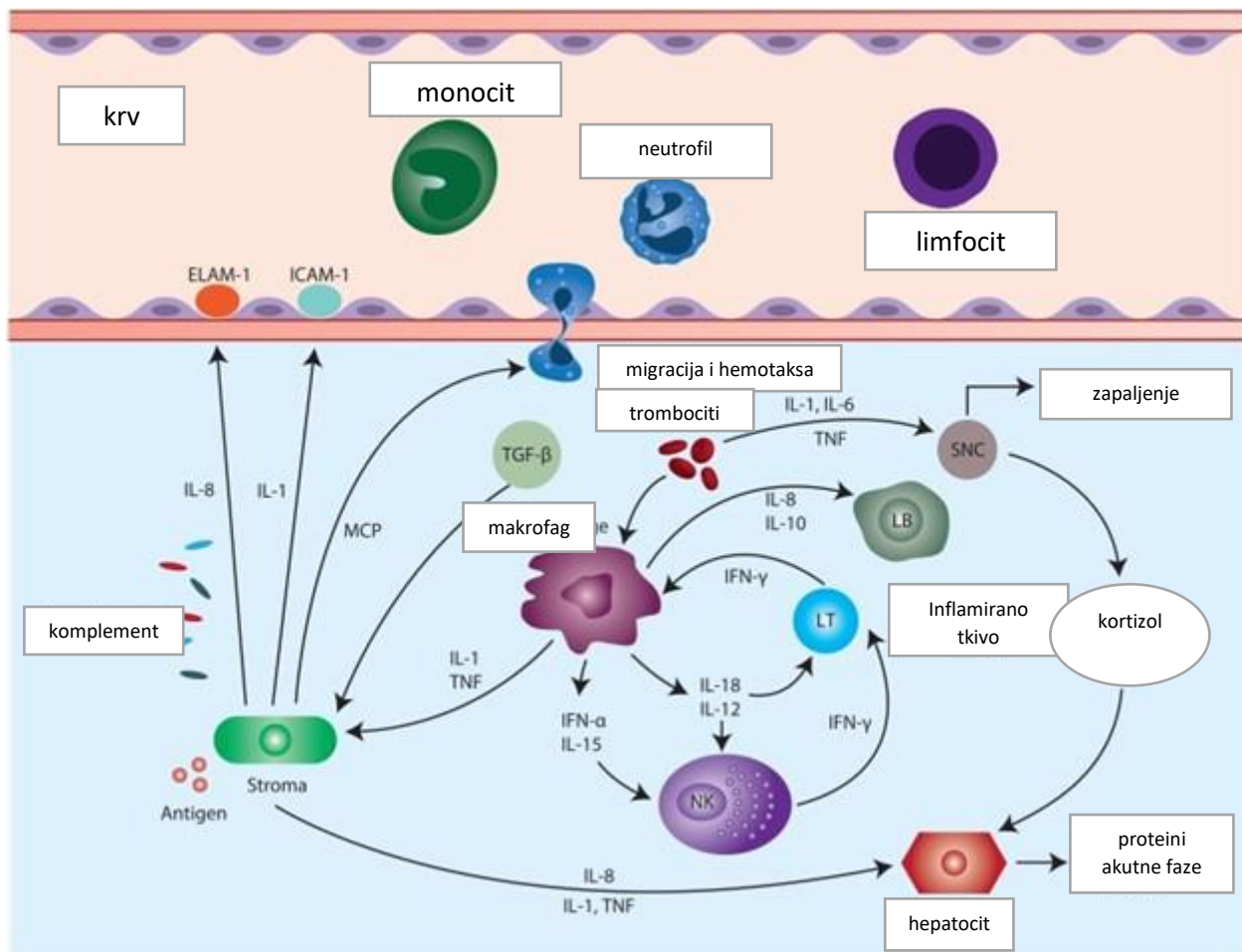
Ispitivanje mehanizama imunskog i inflamatornog odgovora neprekidno proširuje listu poznatih interleukina i njihovih efekata. Sekretija interleukina uslovljena je sintezom mRNK (28, 29). Ćelijski odgovor uključuje ushodnu i nishodnu regulaciju koja je uslovljena aktivacijom kodirajućih gena za uključivanje receptora inhibicije citokinskih receptora (29).

Pokretanje mehanizma nespecifičnog imunskog odgovora počinje prepoznavanjem opsonina. Ovo najčešće čine C-reaktivni protein i *Mannan* vezujući protein (*Mannan binding lectin*, MBL) (33, 37). Molekuli koji pokreću imunološku reakciju mogu biti u cirkulaciji ili mogu da se nađu u ekstracelularnom matriksu. Luči ih veći broj ćelija i tkiva (32-36). Mogu se naći u jetri, bubregu, tankom crevu, vagini, plućima, kao i koži i mozgu (33-36).

MBL aktivira komplement preko lektinskog komplement puta (27). Lektinski put aktivacije je udružen sa aktivacijom MBL-udružene serin proteaze (*Mannose associated serine protease*, MASPs) (27). Postoje dva gena za sintezu MASP i pet produkata gena (27).

Pored ovog sistema aktivacije komplementa, u nespecifičnoj odbrani učestvuju i kiseonik-zavisni mehanizmi, kiseonik-nezavisni mehanizmi, antimikrobni peptidi, NO, ekstracelularne zamke (27).

Efektorne ćelije nespecifičnog imuniteta su fagociti (granulociti, neutrofili), epitelne ćelije, ćelije prirodne ubice (NK ćelije), monociti, makrofagi i dendritske ćelije (27). Sve ove ćelije mogu da preko svojih receptora pokrenu sistem komplementa i luče citokine.



Slika 1.5.1. Efektorni mehanizmi nespecifičnog imunog odgovora. Modifikovano prema Anaya JM et al., 2013.

U ovom istraživanju ispitivano je prisustvo IL6, IL8 i IL18 u tkivu pluća. Sva tri ispitivana interleukina pripadaju sistemu nespecifične odbrane. Interleukin 6 sintetišu monociti/makrofagi, endotelne ćelije, T limfociti i fibroblasti (27, 38). Funkcija ovog interleukina u ćeliji je da indukuje sintezu proteina akutne faze imunskog odgovora, kao i diferencijaciju B limfocita i stvaranje antitela (27). Smatra se jednim od najvažnijih medijatora koji utiče na diferencijaciju B limfocita, sekreciju imunoglobulina, diferencijaciju citotoksičnih T limfocita, funkciju makrofaga i monocita i na produkciju proteina akutne faze (38). Iako aktivira i proinflamatorne i antiinflamatorne mehanizme, zastupljeniji je u putevima aktivacije proinflamatornih kaskada (38).

Interleukin 8 stvaraju i luče monociti i fibroblasti. Njegove primarne mete su neutrofilni i bazofilni granulociti, mast ćelije, makrofagi i keratinociti. On dovodi do hemotakse neutrofilnih granulocita, angiogeneze, oslobađanja superoksida i učestvuje u inhibiciji apoptoze neutrofilnih granulocita (38). Pojedini autori su, korelirajući prisustvo i nivoe IL6 i IL8 u bronhoalveolarnom lavatu obolelih od ARDS-a sa teškom kliničkom formom, došli do zaključka da postoji određeni genotip koji objašnjava jaču imunološku reakciju, povećanu sintezu ovih interleukina i lošiji klinički ishod (38).

Interleukin 18 sintetišu i luče makrofagi, a njegova uloga u inflamaciji je aktivacija NK ćelija i T limfocita, kao i indukcija sinteze INF- γ . Oni se aktiviraju tako što inflamazomi - intracelularni makromolekularni kompleksi aktiviraju proinflamatorni enzim kaspazu-1 koja konvertuje pro-IL1 β u IL-1 β i pro-IL18 u IL18 (38). Interleukin 18 je detektovan u bronhoalveolarnom lavatu obolelih od ARDS-a i njegova koncentracija naročito je povišena u plućima kod pacijenata sa lošim kliničkim ishodom(38).

2. CILJEVI ISTRAŽIVANJA

1. Određivanje prisustva IL6, IL8 i IL18 u tkivu pluća dobijenog na autopsiji odraslih bolesnika umrlih pod kliničkom slikom ARDS-a.
2. Svetlosno i elektronsko mikroskopska analiza oštećenja epitelnih i endotelnih ćelija u tkivu pluća bolesnika umrlih pod kliničkom slikom ARDS-a.

3. MATERIJAL I METODE

3.1. Selekcija ispitanika

U istraživanju su analizirani isečci tkiva pluća dve grupe pacijenata: uzorak, ukupno 35 pacijenata i kontrola, ukupno 14 pacijenata. Pacijenti iz uzorka povređeni su u saobraćajnim nezgodama, hospitalizovani u Urgentnom centru u Beogradu, umrli pod kliničkom slikom ARDS-a i obdukovani u Institutu za sudsku medicinu "Dr Milovan Milovanović" Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu.

Faktori za uključivanje u istraživanje:

1. uzrast > 18 godina;
2. dijagnoza u skladu sa Berlinskom definicijom iz 2012;
3. ARDS nastao kao posledica politraume, bez povreda grudnog koša ili pluća.

Faktori za isključivanje iz istraživanja:

1. uzrast \leq 18 godina;
2. pacijenti koji su umrli unutar tri dana od prijema u bolnicu;
3. pacijenti sa hroničnom opstruktivnom bolešću pluća;
4. pacijenti sa opstrukcijom gornjih partija respiratornog trakta;
5. pacijenti sa pneumotoraksom ili bronhopleuralnom fistulom koja se pojavila za manje od dve nedelje nakon plućne lobektomije;
6. pacijenti sa akutnom embolijom pluća;
7. pacijenti sa kardiogenim plućnim edemom;
8. pacijenti sa povećanim intrakranijalnim pritiskom;
9. pacijenti bez spontane respiracije;
10. pacijenti sa mijastenijom gravis;
11. pacijenti sa miiodistrofijom;
12. drugi uzročnici ARDS-a (sepsa, operacije, opekotine);

Kao klinički parametri uzimane su vrednosti stepena hipoksije - vrednost parcijalnog pritiska kiseonika u krvi, radiografski nalaz (prisustvo zasenčenja plućnog parenhima), indikatori inflamatornog odgovora (telesna temperatura, CRP, ukupan broj leukocita). Podaci su uzimani iz medicinske dokumentacije (istorija bolesti), u skladu sa odlukom Etičke komisije Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu, broj 1322/X-31 od 01.10.2020. Uzorci tkiva pluća uzimani su u Institutu za sudsku medicinu "Dr Milovan Milovanović" Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu, a histološki obrađeni delimično u Institutu za patologiju Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu, delimično u službi za patohistološku dijagnostiku Kliničko bolničkog centra "Zvezdara" u Beogradu. Imunohistohemijska bojenja su urađena u laboratoriji „Beo-lab“ u Beogradu.

Kontrolna grupa formirana je od pacijenata koji su umrli prirodnom smrću, uz neophodan kriterijum da su pluća bila bez akutnih i hroničnih bolesti respiratornog sistema. Kako je mali broj ovakvih pacijenata obdukovano, jer se radi o prirodnim smrtima, u kontrolnoj grupi bilo je 14 pacijenata.

3.2. Priprema uzoraka za patohistološku analizu

3.2.1. Uzorkovanje, fiksacija, hematoksilin/eozin bojenje

Od svakog ispitanika uzorkovano je po 3 isečka iz svakog plućnog krila iz zone najizraženije kongestije tkiva. Tkivo je fiksirano 24 časa u 4% formalinu, posle čega je stavljano u aparat za automatsku fiksaciju tkiva (Leica ASP6025, Leica Microsystems, Wetzlar, Germany). U aparatu se prvo vrši fiksacija rastvorom formalina koncentracije 4% na temperaturi od 37°C, nakon toga ispiranje destilovanom vodom 2 minuta, nakon čega se nastavlja dehidracija rastvorima alkohola rastućih koncentracija: etanol 70% u trajanju od 40 minuta, etanol 96% u trajanju od 40 minuta u dve izmene, etanol 100% u trajanju od 60 minuta u tri izmene, ksilol u trajanju od 60 minuta u tri izmene. Zatim se uzorci prebacuju u parafin u dve izmene u trajanju od 60 minuta, posle kojih ide jedna izmena u trajanju od 90 minuta. Temperatura parafina u aparatu je 63°C.

Aparat za kalupljenje sa hladnom pločom (Leica Histocor ARCADIA H i C, Leica Microsystems, Wetzlar, Germany) ima dva bočna odeljka, toplu ploču, rezervoar za parafin koji je zagrejan na 60°C. Radni deo tople ploče je takođe zagrejan na 60°C, oba bočna odeljka na 60°C, hladna tačka ohlađena na 10°C i hladna ploča ohlađena na -10°C.

Mrežasta korpa sa kasetama je kratko ocedena i prenesena do aparata za kalupljenje sa radnim temperaturama od 60°C. Zatim je vršeno uklapanje isečaka i to na sledeći način: iz desnog odeljka uzima se modla odgovarajuće veličine prema veličini isečka koji se planira za kalupljenje, u nju se stavlja isečak, podmeće ispod slavine za parafin i izlije odgovarajuća količina parafina tako da pokrije dno modle. Parafin se naliva pritiskom pločice iza slavine za parafin. Otpuštanjem pločice zatvara se slavina. Držeći modlu jednom rukom, drugom rukom se pincetom pritiska isečak ka dnu i postavlja na hladnu ploču. Posle oko 15 minuta kada je parafin očvrsnuo modla se okreće naopačke i kalup je formiran.

Posle toga uzorci su sečeni na rotacionom mikrotomu (Leica Histocor multicut, Leica Microsystems, Wetzlar, Germany) i dobijeni su preparati debljine 3 μm koji su zatim bojani u aparatu za automatsko bojenje tkiva (Leica autostainer XL, Leica Microsystems, Wetzlar, Germany) protokolom za hematoksilin/eozin (HE) bojenje.

Postupak bojenja u aparatu za automatsko bojenje podeljen je na 16 koraka:

1. Topljenje, 10 minuta
2. Ksilol, 2 minuta
3. Ksilol, 2 minuta
4. 100% etil-alkohol, 2 minuta
5. 96% etil-alkohol, 2 minuta
6. 70% etil-alkohol, 2 minuta
7. Ispiranje tekućom vodom, 1 minut
8. Hematoksilin, 1,5 minut
9. Ispiranje tekućom vodom, 2 minuta
10. Eozin, 4 minuta
11. Ispiranje vodom, 30 sekundi
12. 70% etil-alkohol, 30 sekundi
13. 96% etil-alkohol, 30 sekundi
14. 100% etil-alkohol, 5 minuta
15. Ksilol, 3 minuta
16. Ksilol, 3 minuta

Obojeni preparati prenesu se na sto pored kadice sa filter papirom, pamučnom krpom se briše višak ksilola, ukapa se medijum za uklapanje pločica (Biomount DPX, BioGnost, Hrvatska) - medijum srednje viskoznosti za trajno pokrivanje mikroskopskih uzoraka. Preko DPX-a stavlja se pokrovno stakalce tako da prekrije ceo presek uzorka. Medijum se razlije u tankom sloju između pločice i pokrovnog stakalca tako da ne zaostane zarobljeni vazduh između pokrovnog stakalca i pločice.

Ovako obrađeni uzorci su analizirani na svetlosnom mikroskopu (Olimpus BX 41, Japan). Za kontrolnu grupu iseći su uzimani iz svih lobusa pluća po jedan, čineći po pet isečaka od svakog pacijenta iz kontrolne grupe i obrađeni su na isti način.

3.2.2. Priprema i imunohistohemijsko bojenje IL6, IL8 i IL18

Imunohistohemijska analiza tkiva pluća bolesnika sa ARDS-om urađena je primenom Ultravision LP-HRP polymer detekcione tehnike.

Tkivni uzorci sečeni na 3 μ m i montirani na predmetna stakla, sušeni su jedan sat na 60°C u termostatu, a zatim preko noći na sobnoj temperaturi. Nakon toga uzorci su deparafinisani provođenjem kroz ksilol (2x5 min), rehidrirani u opadajućim koncentracijama etanola (100% - 2x3 min, 96% - 2x3 min i 70% - 3 min) do destilovane vode. Zatim su uzorci inkubirani u 3% rasvoru H₂O₂ u vodi, 5 minuta na sobnoj temperaturi kako bi se blokirala aktivnost endogene peroksidaze, a potom su ponovo isprani u destilovanoj vodi. Zatim je vršeno demaskiranje antigena, odnosno izlaganje visokoj temperaturi uzoraka potopljenih u odgovarajući pufer za demaskiranje (Tabela 3.2.2.1.). Nakon kuvanja u trajanju od 20 minuta na 780 W u mikrotalasnoj pećnici, uzorci se u istom puferu hlade još 20 minuta, zatim se ispiraju destilovanom vodom 5 minuta i potapaju se u TBS (TRIS buffer saline, pH 7,6). Sledi inkubacija uzoraka sa primarnim antitelom (Tabela 3.2.2.1.) u vlažnoj komori, nakon čega sledi ispiranje u TBS-u 3x3 minuta. Posle ispiranja sledi inkubacija uzoraka sa *Primary Antibody Enhancer* komponentom kita, 12 minuta na sobnoj temperaturi u vlažnoj komori. Nakon toga uzorci su isprani u TBS-u 3x3 minuta. Sledeći korak je predstavljao inkubaciju uzoraka sa *HRP Polymer* reagensom, 15 minuta na sobnoj temperaturi u vlažnoj komori uz smanjeno izlaganje svetlosti zbog fotosenzitivnosti *HRP Polymer*-a. Po završenoj inkubaciji uzorci su isprani u TBS-u 3x3 minuta. Potom su inkubirani u rastvoru mešavine supstrat-hromogen (3,3-diamino benzidin – DAB, Dako Liquid DAB+ Substrate Chromogen System, K3467), 3-5 minuta na sobnoj temperaturi. Uzorci su zatim isprani tekućom vodom i kontrastirani *Mayer*-ovim hematoksilinom jedan minut, a zatim dodatno isprani u tekućoj vodi. Nakon toga sledila je dehidracija uzoraka etanolom rastućih koncentracija (70%, 96% i 100%), nakon čega se vršilo prosvetljavanje u ksilolu, i na kraju pokrivanje odgovarajućom sintetskom smolom (DPX) i pokrovnim stakalcem.

Prisutnost ispitivanog antigena uočava se kao braon precipitat hromogena na mestu nalaženja antigena, za razliku od okolnog tkiva koje je plavo.

Kontrola kvaliteta i specifičnosti imunohistohemijske reakcije vršena je tokom samog procesa bojenja. Tokom procesa bojenja preparata paralelno se boje i „pozitivni“ i „negativni“ kontrolni uzorci za potvrdu specifičnosti i kvaliteta imunohistohemijske metode. Kao pozitivna kontrola u toku imunohistohemijskog bojenja služe uzorci tkiva za koja je ranije sigurno utvrđeno da sadrže antigene koje je moguće vizuelizovati primenjenom metodom. Ovi preseki se tretiraju na isti način kao i ispitivani tkivni uzorci. Negativnu kontrolu (kontrola reagenasa) predstavljaju tkivni uzorci na koje se umesto primarnih antitela aplikuje neimuni serum. Po završenoj obradi uzorci su analizirani na svetlosnom mikroskopu marke Olympus BX41 (Olympus, Japan), svi uzorci su analizirani na uveličanjima od 40 do 200 puta.

Tabela 3.2.2.1. Korišćena antitela i primenjeni protokoli

Primarno antitelo	Proizvođač/ Kataloški br.	Razblaženje	Pretretman	Inkubacija antitela	Kit	Proizvođač/ Kataloški br.
Anti-IL6, polyclonal	Sigma- Aldrich, SAB4301665	1:20	0,01M citratni pufer pH6, 20 min, mikrotalasna pećnica	preko noći na +4°C	Ultravision LP- HRP polymer	Thermoscientific /Cat. No. TL- 125-HL
Anti-IL8, polyclonal	Sigma- Aldrich, HPA057179	1:100	0,01M citratni pufer pH6, 20 min, mikrotalasna pećnica	preko noći na +4°C	Ultravision LP- HRP polymer	Thermoscientific /Cat. No. TL- 125-HL
Anti-IL18, polyclonal	Sigma- Aldrich, HPA003980	1:500	0,01M citratni pufer pH6, 20 min, mikrotalasna pećnica	60 min na sobnoj T	Ultravision LP- HRP polymer	Thermoscientific /Cat. No. TL- 125-HL
Mo mouse CD8, Clone 4B11	Leica, CD8-4B11- L-CE	1:50	Epitope retrieval solution pH9, 20 min, mikrotalasna pećnica	30 min na sobnoj T	Ultravision LP- HRP polymer	Thermoscientific /Cat. No. TL- 125-HL
Mo mouse MUC-1 Glycoprotein, Clone Ma695	Leica, MUC1-CE	1:100	Epitope retrieval solution pH9, 20 min, mikrotalasna pećnica	60 min na sobnoj T	Ultravision LP- HRP polymer	Thermoscientific /Cat. No. TL- 125-HL
Mo mouse CK, Clone AE1/AE3	Leica, AE1/AE3-L- CE	1:100	0,01M citratni pufer pH6, 20 min, mikrotalasna pećnica	30 min na sobnoj T	Ultravision LP- HRP polymer	Thermoscientific /Cat. No. TL- 125-HL
Mo mouse von Willebrand Factor, Clone 36B11	Leica, VWF-L-CE	1:200	0,01M citratni pufer pH6, 20 min, mikrotalasna pećnica	60 min na sobnoj T	Ultravision LP- HRP polymer	Thermoscientific /Cat. No. TL- 125-HL
Mo mouse Beta Catenin, Clone 17C2	Leica, B-CAT-L-CE	1:100	Epitope retrieval solution pH9, 20 min, mikrotalasna pećnica	60 min na sobnoj T	Ultravision LP- HRP polymer	Thermoscientific /Cat. No. TL- 125-HL
Mo mouse E- cadherin, Clone 36B5	Leica, E-CAD-L- CE	1:25	Epitope retrieval solution pH9, 20 min, mikrotalasna pećnica	60 min na sobnoj T	Ultravision LP- HRP polymer	Thermoscientific /Cat. No. TL- 125-HL

3.3. Priprema uzoraka za transmisiju elektronsku mikroskopiju

3.3.1. Priprema uzoraka i kalupljenje

Za potrebe analize ultrastrukturnih promena od svakog ispitanog slučaja uziman je po jedan isečak. Uzorkovano tkivo fiksirano je prvo 24 sata u 3% rastvoru glutaraldehida na +4°C. Posle fiksacije uzorak se ispira tri puta u kakodilatnom puferu (pH 7.3) kako bi se uklonio ostatak glutaraldehida. Zatim se naliva 1% rastvorom osmijum tetroksida u kakodilatnom puferu i ostavlja na +4°C tokom jednog sata. Uzorci se zatim ponovo tri puta ispiraju kakodilatnim puferom i nalivaju vodenim rastvorom uranil-acetata radi dodatnog kontrastiranja. Uzorci se u uranil-acetatu ostavljaju preko noći na +4°C. Sledećeg dana destilovanom vodom se uklanja višak uranil-acetata. Potom se vrši postepena dehidratacija rastućim koncentracijama etil alkohola (50%, 70%, 96%) na temperaturi od +4°C, zatim 100% etanolom i propilen-oksikom na sobnoj temperaturi. Po završenoj dehidrataciji, uzorci se nalivaju mešavinom epoksi smola (Epoxy Embedding Medium kit, 45345, Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) i propilen oksida u odnosu 1:3 i ostavljaju preko noći. Poslednjeg dana kalupljenja vrši se odlivanje mešavine propilen-oksida i smola i naliva se svežom mešavinom odnosa 1:1. Ovako spremljeni uzorci ostavljaju se na sobnoj temperaturi 3 sata. Po isteku ovog vremena odliva se višak smole, obeležavaju se uzorci, nalivaju se mešavinom smola bez propilen-oksida i stavljaju na pečenje na 60°C narednih 48 sati.

3.3.2. Sečenje i kontrastiranje mrežica

Kada je završeno kalupljenje, uzorci su sečeni na ultramikrotomu (Leica UltraCut UCT, Leica Microsystems, Wetzlar, Germany) staklenim nožem i analizirani na svetlosnom mikroskopu. Kada se odredi region od značaja, označava se i trimuje dalje do piramide. Kada je formirana željena piramida uzima se dijamantski nož (16DIA.DU4530, DiATOME, Hatfield, PA, USA) i kalup se seče na debljinu od 70 nm. Dobijeni ultra-tanki isecci se zatim hvataju na bakarne mrežice (G4901, Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) i ostavljaju da se osuše. Kada se osuše, vrši se kontrastiranje mrežica uranil-acetatom i olovo citratom. Nakon kontrastiranja mrežica, tkivo je analizirano na transmisivnom elektronskom mikroskopu (Morgagni 268D, FEI, Hillsboro, OR). Obrada tkiva za elektronsku mikroskopiju, kao i analiza dobijenih isečaka obavljena je u Institutu za histologiju i embriologiju "Dr Aleksandar Đ. Kostić" Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu.

3.4. Statistička analiza

Za obradu dobijenih rezultata korišćen je SPSS program (Chicago, Illinois, SAD). Korišćen je Studentov t-test i Pearson-ov koeficijent korelacije. Vrednost p manje od 0,05 je tumačena kao statistički značajna, a vrednost p manja od 0,01 kao statistički visoko značajna razlika.

4. REZULTATI

4.1. Karakteristike ispitanika

Za potrebe ovog eksperimenta uzorci su prikupljeni od dve grupe pacijenata. Prva grupa koja čini uzorak su pacijenti hospitalizovani u Urgentnom centru Univerzitetskog kliničkog centra Srbije nakon zadobijanja višestrukih povreda nastalih delovanjem mehaničke sile. Pacijenti koji su ispunili kriterijume povređeni su kao pešaci u saobraćaju. Hospitalizacija je trajala različito (1-35 dana) tokom koje su svi razvili akutni respiratorni distres sindrom i završili sa letalnim ishodom. Povrede su višestruke kod svih pacijenata, ali morale su isključiti povredu grudnog koša prema kriterijumima za ulazak u studiju. Pacijenti su imali zasenčenja obostrano na opisanim rendgenskim snimcima i prema vrednostima gasnih analiza ispunili kriterijume za ventilatornu potporu. Pacijenti koji su zadovoljili kliničke kriterijume za ARDS su imali višestruke povrede koštano-zglobnog sistema, sa razvojem dispneje i hiperkapnije tokom hospitalizacije, pogoršanjem opšteg stanja i smrtnim ishodom. Starost pacijenata u grupi ispitanika je bila od 19 do 92 godine. U kontrolnoj grupi pacijenata radi se o licima koja su preminula prirodnom smrću. Starost pacijenata u kontrolnoj grupi bila je od 46 do 85 godina. Kod ove grupe ispitanika kriterijumi za uključivanje su bili da pluća nisu oštećena bio kakvom mehaničkom traumom, niti da su pacijenti lečeni od hroničnih i akutnih plućnih bolesti. Ovim licima rađena je klinička obdukcija i s obzirom na to da se radi o prirodnoj smrti, uključujući i ostale kriterijume, kontrolnu grupu čini 14 pacijenata. U tabeli 4.1.2 prikazani su podaci o pacijentima kontrolne grupe i grupe uzoraka (tabela 4.1.1.), sa kliničkim detaljima koji su prikupljeni.

Tabela 4.1.1. Prikaz kliničkih podataka, pol, starost i dužina hospitalizacije - grupa ispitanika

Rb	Pol M/ Ž	Godine života	Dužina trajanja hospitalizacije u danima	Masa pluća levo [g]	Masa pluća desno [g]	Broj Leu*	Broj Gr*	PaO ₂ [mmHg]	PaCO ₂ [mmHg]	Saturacija O ₂
1	Ž	74	25	550	690	5.2	33.2	14.3	4.52	98.6
2	M	35	4	570	760	12.6	85	16	5.4	97
3	M	61	9	1020	1130	12.1	94.1	10.8	4.3	94
4	Ž	50	3	920	970	16.8	84	17.7	5.24	98
5	M	22	2	950	1050	25.1	84	10.8	7.92	99
6	M	44	4	1090	1220	23.1	91.1	6.85	4.2	91.6
7	M	32	3	1390	1100	13	82	11.2	5.6	94
8	M	44	5	1390	1300	12,3	92	17.7	4,88	99
9	M	28	2	1050	950	17	90	10.6	4.6	97
10	M	54	5	1560	1770	6,6	70	18.9	5.07	99
11	M	41	7	550	600	17	82.1	11.2	3.36	96.2
12	M	58	10	570	750	19.5	90	17.7	5.24	98.8
13	M	56	10	810	860	19.8	80.8	14.7	5.46	98.9
14	M	72	7	520	680	15.9	78.4	15.6	4.22	99
15	M	49	5	630	930	11.4	84	10.8	4,35	94.6
16	M	41	6	900	490	16.4	84	16.2	6.5	95
17	M	63	18	950	930	23.1	75	36.4	6.68	99
18	Ž	26	13	800	980	18.2	88	14.5	4.32	99
19	M	35	3	960	1000	16.8	92	17.6	5.2	95
20	Ž	62	3	780	1090	15.7	75	17	6.2	99
21	M	19	1	900	1080	15.1	91.3	9.4	8.97	99
22	M	64	32	700	880	5.2	33.2	14.3	4.53	98.6
23	M	39	6	1300	1400	19.6	80.8	6.85	4.2	91.6
24	M	74	35	810	810	23.1	70.2	20.9	4.96	98
25	Ž	21	5	880	980	18.2	70.2	6.85	4.2	91.6
26	Ž	70	8	480	840	11.4	84	6.94	7.52	91.3
27	Ž	92	9	520	580	17	82.1	52.8	3.2	99
28	Ž	55	20	590	830	12	94.1	10.8	4.3	94
29	M	66	1	700	840	13.7	82	12.8	5.7	94
30	M	72	1	560	780	13.3	83.7	11.9	6.14	97
31	Ž	69	2	600	620	23.1	75	19.8	5.14	99
32	Ž	60	1	540	550	11.8	74.2	17.5	2.32	99
33	M	41	5	820	880	12.2	93	67.4	8.97	99
34	M	75	5	580	740	12.5	75	12.8	4.01	97
35	M	49	3	1090	1250	14	85	21.8	4.6	99

*Leu – leukocita, Gr - granulocita

Tabela 4.1.2. Prikaz kliničkih podataka pol, starost, dužina trajanja hospitalizacije - grupa kontrola

Rb	Pol M/Ž	Godine života	Dužina trajanja hospitalizacije u danima	Masa pluća levo [g]	Masa pluća desno [g]
1	M	68	26	270	300
2	M	54	13	300	320
3	M	84	5	300	350
4	M	85	1	280	310
5	M	77	1	320	350
6	M	81	22	400	350
7	M	76	2	350	300
8	M	46	2	300	310
9	Ž	81	2	350	370
10	M	64	17	320	350
11	Ž	71	3	300	350
12	M	73	12	290	320
13	Ž	79	1	380	400
14	Ž	60	2	350	370

Makroskopski nalaz na plućima koji je bio kriterijem za postojanje ARDS-a obuhvatao je masu, zone kongestije i konsolidacije pluća. Kod svih ispitanika iz grupe uzoraka masa pluća je bila iznad fizioloških granica i kretala se od 480-1390 g za levo plućno krilo i 490-1770g za desno, dok je u grupi kontrola masa pluća bila u opsegu od 270-400 g za levo i u opsegu 300-400 g za desno plućno krilo. U tabelama dalje u tekstu prikazane su srednje vrednosti i vrednosti standardnih devijacija za ispitivane parametre u grupi ispitanika (tabela 4.1.3.) i za ispitivane u grupi kontrola (4.1.4.)

Tabela 4.1.3. Srednje vrednosti i standardne devijacije ispitivanih vrednosti u grupi ispitanika

		Srednja vrednost	Standardna devijacija
1	Godine	60,5	18,16061
2	Masa levog plućnog krila	726,4286	235,9468
3	Masa desnog plućnog krila	855,7143	234,6426
4	IL-6	2,214286	0,974961
5	IL-8	1,428571	0,755929
6	IL-18	1,428571	1,01635

Tabela 4.1.4. Srednje vrednosti i standardne devijacije ispitivanih vrednosti u grupi kontrola

		Srednja vrednost	Standardna devijacija
1	Godine	71,357	11,718
2	Masa levog plućnog krila	322,1429	38,466
3	Masa desnog plućnog krila	339,2857	29,99
4	IL-6	1,35714	0,497245
5	IL-8	0,142857	0,363137
6	IL-18	0,571428	0,937614

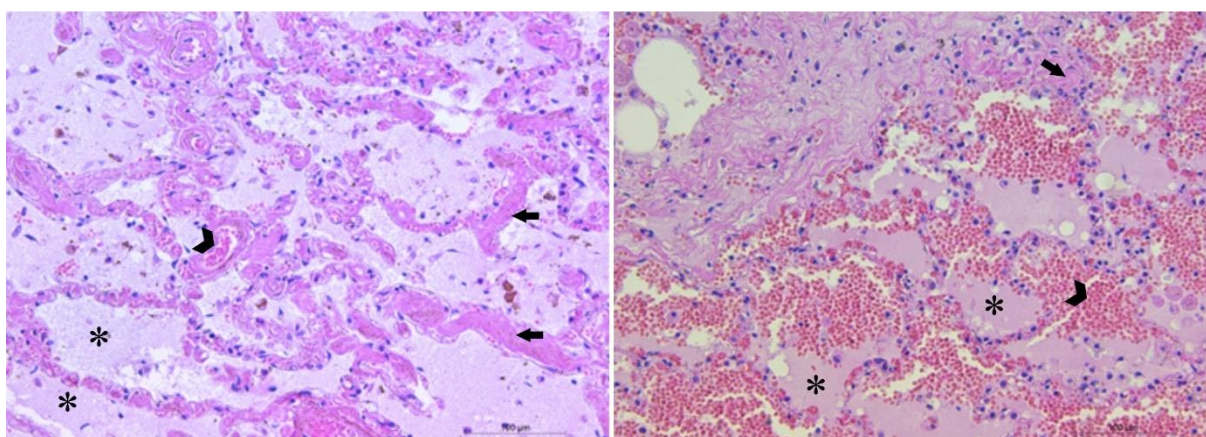
4.2. Histološka analiza

Tokom perioda prikupljanja uzoraka, kriterijum za ulazak u grupu ispitanika ispunilo je 35 pacijenata. Prema metodologiji uzimanja uzoraka za analizu od svakog pacijenta je uzeto po 6 (šest) isečaka tkiva pluća iz zona makroskopski suspektnih na ARDS. U grupi ispitanika sa ARDS-om ukupno je pregledano 210 preseka tkiva pluća bojenih HE metodom. U grupi kontrola isečci su uzimani prema prethodno određenoj metodologiji za uzorkovanje materijala i za 14 pacijenata kontrole pregledano je 70 preseka tkiva pluća.

U grupi ispitanika svi pacijenti su ispunili histološke kriterijume za prisustvo ARDS-a. U analizi svaki pacijent je imao 6 HE preseka. U pregledanom materijalu od ukupno 210 preseka u 186 je bila prisutna kongestija, u 150 hijaline membrane, u 67 difuzno alveolarno oštećenje, u 160 zone krvarenja, u 140 prisutan mešoviti zapaljenski infiltrat i u 200 je bio prisutan alveolarni edem. S obzirom na to da je analiza rađena na autopsijskom materijalu, neophodno je bilo izvršiti identifikaciju vijabilnih ćelijskih elemenata. U tu svrhu je korišćeno bojenje na Citokeratin (citokeratin - CK), gde je očuvana pozitivnost u epitelnom sloju i nakon letalnog ishoda. Kao markeri endotelnog oštećenja upotrebljena su imunohistohemijska bojenja na faktor VIII, E-kadherin i β -katenin. Za identifikaciju klase limfocita za koje smo pretpostavili da imaju ulogu u produkciji interleukina primenili smo imunohistohemijsko bojenje na CD8, a za dokazivanje epitelnog oštećenja KL-6/MUC1.

Tabela 4.2.1. Distribucija histoloških nalaza karakterističnih za ARDS u ispitanom uzorku.

Ukupno preseka	Kongestija	Hijaline membrane	Difuzno alveolarno oštećenje	Zone krvarenja	Mešoviti zapaljenski infiltrat	Alveolarni edem
210	186	150	67	160	140	200

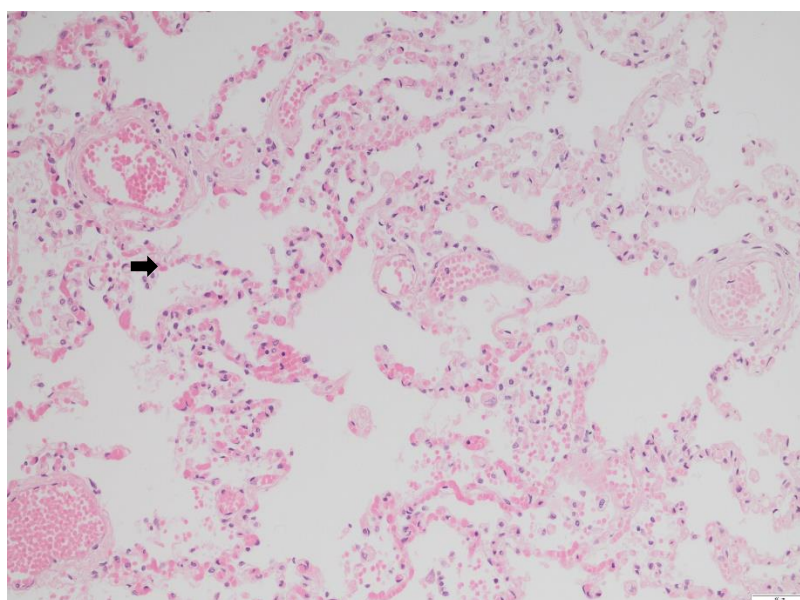


Slika 4.2.1. Isečci tkiva pluća iz uzorka pacijenata sa ARDS-om. U ispitivanim uzorcima uočen je izražen intraalveolarni edem (zvezdica), kongestija (vrh strelice) i hijaline membrane (strelica). Uveličanje 20x

U kontrolnoj grupi histološku sliku, na pregledanih 70 HE preseka, karakterisale su sledeće histološke promene: u 70 hronična pasivna hiperemija u akutizaciji, u 50 kompezatorni emfizem, u 45 zadebljanje intime ogranaka arterije pulmonalis i u 5 preseka polja kolapsa alveola.

Tabela 4.2.2. Distribucija histoloških nalaza u grupi kontrola.

Ukupno preseka	Hronična pasivna hiperemija	Kompenzatorni emfizem	Zadebljanje ogranaka arterije pulmonalis	Polja kolapsa alveola
70	70	50	45	5



Slika 4.2.3. Isečak iz tkiva pluća iz kontrolne grupe. U uzorcima tkiva pluća iz kontrolne grupe bila je prisutna akutna pasivna hiperemija (strelica). Uveličanje 20x

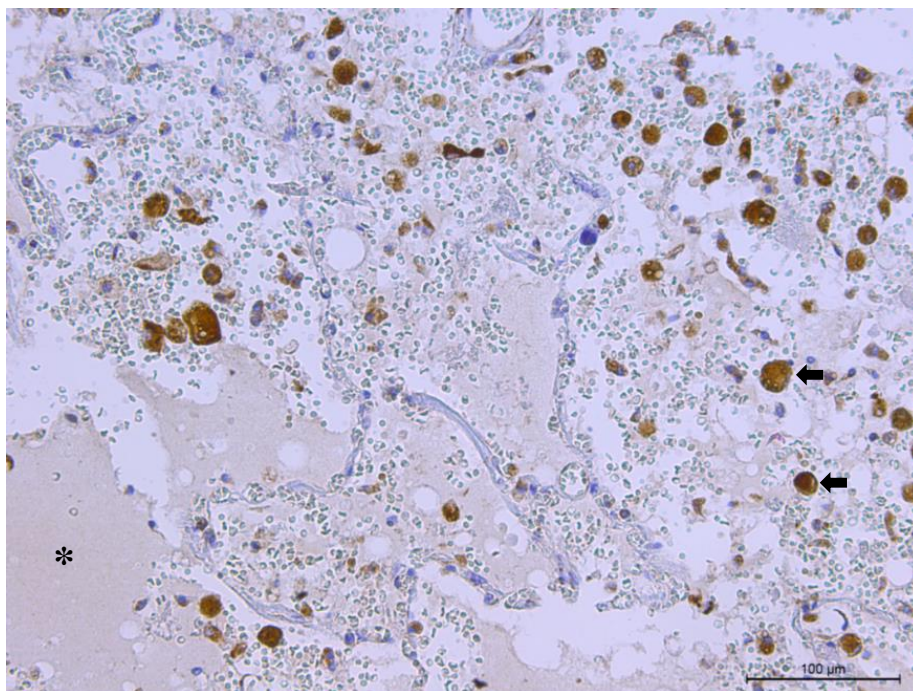
4.3. Analiza prisustva IL6

Od pregledanih uzoraka bojenih HE metodom iz obe grupe, izabrani su reprezentativni preseči za imunohistohemijsko bojenje na IL6. Za pozitivno bojenje smatrana je braon obojena citoplazma ćelija koje proizvode IL6. Analizom imunohistohemijskih obojenih uzoraka dobijeni su rezultati prikazani u tabeli 4.3.1.

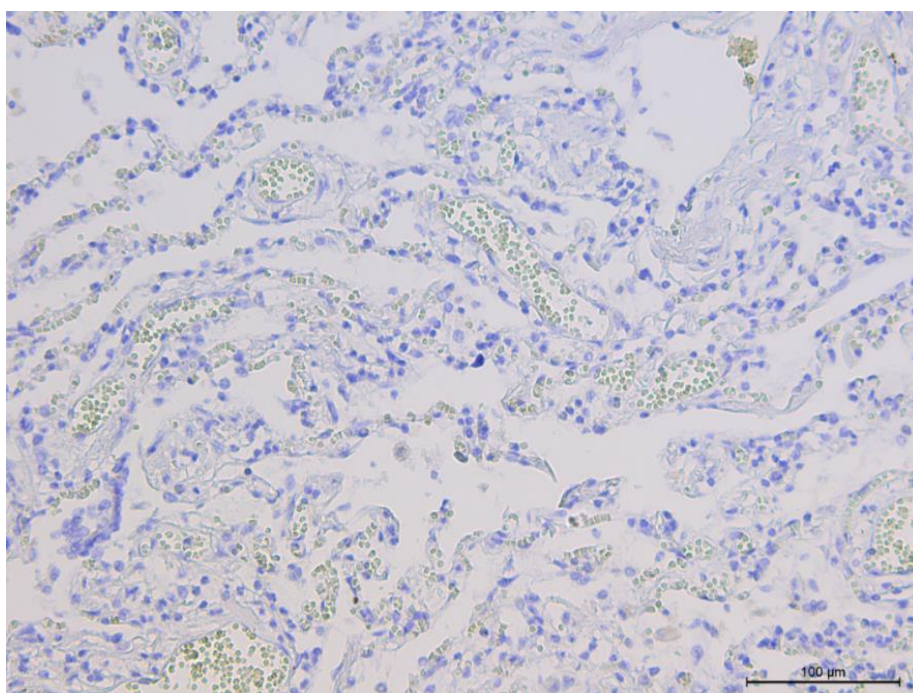
Tabela 4.3.1. Pozitivnost imunohistohemijskog bojenja na IL6

Grupa ispitanika	Veličina uzorka	Negativno 0	Fokalno pozitivno 1	Umereno pozitivno 2	Difuzno pozitivno 3
Uzorak	35	2	2	4	27
Kontrola	14	0	9	5	3

Za statističku analizu dobijenih rezultata prisustva IL-6 u tkivu pluća umrlih od ARDS-a korišćen je Studentov t-test. U grupi pacijenata umrlih od ARDS-a pozitivnost na IL6 ($2,21 \pm 0,98$) je bila statistički visoko značajno veća u odnosu na kontrolnu grupu ($1,37 \pm 0,49$; $p < 0,01$).



Slika 4.3.1. Pozitivno bojenje u uzorcima umrlih od ARDS-a. Vide se makrofagi (strelice) u kojima je vidljiva citoplazmatska pozitivnost na IL6. Prisutan je i alveolarni edem (zvezdica)



Slika 4.3.2. Negativno bojenje na IL6 u kontroli

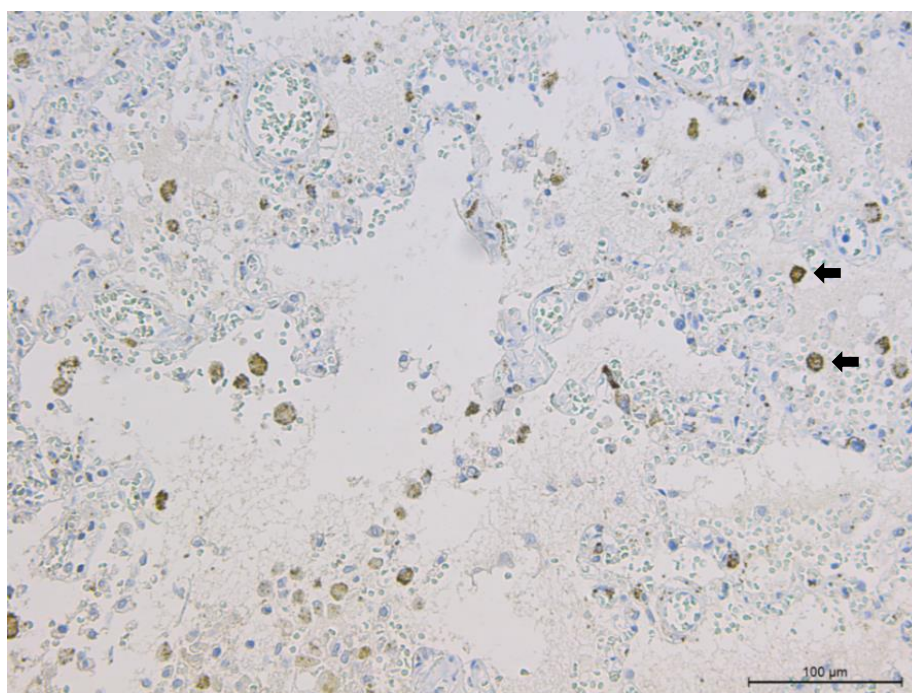
4.4. Analiza prisustva IL8

Pozitivno bojenje na IL8 je vidljivo kao braon obojena citoplazma zrelih granulocita. Analizom imunohistohemijski obojenih uzoraka dobijeni su rezultati prikazani u tabeli 4.4.1.

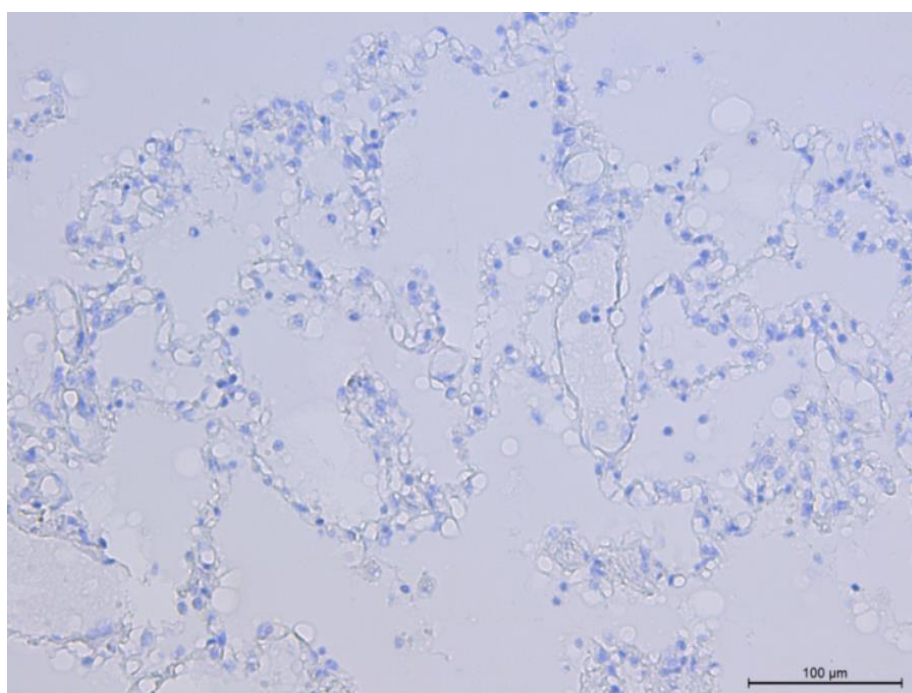
Tabela 4.4.1. Pozitivnost imunohistohemijskog bojenja na IL8

Grupa ispitanika	Veličina uzorka	Negativno 0	Fokalno pozitivno 1	Umereno pozitivno 2	Difuzno pozitivno 3
Uzorak	35	5	8	11	11
Kontrola	14	12	2	0	0

Statističkom analizom dobijenih rezultata prisustva IL-8 u tkivu pluća umrlih od ARDS-a ($1,43 \pm 0,76$) dobijena je statistički visoko značajna razlika u odnosu na kontrolnu grupu ($0,14 \pm 0,36$; $p < 0,01$).



Slika 4.4.1. Pozitivno bojenje na IL8 u tkivu pluća obolelih od ARDS-a. Vide se zreli granulociti u kojima je vidljiva citoplazmatska pozitivnost na IL8 (strelice).



Slika 4.4.2. Negativno bojenje na IL8 u kontrolnim uzorcima

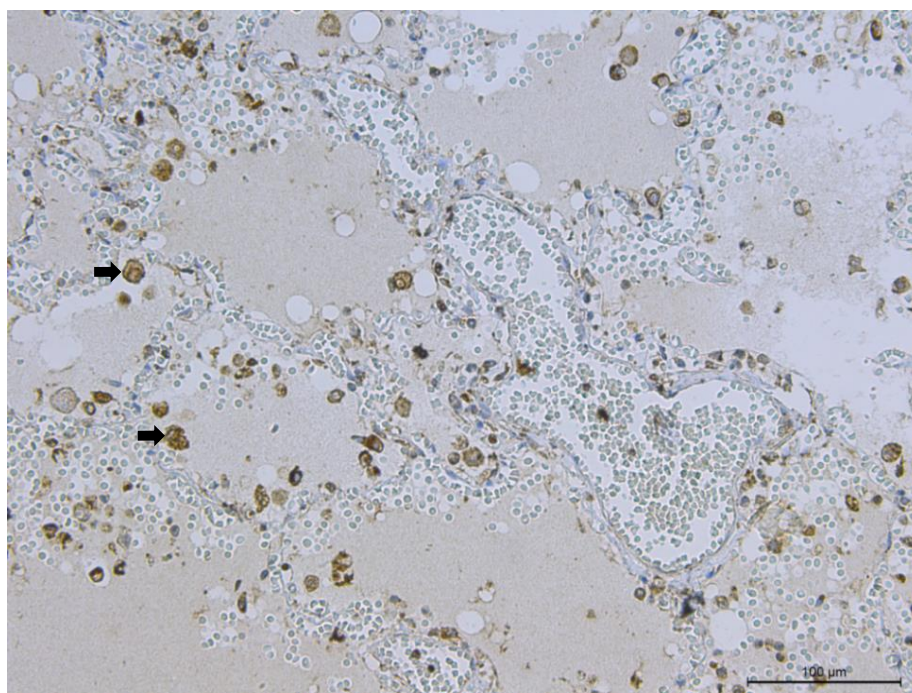
4.5. Analiza prisustva IL18

Pozitivno bojenje na IL18 je vidljivo kao braon obojena citoplazma u alveolarnim makrofagima. Analizom imunohistochemijski obojenih uzoraka dobijeni su rezultati prikazani u tabeli 4.5.1.

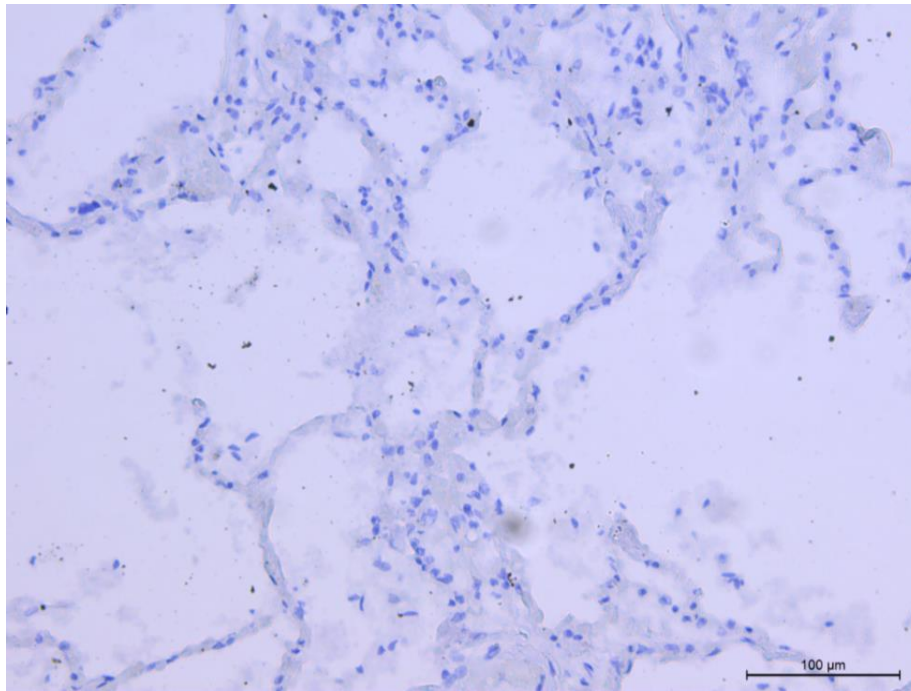
Tabela 4.5.1. Pozitivnost imunohistochemijskog bojenja na IL18

Grupa ispitanika	Veličina uzorka	Negativno 0	Fokalno pozitivno 1	Umereno pozitivno 2	Difuzno pozitivno 3
Uzorak	35	5	2	11	15
Kontrola	14	10	0	4	0

Analizom podataka dobijenih za imunopozitivnost IL18 u tkivu pluća umrlih od ARDS-a ($1,43 \pm 1,02$) takođe je dobijena statistički visoko značajna razlika u pozitivnosti u odnosu na kontrolnu grupu ($0,57 \pm 0,93$; $p < 0,01$).



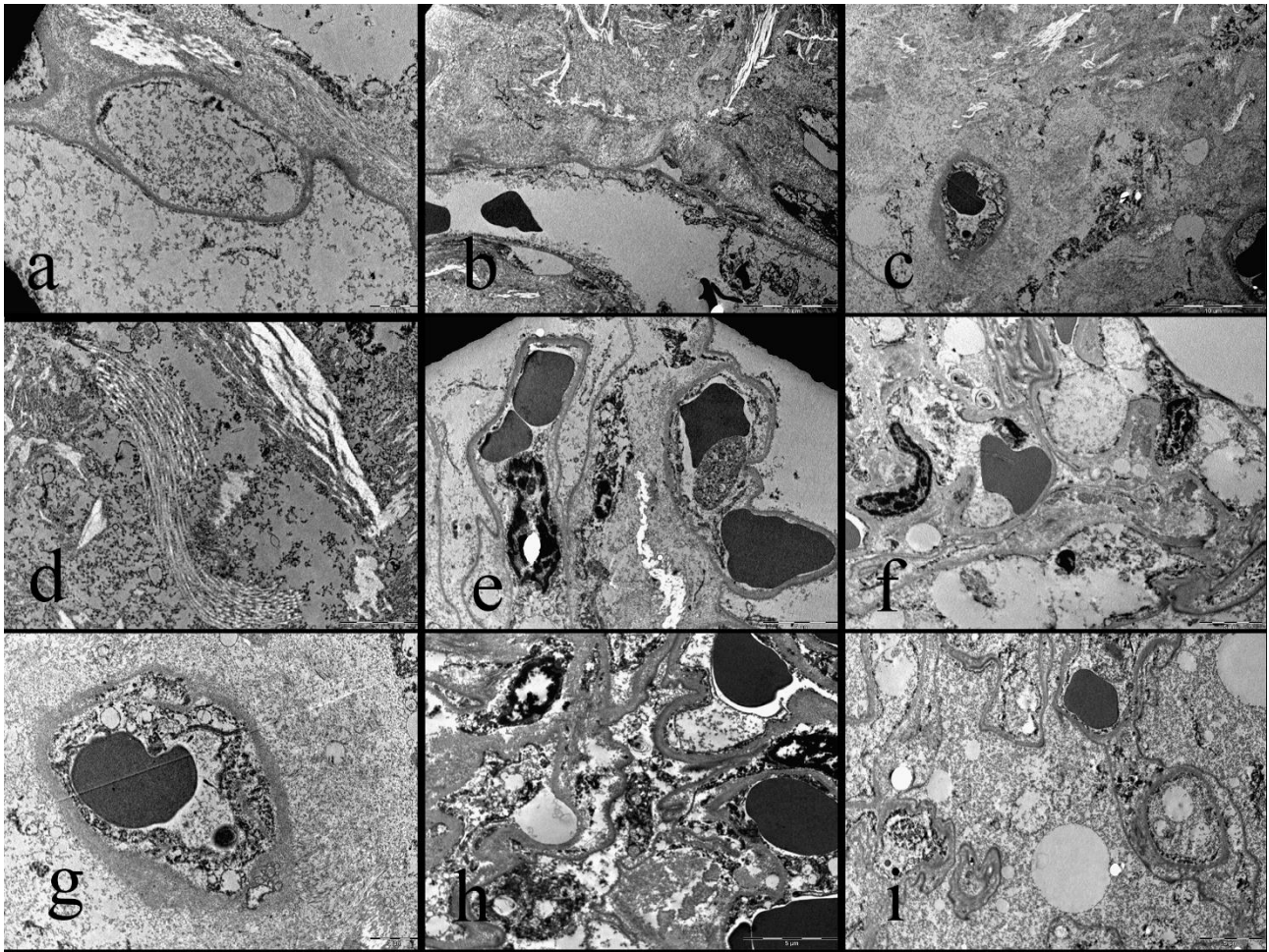
Slika 4.5.1. Pozitivno bojenje u uzorku ispitivanih pacijenata umrlih od ARDS-a. U alveolama se uočavaju alveolarni makrofagi u kojima je vidljiva citoplazmatska pozitivnost na IL18 (strelice).



Slika 4.5.2. Negativno bojenje u kontrolnim uzorcima.

4.6 Ultrastrukturna analiza

Analiza pluća pacijenata umrlih pod kliničkom slikom ARDS-a transmisivnim elektronskim mikroskopom pokazala je da su u alveolarnom prostoru prisutni edem i hijaline membrane (Slika 4.6.1. h, i). Hijaline membrane su bile homogene strukture i pružale su se duž i delimično prekrivale ogoljenu bazalnu membranu alveolarnog epitela. U najvećem broju uzoraka pluća obolelih od ARDS-a alveolarne epitelne ćelije su nedostajale ili su bile nekrotične (Slika 4.6.1. a). Uočena su izolovana polja kolagenih vlakana, ali nije primećena očigledna proliferacija fibroblasta (Slika 4.6.1. b, c, d). U jedrima pojedinih alveolarnih epitelnih ćelija uočena je kondenzacija i fragmentacija hromatina, odnosno uočene su karakteristike ćelija u apoptozi (Slika 4.6.1. e, f). Endotelne ćelije kapilara su, takođe, bile nekrotične, a endotelna bazalna membrana je bila zadebljana (Slika 4.6.1. g). U kontrolnim uzorcima očuvana je ultrastruktura ćelija alveolarnog epitela tipa I i II i endotelnih ćelija.

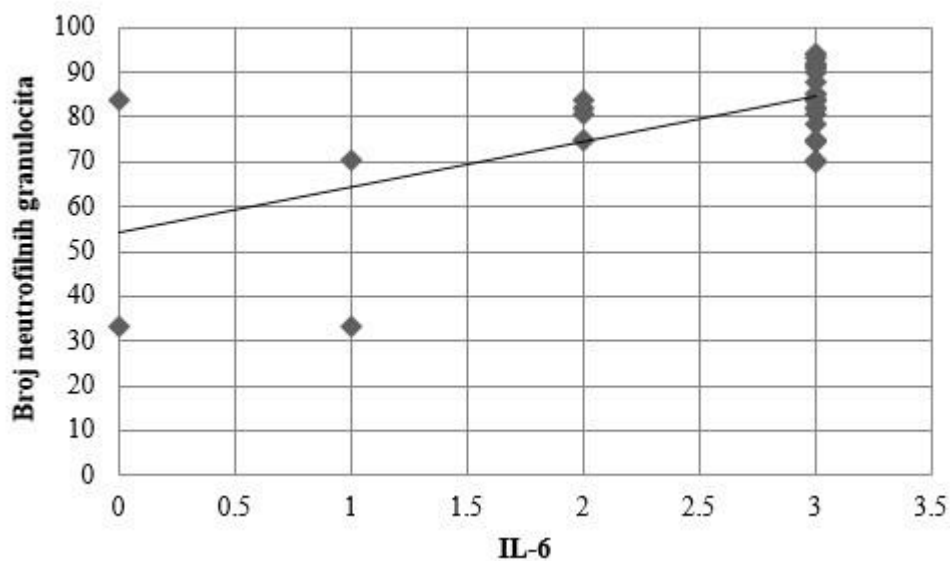


Slika 4.6.1. TEM analiza uzorka pluća sa ARDS-om. (a) Nekrotične alveolarne epitelne ćelije; (b, c, d) Izolovane oblasti kolagenih vlaknina; (e, f) Alveolarne epitelne ćelije u apoptozi; (g) Nekrotične endotelne ćelije kapilara sa zadebljanom bazalnom membranom; (h) Hijaline membrane u alveolama; (i) Alveolarni edem. Uveličanja od 2800x-5600x

4.7. Korelacija imunohistohemijske ekspresije IL6, IL8 i IL18 sa godinama života

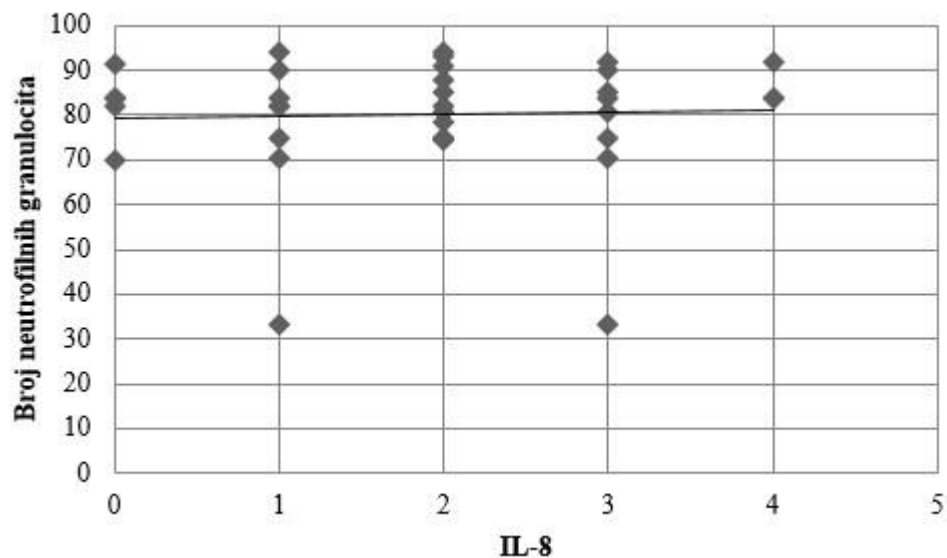
U ovom istraživanju vrednosti imunopozitivnosti ćelija na IL6, IL8 i IL18 korelirane su sa godinama pacijenata i brojem neutrofilnih granulocita. Pirsonov koeficijent korelacije pokazao je negativnu korelaciju između godina života i prisustva sva tri ispitivana interelukina u tkivu. Za broj neutrofilnih granulocita Pirsonov koeficijent korelacije je pokazao statistički značajnu pozitivnu korelaciju između broja neutrofilnih granulocita i pozitivnosti na IL18, dok sa druga dva ispitivana interleukina ne postoji statistički značajna korelacija.

Intezitet bojenja IL6 nema statistički značajne korelacije sa brojem neutrofilnih granulocita ($r = 0,6303$, $p > 0,05$).



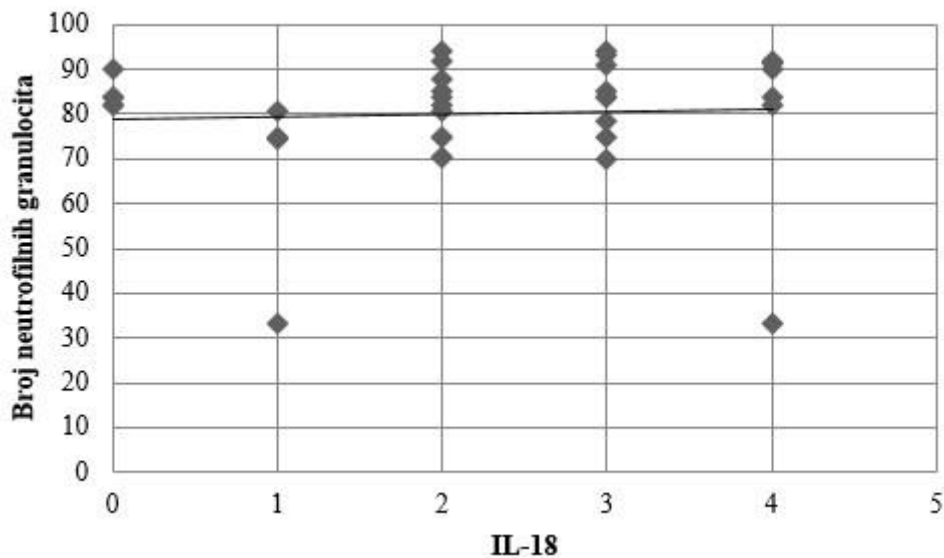
Grafik 4.7.1. Korelacija intenziteta bojenja IL-6 i broja neutrofilnih granulocita, $p > 0,05$.

Intezitet bojenja IL8 statistički značajno korelira sa brojem neutrofilnih granulocita ($r = 0,0329$, $p < 0,05$).



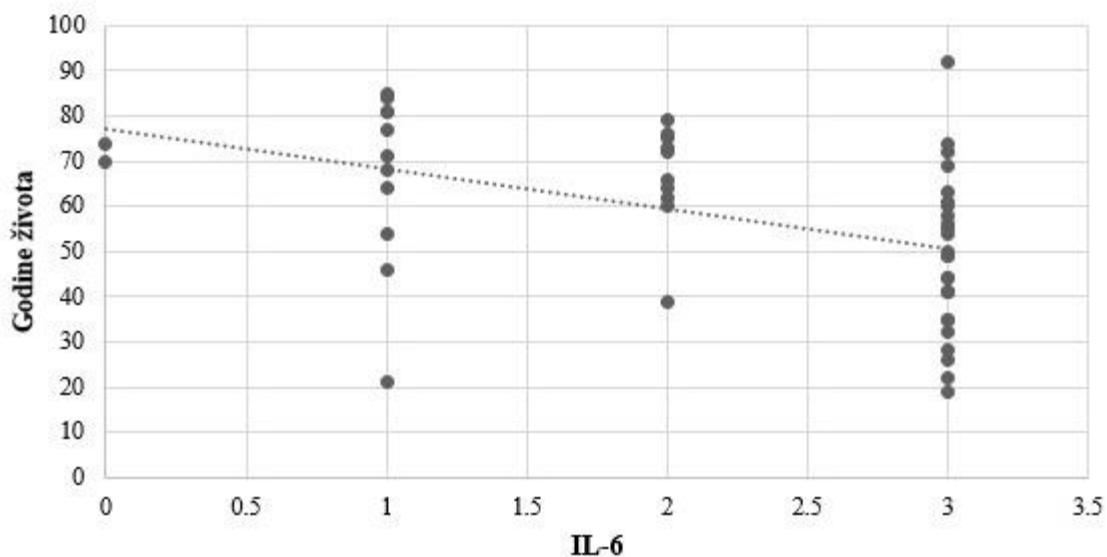
Grafik 4.7.2. Korelacija intenziteta bojenja IL-8 i broja neutrofilnih granulocita ($r = 0,0329$, $p < 0,05$).

Intezitet bojenja IL18 nema statistički značajnu korelaciju sa brojem neutrofilnih granulocita ($r = 0,05306$, $p > 0,05$).



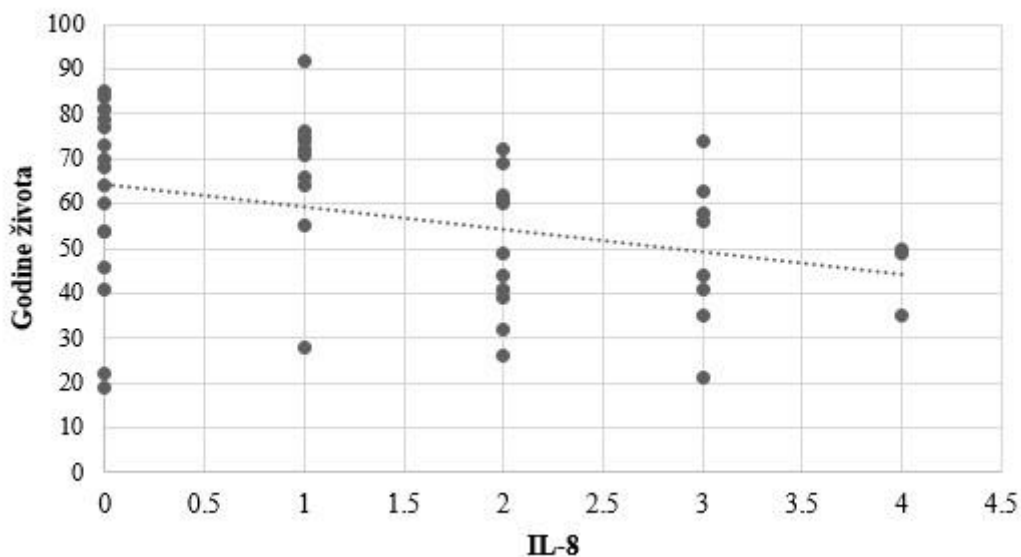
Grafik 4.7.3. Korelacija intenziteta bojenja IL-18 i broja neutrofilnih granulocita, $p > 0,05$.

Intezitet bojenja IL6 negativno korelira sa godinama života ispitivanih osoba ($r = -0,4517$, $p < 0,01$).



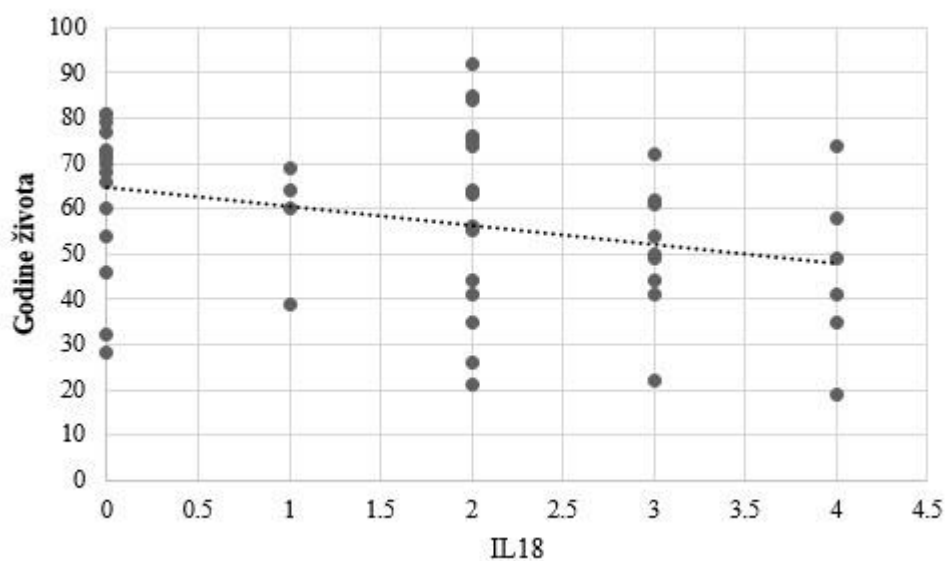
Grafik 4.7.4. Korelacija intenziteta bojenja IL-6 i godina života ($r = -0,4517$, $p < 0,01$).

Takođe i intezitet bojenja IL8 negativno korelira sa godinama života ispitivanih osoba ($r = -0,35271$, $p < 0,01$).



Grafik 4.7.5. Korelacija intenziteta bojenja IL-8 i godina života ($r = -0,35271$, $p < 0,01$).

Naposletku i intezitet bojenja IL18 negativno korelira sa godinama života ispitivanih osoba ($r = -0,3155$, $p < 0,01$).



Grafik 4.7.6. Korelacija intenziteta bojenja IL-18 i godina života ($r = -0,3155$, $p < 0,01$).

5. DISKUSIJA

Etiološki faktori koji su dovedeni u vezu sa nastankom i razvojem ARDS-a kod odraslih su raznovrsni i najčešće su klasifikovani u dve grupe: direktne - pneumonija, aspiracija gastričnog sadržaja, kontuzija pluća, inhalaciona plućna povreda, reperfuzioni plućni edem i indirektne - sepsa, politrauma, kardiopulmonalni bajpas, akutni pankreatitis, zloupotreba opijata (7, 60, 61).

Posle više od 25 godina od kada je prvi put opisan, ARDS sve vreme okupira pažnju lekara intenzivne nege, ali i pored pokušaja pronalaženja sve preciznijih definicija i dijagnostičkih kriterijuma, kao i primene novih terapijskih protokola u jedinicama intenzivne nege, ARDS ostaje u vrhu medicinskih misterija. Beleži smrtnost od oko 50% obolelih (u pojedinačnim studijama objavljeni su podaci gde je smrtnost iznosila 10-90%) (14, 25, 62). U odsustvu jasnih biomarkera za dijagnostiku, terapiju i prognozu, lečenje ARDS-a ostaje sa skromnim rezultatima (68).

Kako još uvek nije ustanovljen precizan dijagnostički algoritam i s obzirom na kompleksnu patofiziologiju poremećaja, poseban izazov je objašnjenje mehanizama evolucije progresivnog pogoršanja plućne funkcije.

Različiti autori su predložili potencijalne biomarkere - citokine, interleukine koji se mogu dovesti u vezu sa pokretanjem imunološkog odgovora koji za posledicu imaju smanjenje plućne komplijanse (1, 7, 14). Za neke od navedenih medijatora zapaljenja sa visokom verovatnoćom se može pretpostaviti da su uključeni u patogenezu ARDS-a (46, 48).

Vrsta eksperimenta koji smo radili u ovom istraživanju - određivanje imunoekspresije IL6, 8 i 18 u tkivu pluća obdukovanih umrlih od ARDS-a, bio je izazov na više načina.

Ova studija je rađena na autopsijskom materijalu i imala je za cilj da utvrdi eventualno prisustvo ispitivanih interleukina, ali i da ispita kvalitet informacija koje se dobijaju analizom materijala na kojem je vršen eksperiment. Sve odbukcije su izvršene u roku od 48 sati od nastupanja smrti.

Makroskopskim pregledom pluća ispitivanih pacijenata umrlih od ARDS-a nađena su polja kongestije, pluća su bila povećane mase. U grupi ispitanika pacijenata umrlih od ARDS-a srednja vrednost mase pluća iznosila je 726 g za levo i 825 g za desno plućno krilo, dok su za grupu kontrola te vrednosti bile 322 g za levo i 339 g za desno plućno krilo. Ovakav nalaz mase pluća je u skladu sa kliničkom dijagnozom akutnog respiratornog distresa i očekivan je, s obzirom na to da je edem jedan od patoloških činilaca ARDS-a, pa je samim tim i masa očekivano veća. Takođe, naš nalaz je u saglasnosti sa objavljenim rezultatima drugih autora koji su se bavili očekivanom masom organa post mortem (83). Milona i sar. su 2012. objavili rad sa prikazanom očekivanom masom organa kod muškaraca i žena. U njihovom radu opseg normalne mase plućnog krila je 155-720 g za desno i 112-675 g za levo plućno krilo (83). Pluća obdukovanih kod umrlih od ARDS-a makroskopski su bila uvećana, napete površine, sjajna, voluminozna, sa zonama kongestije i edemskom tečnošću koja se slivala iz parenhima na mestu reza, za razliku od izgleda pluća obdukovanih iz grupe kontrola. Pluća ovih pacijenata bila su ružičaste boje, na preseku bez prisustva edemske tečnosti, smeđe boje parenhima. Ovakav opis pluća kod ARDS-a među prvima je dao Ashbaugh jos davne 1967. godine (4).

Raskidanost kontinuiteta alveolarnog epitela i endotela kapilara je očekivan nalaz kod ARDS-a, međutim kako bi bio pokazatelj patoloških promena, neophodno je bilo da u uzorcima iz kontrolne grupe ovaj kontinuitet ostane očuvan. Upravo smo u grupi ispitanika sa ARDS-om ustanovili destrukciju alveolarno-kapilarne membrane u svim slučajevima, na svim presecima, dok su nam u grupi ispitanika iz kontrolne grupe svi analizirani iseći pokazali očuvanost alveolarno-

kapilarne membrane. Ovim smo dokazali da histološka analiza tkiva umrlih od ARDS-a može biti pouzdan dijagnostički metod.

Naime, sa prestankom života i cirkulacije dolazi do degradacije tkiva kao posledica prestanka metabolizma ćelije. U tom smislu vrlo je važno nedvosmisleno potvrditi histološke karakteristike koje su kriterijum za potvrdu razvoja akutnog respiratornog distress sindroma, tačnije njegove eksudativne faze, tokom koje egzitira najveći broj pacijenata.

Pre svega, morali smo da utvrdimo da li promene koje u alveolarno-kapilarnoj membrani nastaju zaživotno u toku evolucije ARDS-a, a koje su patološkoanatomski supstrat za ovaj poremećaj plućne funkcije - oštećenje kontinuiteta zida kapilara (endotel), oštećenje kontinuiteta epitelnih ćelija koje oblažu zid alveole i prisustvo hijalinih membrana, mogu biti vijabilne i nakon nastupanja letalnog ishoda (12). U našem istraživanju je pokazano da svetlosnom mikroskopijom možemo identifikovati osnovne morfološke karakteristike patognomonične za ARDS, što je u saglasnosti sa ranijim radovima (12). U grupi pacijenata umrlih od ARDS-a 210 preseka je bojeno hematoksilin-eozin metodom i pregledano na svetlosnom mikroskopu, a histološke promene su bile sledeće: na 160 preseka uočene su zone krvarenja, na 140 mešoviti zapaljenski infiltrat, na 150 hijaline membrane, na 67 difuzno alveolarno oštećenje i na 140 preseka mešoviti zapaljenski infiltrat. Navedeni histološki opisi odgovaraju nalazu ARDS-a u eksudativnoj fazi. Ovakav rezultat opisali su i drugi autori analizom autopsijskog materijala. Beasley (2010) je opisala histološke karakteristike i sliku tkiva pluća kod akutnog respiratornog distress sindroma odraslih po fazama i u delu koji se odnosi na histološki izgled eksudativne faze nalaz iz ovog doktorata je u saglasnosti sa Beasley.

Zatim je u skladu sa hipotezom trebalo identifikovati epitelne ćelije - pneumocite tipa I i pneumocite tipa II. U svrhu identifikacije očuvanih ćelijskih elemenata rađeno je bojenje na citokeratin, koje je pokazalo očuvanost epitelnog sloja i posle nastupanja smrti. Rađena su imunohistohemijska bojenja u cilju detekcije inflamatornih procesa (IL6, IL8, IL18), endotelnog oštećenja (faktor VIII, E-kadherin, β -katenin), identifikacije klase limfocita za koje smo pretpostavili da imaju ulogu u produkciji interleukina - CD8, kao i bojenja za faktore epitelnog oštećenja (KL-6/MUC1) (3, 46, 51). U našem istraživanju imunohistohemijska bojenja koja su korišćena za identifikaciju kontinuiteta epitelnih ćelija u zidu alveola pokazala su pozitivnost u uzorku kontrolne grupe, gde je očuvan kontinuitet epitelnih ćelija, dok su u uzorcima iz grupe pacijenata sa ARDS-om, gde je usled poremećaja došlo do oštećenja kontinuiteta zida alveola, bojenja bila negativna. Pacijenti od kojih smo uzorkovali tkivo razvili su tešku formu ARDS-a i završili su smrtnim ishodom. Histološki je nalaz bio u skladu sa eksudativnom fazom poremećaja plućne funkcije. Na analiziranim presecima utvrdili smo intersticijumski edem, hijaline membrane i rupturu alveolarnih septi. S obzirom na to da su bojenja rađena na autopsijskom materijalu, rezultate smo dopunili analizom ultrastrukturnih promena u tkivu uzoraka iz grupe ispitanika i kontrolne grupe, pre svega motivisani idejom da je materijal dobijen na autopsiji ekvivalentan prilikom daljih eksperimentalnih manipulacija, te da nastupanjem smrti ćelije ne dolazi do narušavanja molekularnih struktura i ne kompromituje se antigenska prezentacija pojedinih molekula, u našem istraživanju ispitivanih interleukina. Nalaz elektronske mikroskopije u našoj grupi ispitanika pokazao je nekrozu alveolarnih epitelnih ćelija, izolovane oblasti kolagenih vlakana, alveolarne septe u apoptozi, nekrotične endotelne ćelije kapilara sa zadebljanom bazalnom membranom, hijaline membrane u alveolama i alveolarni edem. Apoptoza alveolarnih ćelija bi mogla biti posledica alveolarne povrede koja se dešava kod pacijenata sa ARDS-om. Mogući mehanizam bi mogao biti preko signalnog puta Fas/Fas ligand (51).

U kontrolnim uzorcima na TEM bila je očuvana ultrastruktura ćelija alveolarnog epitela tipa I i II i endotelne ćelije. Aitken i saradnici su objavili rezultate analize tkiva pluća miševa umrlih od ARDS-a uzrokovanog malarijom (70). Miševi su u laboratorijskim uslovima inficirani sojem malarije, razvili kliničku formu ARDS-a i egzitirali (70). Uzorci pluća su uzimani neposredno posle nastupanja smrti (70). Analiza na TEM je pokazala zadebljanje bazalne membrane, otok endotela,

kongestiju kapilara prepunjenih leukocitima, uz prisustvo uobličjenih ćelijskih elemenata i ćelijskog debrija u lumenu alveola (46, 64, 70). Ovakvi rezultati ultrastrukturnih karakteristika kod umrlih od ARDS-a su u saglasnosti sa rezultatima koje smo dobili u našem istraživanju. Pregledom dostupne literature ovakve ultrastrukturne promene opisali su i drugi autori (46, 47, 51, 63, 64, 65). Ovim je potvrđena jedna od radnih hipoteza našeg eksperimenta da je histološka slika tkiva pluća kod umrlih od ARDS-a adekvatna za analizu s obzirom na to da su ultrastrukturne promene posledica bolesti, a ne prestanka života ćelije. Takođe, naši rezultati histološke analize tkiva su u saglasnosti sa drugim autorima koji su se bavili patohistološkim supstratom ARDS-a. Pregledom literature iz više izvora u objavljenim radovima različiti autori su opisali histološku sliku sa prisustvom hijalinih membrana, limfocitnog infiltrata, intersticijskog edema (9, 12, 13), što je bio nalaz i u našim uzorcima ispitanika.

Iako su makroskopski izgled i patohistološka slika ARDS-a poznati od ranije, opisani još među prvim radovima objavljenim u vezi sa akutnom insuficijencijom pluća koja nije posledica kardiogenog edema (4, 9, 12, 64, 65, 66), identifikaciju IL u tkivu pluća umrlih od ARDS-a koji je uzrokovan politraumom pregledom dostupne literature nismo pronašli. S obzirom na klinički i opšti medicinski značaj ARDS-a, patofiziološkim mehanizmima i potencijalnim biomarkerima bavi se veliki broj autora. Međutim, kako je etiologija raznovrsna, tako je i lista ispitivanih molekula duga. Takođe, jedan od izazova predstavlja dobijanje adekvatnog informativnog materijala za dalju molekularnu obradu. U tom smislu različiti autori koristili su bronhoalveolarni lavat, animalne modele i biopsijski materijal uzet od pacijenata koji su hospitalizovani u jedinicama za intenzivnu negu. Svakako da je upitno da li je moguće naći savršen uzorak za analizu. Mi smo u ovom eksperimentu pokušali da predstavimo jedan mogući izvor tkiva za analizu.

Pregledom literature u najvećem broju pročitanih radova među potencijalnim činiocima koji doprinose razvoju bolesti prepoznati su IL6, IL8, IL10, IL18, TNF α (7, 12, 24, 46).

Garcia-Laorden je analizirao bronhoalveolarni lavat i identifikovao IL8 kao potencijalni citokin važan za patogenezu ARDS-a (67). Naime, pronašao je da su u bronhoalveolarnom lavatu bile više koncentracije IL8 kod pacijenata koji su završili smrtnim ishodom. Povišen nivo ovog, ali i nekih drugih interleukina, u svojim rezultatima objavili su i dugi autori (14, 38, 49, 68, 69, 70, 71).

U ovom istraživanju jedan od ciljeva bio je identifikacija interleukina 6, 8 i 18 u tkivu pluća umrlih od ARDS-a. Naša bojenja pokazala su prisustvo svih ispitivanih interleukina u uzorcima iz grupe ispitivanih. Takođe, u grupi kontrolnih ispitanika bilo je uzoraka sa pozitivnim bojenjem na ispitivane interleukine. Međutim, intenzitet ovih pozitivnih bojenja je bio značajno manji u odnosu na jačinu bojenja kod umrlih od posledica ARDS-a. Potencijalni proinflamatorni citokini ispitivani u ovom radu svoje delovanje ostvaruju putem nekoliko različitih mehanizama. Trombin i proinflamatorni citokini aktiviraju endotelne ćelije, dovode do aktivacije inhibitora plazminogena i inhibišu fibrinolizu. IL6 je proinflamatorni citokin koji stimuliše ekspresiju adhezivnih molekula na endotelnim ćelijama, aktivira koagulaciju, inhibira fibrinolizu i dovodi do difuznog oštećenja endotela kapilara, a njegovo prisustvo u tkivu pluća ispitanika umrlih od ARDS-a u saglasnosti je sa njegovom proinflamatornom ulogom (53, 57, 58, 66). U našim rezultatima pozitivnost bojenja na IL6 je bila u 33 od 35 ispitivanih uzoraka. U grupi pacijenata umrlih od ARDS-a pozitivnost na IL6 ($2,21 \pm 0,98$) je bila statistički visoko značajno veća u odnosu na kontrolnu grupu ($1,37 \pm 0,49$; $p < 0,01$). Ovakav rezultat ne možemo direktno porediti s obzirom na to da u literaturi nismo našli ekvivalentan kriterijum ili studiju. Ipak, može se indirektno korelirati sa rezultatima prisustva IL6 u bronhoalveolarnom lavatu. Naime, Capelozzi i saradnici su u kliničkoj studiji objavljenoj 2017. pregledom radova koji su se bavili identifikacijom mogućih biomarkera ARDS-a najvećim delom iz krvi, zatim iz bronhoalveolarnog lavata i biopsijskog materijala, ponudili listu verovatnih, među kojima su IL6 i IL8, za koje se veruje da su veoma važni u razvoju eksudativne faze akutnog respiratornog distres sindroma.

IL8 je proinflamatorni citokin koji ima značajnu ulogu u regulaciji hemotakse neutrofila i monocita u pluća (25, 68). U našoj studiji IL8 je identifikovan u uzorcima grupe ispitanika, dok je u grupi kontrola bio prisutan u 2 od ukupno 14 uzoraka. Takođe, intenzitet pozitivnosti bojenja je bio manji u grupi kontrola. Statističkom analizom dobijenih rezultata prisustva IL8 u tkivu pluća umrlih od ARDS-a ($1,43 \pm 0,76$) dobijena je statistički visoko značajna razlika u odnosu na kontrolnu grupu ($0,14 \pm 0,36$; $p < 0,01$). Stapleton je sa saradnicima sproveo randomiziranu kohortnu studiju u kojoj su određivani citokini sa pretpostavljenom ulogom u patogenezi ARDS-a. U njihovom istraživanju u analiziranim bronhoalveolarnim lavatima bili su prisutni IL6 i IL8. Ovo bi moglo biti u saglasnosti sa drugim autorima koji su korelirali nivo IL8 u bronhoalveolarnom lavatu u odnosu na smrtni ishod (77, 79).

IL18 je pokazatelj aktivacije sistema inflamazoma (58, 79). U našem istraživanju u grupi ispitanika iz uzorka prisustvo IL18 bilo je u 30/35 pacijenata, a u grupi kontrola u 4/14. Analizom podataka dobijenih za imunopozitivnost IL18 u tkivu pluća umrlih od ARDS-a ($1,43 \pm 1,02$) takođe je dobijena statistički visoko značajna razlika u pozitivnosti u odnosu na kontrolnu grupu ($0,57 \pm 0,93$; $p < 0,01$).

Aisiku i saradnici objavili su rezultate koje bismo mogli da interpretiramo u kontekstu prisustva IL6 i IL8 u krvi pacijenata koji su razvili ARDS kao posledicu traume glave, što bi moglo da se odnosi na našu grupu ispitanika s obzirom na to da je u našoj studiji jedan od kriterijuma za uključivanje bio politrauma koja obuhvata i traumu glave.

Pored prisustva IL6 i IL8, interesantan rezultat koji smo i mi dobili jeste da ARDS u politraumi, a u njihovoj studiji kod povreda glave, češće razviju muškarci. U korelaciji naših rezultata dobili smo negativnu korelaciju godina i težine kliničke slike. Odnosno, da mlađi češće razviju tešku formu ARDS-a. Rezultati do kojih smo mi došli pokazali su da postoji negativna korelacija svih ispitivanih interleukina sa godinama života pacijenata umrlih od ARDS-a. Intenzitet bojenja IL6 negativno korelira sa godinama života ispitivanih osoba ($r = -0,4517$, $p < 0,01$), intenzitet bojenja IL8 negativno korelira sa godinama života ispitivanih osoba ($r = -0,35271$, $p < 0,01$), naposljetku i intenzitet bojenja IL18 negativno korelira sa godinama života ispitivanih osoba ($r = -0,3155$, $p < 0,01$). Ovaj rezultat je konzistentan sa rezultatima drugih autora koji su sugerisali da će ARDS posle tupe traume verovatno razviti mlađi belci (33). Niesler i saradnici su sugerisali da posle delovanja tupe traume aktivirani makrofagi upravo oslobađaju hemokine, inflamatorne i proinflamatorne citokine (34, 35).

U ispitivanju korelacije između prisustva IL u tkivu pluća i broja neutrofilnih granulocita pozitivnu korelaciju dobili smo jedino kod IL8, gde intenzitet bojenja IL8 statistički značajno korelira sa brojem neutrofilnih granulocita ($r = 0,0329$, $p < 0,05$), dok za IL6 ($r = 0,63$, $p > 0,05$) i IL18 ($r = 0,053$, $p < 0,05$) nismo dobili statistički značajnu korelaciju. Ovakav bi se rezultat mogao objasniti upravo ulogom IL8 kao jednim od važnijih proinflamatornih citokina u eksudativnoj fazi. Njegovu aktivnost prikazala je Capelozzi u sumiranim rezultatima studije objavljene 2017. godine.

Prisustvo IL18 u tkivu pluća ispitanika umrlih od ARDS-a je u saglasnosti sa rezultatima autora koji su identifikovali IL18 kao jedan od potencijalnih biomarkera ARDS-a (7). Spadarrow i saradnici su IL18 prepoznali kao citokin koji je potencijalno odgovoran za tešku formu ARDS-a, a koji se aktivira dejstvom inflamatornih ćelija, u prvom redu makrofaga u eksudativnoj fazi ARDS-a (7). Dolinay je predložio IL18 kao potencijalni marker posle eksperimenta u kome je na animalnom modelu prikazao da mehanička ventilacija povećava nivo IL18 u plućima, krvi i serumu i da je genetska delecija IL18 ili kapsaze-1 smanjila povredu pluća u mehaničkoj ventilaciji. Kod pacijenata sa ARDS-om mRNA transkripti za inflamazome (CASP1, IL1 β , i IL18) bili su povećani u perifernoj krvi. U uzorcima iz četiri klinička centra Dolinay je objavio da je u rezultatima dobio povišene nivo IL u krvi pacijenata koji su imali ARDS usled sepse ili traume i time ga uvrstio u spisak mogućih biomarkera odgovornih za razvoj ARDS-a (82).

Imajući u vidu naše rezultate, kao i pregled rezultata drugih autora koji su pokušali da predlože potencijalne biomarkere u patogenezi ARDS-a, prednost našeg istraživanja, koje je sprovedeno na autopsijskom materijalu, ogleda se u tome što bi mogao da izdvoji prisustvo imunoekspresije većeg broja primenjenih interleukina kao potencijalnih biomarkera za postavljenje dijagnoze ARDS-a. Ovakav model eksperimenta mogao bi da bude put za smanjenje liste biomarkera kako bi se oni najuže povezani citokini mogli uvrstiti u druge manje invazivne dijagnostičke testove koji bi zaživotno bili upotrebljeni bez rizika po zdravlje drugih obolelih. Na ovaj način se takođe mogu izbeći fiziološke, anatomske i patofiziološke razlike između humanog i animalnog modela.

Primena biopsije pluća kod pacijenata sa teškom kliničkom slikom može biti od značaja u cilju identifikacije patofizioloških mehanizama ovog oboljenja (72-76). Više autora postavilo je pitanje značaja histološke dijagnoze ARDS-a kod pacijenata u intenzivnoj nezi koji su refraktarni na terapiju kiseonikom (72-76). Međutim, ako uzmemo u obzir verovatno pogoršanje opšteg stanja uzrokovano ovom invazivnom dijagnostičkom procedurom, autori su predložili druge, neinvazivne testove za potvrdu ARDS-a uzimajući u obzir da je u 35% obolelih došlo do razvoja težeg kliničkog oblika (75).

Rezultati dobijeni na autopsijski dobijenim uzorcima tkiva pluća su informativniji u odnosu na sitan biopsijski materijal, pre svega jer je uzorkovanje daleko preciznije zbog mogućnosti makroskopskog analiziranja celih pluća, nakon čega se biraju adekvatna mesta za uzimanje isečaka. Pored toga, autopsijski slučajevi koje smo uvrstili u naše istraživanje odabirani su tako da je vreme između nastanka smrti i izvođenja obdukcije bilo dovoljno kratko da ne dozvoli da autolitički proces kompromituje kvalitet uzorka, što bi dovelo u pitanje uspeh morfološke i imunohistohemijske analize.

U ovom istraživanju vršena je analiza tkiva umrlih od ARDS-a koji je komplikacija politraume. Nalaz histologije pokazao je na 210 preseka histološke karakteristike eksudativne faze bolesti. Zanimljivo je da su i drugi autori objavili slične rezultate histološkog pregleda, ali kod ARDS-a koji je nastao kao komplikacija posle delovanja drugih etioloških faktora (84, 85). Još od prvih pandemijskih širenja respiratornih infekcija uzrokovanih virusima iz porodice koronavirusa, ove infekcije dospele su u žižu medicinske javnosti, prepoznate kao jedan od vodećih uzroka smrti. Od 2005. poznati su histološki opisi oblika respiratornog distresa do kojeg dovode ove virusne infekcije (84-86). Imajući u vidu i definiciju ARDS-a, kao i listu etioloških uzroka, ovo je u saglasnosti i sa našim rezultatima iako je kod grupa ispitanika koji su stradali u saobraćaju trauma grudnog koša bila faktor za isključivanje iz studije. Dakle, isti klinički entitet je prisutan kod virusne infekcije uzrokovane koronavirusom i politraume bez traume pluća i grudnog koša (4). Značaj ovakvog rezultata je u tome što teoretski i mehanizam nastanka sa mogućim biomarkerima može biti isti. U radu objavljenom 2020. Pelaiia i saradnici su ukazali na IL6, IL8 i IL18, uz još neke proinflamatorne citokine, među kojima su 1 β (IL-1 β), 2 (IL-2), 7 (IL-7), 17 (IL-17), 33 (IL-33), kao na moguće glavne medijatore za pokretanje citokinske oluje i razvoj teške forme bolesti kod pacijenata inficiranih korona virusom (87). Kao jedan od mehanizama kojim kreće kaskada sinteze proinflamatornih citokina i pokretanje sistemskog inflamatornog odgovora navode „propust i nedovoljnost“ neposrednog imunskog odgovora da prepozna česticu virusa i elimiše ga aktivacijom citotoksičnog odgovora. Takođe, po njihovom mišljenju razvoj teške forme bolesti i ARDS-a moguća je posledica specifičnosti imunskog sistema organizma koji sintetise veće količine IL17 i tako pokreće kaskadu i počinje citokinsku oluju (87).

Prema ovim autorima, u patofiziologiji ARDS-a u pokretanju citokinske oluje IL6 je moćni proinflamatorni medijator koji pokreće sazrevanje i aktivaciju leukocita, ali i transformaciju Th1 i Th17, čime dovodi do povećanja sinteze IL18 i otpočinjanja sistemskog inflamatornog odgovora (87). Aktivacija IL8 dovodi do migracije i aktivacije neutrofila (87). Takođe, ovaj citokin je inhibitor apoptoze neutrofila, tako da se pojačanom sintezom ovog citokina povećava ukupan broj

aktivnih neutrofila i to dvojako: povećanom sintezom neutrofila i njihovom smanjenom apoptozom (87).

Pelaia i saradnici su u svom radu uzorkovali krv pacijenata inficiranih koronavirusom i u tom uzorku određivali citokine od interesa. Naši rezultati koji ukazuju na prisustvo ispitivanih interleukina 6, 8 i 18 u tkivu pluća umrlih od ARDS-a potpuno su u saglasnosti sa rezultatima Pelaia i saradnika (87).

Analizom radova iz literature konstatovano je potpuno saglasje rezultata histološkog nalaza eksudativne faze ARDS-a sa histološkim nalazom koji je opisan u našem ispitivanom uzorku umrlih od ARDS-a (84, 85).

Takođe, interleukini koji su ispitivani u ovom istraživanju: IL6, IL8 i IL18, za koje smo pretpostavili da mogu imati ulogu u patofiziologiji ARDS-a, a čije prisustvo smo dokazali imunohistohemijskim bojenjima na antigene ovih interkleukina, prikazani su kao mogući biomarkeri inflamatornog odgovora i od strane drugih autora (87).

Dobijeni rezultati prisustva IL6, IL8 i IL18 u tkivu pluća umrlih od ARDS-a, u poređenju sa objavljenim radovima drugih autora o mogućim nosiocima inflamatornog odgovora, veoma su značajni. Imajući u vidu ograničenja kako etička, tako i klinička, usled visoke kontagioznosti materijala kod ARDS-a uzrokovanog infekcijom, materijal za analizu koji je predložen u ovom eksperimentu može biti superioran izvor uzoraka tkiva. Postupanje sa infektivnim materijalom, pored toga što je veoma opasno za zdravstvene radnike i istraživače, zahteva primenu svih mera zaštite propisanih za histološko i molekularno rukovanje ovakvim uzorkom, što značajno poskupljuje sve manipulacije.

Kako je u istraživanju pokazao adekvatnost informacija o histološkim promenama tkiva kod ARDS-a, kao i odgovarajući molekularni potencijal, materijal dobijen sa obdukcije mladih zdravih osoba nije ni na koji način inferioran, naprotiv, mogao bi biti veoma dragocen izvor tkiva čijom bismo daljom obradom i ispitivanjem mogli da se približimo potpunom razjašnjenju patofizioloških mehanizama koji dovode do razvoja ARDS-a, naročito njegovih teških formi.

Poslednjih pedeset godina su izazov za dijagnostikovanje i lečenje ARDS-a. Identifikacija potencijalnih biomarkera se pokazala kao zahtevan poduhvat, dok su nam dosadašnja otkrića ukazala koliko je složena i heterogena patofiziologija ARDS-a (59). U ovom istraživanju imunohistohemijskom analizom dokazali smo prisustvo IL6, IL8 i IL18 u tkivu pluća umrlih od ARDS-a. Značaj ovog istraživanja je u identifikaciji navedenih interleukina kao potencijalnih biomarkera za postavljanje dijagnoze ARDS-a. Naime, druge neinvazivne tehnike mogle bi biti primenjene za dokazivanje prisustva ovih markera, što bi olakšalo zaživotno postavljanje dijagnoze. Ustanovljeni rezultati istraživanja mogu suziti listu ostalih potencijalnih biomarkera, uz značajno smanjenje troškova i rizika po zdravlje ispitanika, što može značajno pomoći u bržem rasvetljavanju patogeneze ARDS-a.

6. ZAKLJUČCI

U skladu sa postavljenim ciljevima i na osnovu dobijenih rezultata mogu se izvesti sledeći zaključci:

- Kvalitet autopsijskog materijala za interpretaciju je adekvatan i jednako informativan kao materijal uzet putem hirurške biopsije.
- Identifikacija interleukina IL6, IL8 i IL18 je moguća na autopsijskom materijalu.
- Ultrastrukturne promene su u korelaciji sa histološkim promenama.
- Naše istraživanje je ukazalo da imunoekspresija interleukina 6, 8 i 18 može imati potencijalni značaj u patogenezi ARDS-a.

7. LITERATURA

1. Huppert LA, Matthay MA, Ware LB. Pathogenesis of Acute Respiratory Distress Syndrome. *Semin Respir Crit Care Med* 2019 Feb;40(1):31-39. doi: 10.1055/s-0039-1683996.
2. Bernard GR, Artigas A, Brugham Klet al. The American-European Consensus Conference on ARDS: definition, mechanisms, relevant outcomes, and clinical trial coordination. *Am J Respirat Crit Care* 1994;149(3pt1):88-824.
3. Avecillas JF, Freire AX, Arroliga AC. Clinical epidemiology of acute lung injury and acute respiratory distress syndrome: incidence, diagnosis and outcomes. *Clin Chest Med* 2006; 27(4):549-557.
4. Ashbaugh DG, Bigelow DB, Petty TL, Levine BE. Acute respiratory distress in adults. *Lancet* 1967; 2:319323.
5. Fanelli V, Vlachou A, Ghannadian S, Simonetti U, Slutsky AS, Zhang H. Acute respiratory distress syndrome: new definition, current and future therapeutic options. *J Thorac Dis* 2013;5(3):326-334. doi: 10.3978/j.issn.2072-1439.2013.04.05.
6. Confalonieri M, Salton F, Fabiano F. Acute respiratory distress syndrome. *Eur Respir rev* 2017;26:160116. doi: 10.1183/16000617.0116-2016.
7. Spadaro S, Park M, Turrini C, Tunstall T, Thwaites R, Mauri T et al. Biomarkers for acute respiratory distress syndrome and prospects for personalized medicine. *J Inflamm (Lond)* 2019 Jan 15;16:1. doi: 10.1186/s12950-018-0202-y.
8. Fanelli V, Vlachou A, Ghannadian S, Simonetti U, Slutsky AS, Zhang H. Acute respiratory distress syndrome: new definition, current and future therapeutic options. *J Thorac Dis* 2013;5(3):326-334. doi: 10.3978/j.issn.2072-1439.2013.04.05.
9. Dushianthan A, Grocott MP, Postle AD, Cusack R. Acute respiratory distress syndrome and acute lung injury. *Postgrad med J* 2011 Sep;87:612. doi: 10.1136/pgmj.2011.118398.
10. Caironi P, Carlesso E, Gattinoni L. Radiological imaging in acute lung injury and acute respiratory distress syndrome. *Semin Respir Crit Care Med* 2006;27(4):404-415.
11. Nešković V. ARDS i mehanička ventilacija, 616.24 204289548.
12. Beasley MB. The pathologist's approach to acute lung injury. *Arch Pathol Lab Med* 2010 May;134(5):719-27. doi: 10.1043/1543-2165-134.5.719.
13. Gattinoni L, Bombino M, Pelosi P, Lissoni A, Pessanti A, Fumagalli R et al. Lung structure and function in different stages of severe adult respiratory distress syndrome. *JAMA* 1994; 271:17772-9.
14. Butt Y, Kurdowska A, Allen TC. Acute Lung Injury: A Clinical and Molecular Review. *Arch Pathol Lab Med* 2016 Apr;140(4):345-50. doi: 10.5858/arpa.2015-0519-RA.
15. Nikolić I. Embriologija čoveka, 185-190, treće dopunjeno izdanje, 2007, ISBN 978-86-7478-035-0.
16. Moore K. Before we were born: essentials of embryology and birth defects, tenth edition, ISBN:978-0-323-60849-7.
17. Šerban N. Početno o ćeliji-Pokretne i nepokretne ćelije.
18. Ross, *Histology A text and atlas*-7th edition, 2016.
19. Alberts, *Molecular biology of the cell*, 4th edition, 1273.
20. Dunnill MS. Some aspects of pulmonary defence. *Journal of pathology*, march 15, 1979, Vol 128.
21. Robertson B. Basic morphology of the pulmonary defence system. *Eur J respir Dis Suppl*, 1980:107:21-40.
22. Kopeva TN, Makarova OV, Khomenko. The immune system of the lungs in healthy subjects and in chronic nonspecific disease. *Arch Pathol* 1986;48(3):86-90.

23. Gopallawa I et al. A four-part guide to lung immunology: invasion, inflammation, immunity, and intervention. *Frontiers in immunology*, march 2023, doi:103389/fimmu2023.1119564.
24. Hussell T. Immunity in the lung. *British society for immunology, bitesized imunology*.
25. Han S, Mallampalli R. The acute respiratory distress syndrome: from mechanism to translation. *J Immunology* 2015, february 1;194(3):855-860.doi:10.4049/jimmunol.1402513.
26. Janeway CA Jr., Medzhitov R. Innate immune recognition. *Annu Rev Immunol* 2002;20:197–216.
27. Anaya JM, Shoenfeld Y, Rojas-Villarraga A, et al. editors. Bogota (Colombia): El Rosario University Press; 2013 Jul 18.
28. Angel A. Justiz Vaillant; Ahmad Qurie. *Interleukin*, Aug.2022
29. Akdis M. Interleukins (from IL-1 to IL-38), interferon, transforming growth factor b, and TNF-a: Receptors, functions, and roles in diseases. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology*,2016. Vol138,No4, (984-1010)http://dx.doi.org/10.1016/j.jaci.2016.06.033
30. Anon. (1994). Nomenclature for secreted regulatory proteins of the immune system (interleukins): Update. IUIS/WHO Nomenclature Committee. *Bull. World Health Organ*. Vol. 72, pp. 811-812.
31. Commins SP. et al. Immunologic messenger molecules: Cytokines, interferons, and chemokines. *J Allergy Clin Immunol* 2010; Vol. 125, pp. 53-72.
32. Noosheen Alaverdi & David Sehy. (2007). *Cytokines - Master Regulators of the Immune System*. eBioscience. Retrieved 2008-02-28.
33. Fraser IP, Koziel H, Ezekowitz RA. The serum mannose-binding protein and the macrophage mannose receptor are pattern recognition molecules that link innate and adaptive immunity. *Semin Immunol* 1998;10:363–72.
34. Takahashi K, Ip WE, Michelow IC, Ezekowitz RA. The mannose-binding lectin: a prototypic pattern recognition molecule. *Curr Opin Immunol* 2006;18:16–23.
35. Uemura K, Saka M, Nakagawa T, et al. L-MBP is expressed in epithelial cells of mouse small intestine. *J Immunol* 2002;169:6945–50.
36. Grasso DL, Segat L, Zocconi E, Radillo O, Trevisiol C, Crovella S. MBL expression in patients with recurrent tonsillitis. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol* 2009;73:1550–53.
37. Bulla R, De Seta F, Radillo O, et al. Mannose-binding lectin is produced by vaginal epithelial cells and its level in the vaginal fluid is influenced by progesterone. *Mol Immunol* 2010;48:281-286.
38. Blondonnet R, Constantin JM, Sapin V, Jabaudon M. A pathophysiologic approach to biomarkers in acute respiratory distress syndrome. *Disease markers*, vol2016,doi:10.1155/2016/3501373.
39. Knaus W.A. The ongoing mystery of ARDS, *Intensive Care Med* 1996;22:517-518.
40. Beasley MB. The pathologist's approach to acute lung injury. *Arch Pathol Lab Med* 2010 May;134(5):719-27. doi: 10.1043/1543-2165-134.5.719.
41. Fernandez P, Lorente J, Ballen-Barragan A, Bello G. Acute respiratory distress syndrome and diffuse alveolar damage.New insight on a complex relationship. *Ann Am Thoracic Society* 2017; vol14,No6,pp844-850, doi:10.1513/AnnalsATS201609-728PS.
42. Depudydt O, Daeze C, Benoit D, PraetM, Vermassen E. Diagnostic potential of open lung biopsy in mechanically ventilated patients with diffuse pulmonary infiltrates of unclear aetiology. *Anesthesia and Intensive Care* 2013; Vol 41,No 5, 610-617.
43. Cardoso E, Galvao Bueno A, Pavan D, Cunha A, Schmidt R, Duarte P. Surgical lung biopsy in onco-hematological patients with diffuse pulmonary infiltrates and mechanical ventilation in the ICU. *Oncology letters* 2019;17:3997-4003, doi:10.3892-01.2019.10065.
44. Papazian L,Thomas P, Bregeon F, Garbe L, Zandotti C, Saux P, Gaillat F, Drancourt M, Auffray J-P, Gouin F. Open lung biopsy in patients with acute respiratory distress syndrome. *Anesthesiology* 1998;88.935-944.

45. Hill D, Ratliff J, Parrott J, Lamy M, Fallat R, Koeniger E, Yaeger, Whitmer G. Pulmonary pathology in acute respiratory insufficiency: lung biopsy as a diagnostic tool. *Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery* 1976 Jan;71(1):64-71.
46. Capelozzi V, Craig T, Beasley M, Cagle P, Guinee D, Hariri L, Husain A, Deepali J, Launtejoul S, Larsen B, Miller R, Mino-Kenudson M, Mehrad M, Raparia K, Roden A., Shneider F, Sholl L, Smith M. Molecular and immune biomarkers in acute respiratory distress syndrome a perspective from members of the pulmonary pathology society. *Archives of Pathology Laboratory Medicine* 2017;141:1719-1727; doi: 10.5858/arpa.2017-0115-SA.
47. Anderson R, Thielen K. Correlative study of adult respiratory distress syndrome by light, scanning and transmission electron microscopy. *Ultrastructural Pathology* 1992;16:615-628.
48. Pires-Neto R, Morales M, Lancas T, Inforsato N, Ribeiro dr Carvalho C, Ferraz de Silva L, Mauad T, Dolhnikoff M. Expression of acute-phase cytokines, surfactant proteins, and epithelial apoptosis in small airways of human acute respiratory distress syndrome. *Journal of Critical Care* 2013;28,111e9-111e15,doi.org/10.1016/j.jcrc.2012.05.013.
49. Allen TC, Fudala R, Nash SE, Kudrowska A. Anti-interleukin 8 autoantibody: interleukin 8 immune complexes visualised by laser confocal microscopy in injured lung. *Arch Pathol Lab Med* 2007;131(3):452-6<https://doi.org/10.5858/2007-131-452-AAICVB>.
50. Allen TC, Kudrowska A. Interleukin 8 and acute lung injury. *Arch Pathol Lab Med* 2014;138(2):266-9.
51. Kenneth T. Hughes, Mary Beth Beasley. Pulmonary manifestations of acute lung injury - more than just diffuse alveolar damage. *Archives of Pathology Laboratory Medicine* 2016; doi:10.5858/arpa.2016-0342-RA.
52. Park W, Goodman R, Steinberg K, Ruzinski J, Radella F, Park D, Pugin J, Skerrett S, Hudson L, Martin T; Cytokine balance in the lungs of patients with acute respiratory distress syndrome; *Am J Respir Crit Care Med*, Vol 164, pp1896-1903, 2001, doi:10.1164/rccm.2104013
53. Dinarello C. IL-18: A TH1-inducing, proinflammatory cytokine and new member of the IL-1 family. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 1999; Volume 103, Issue 1:11-24. DOI:[https://doi.org/10.1016/S0091-6749\(99\)70518-X](https://doi.org/10.1016/S0091-6749(99)70518-X).
54. Koyama K, Katayama S, Tonai K, Shima J, Kionuma T, Nunomiya S. Biomarker profiles of coagulopathy and alveolar epithelial injury in acute respiratory distress syndrome with idiopathic/immune-related disease or common direct risk factors. *Critical Care* 2019;23:283.<https://doi.org/10.1186/s13054-019-2559-6>.
55. Hupert L, Matthay M, Ware L. Pathogenesis of acute respiratory distress syndrome. *Seminars in Respiratory and Critical Care Medicine* 2019; Vol40.No1:40:31-39. doi <https://doi.org/10.1055/s-0039-1683996>.
56. Kasotakis G, Stanfield B, Haines K, Vatsaas C, Alger A, Vaslef SN, Brooks K, Agarwal S. Acute respiratory distress syndrome (ARDS) after trauma: improving incidence, but increasing mortality. *J Crit Care* 2021;64:213-8 <https://doi.org/10.1016/j.jcrc.2021.05.003>
57. Hubert-Lang M, Lambris JD, Ward PA. Innate immune responses to trauma. *Nat Immunol* 2018;19(4):327-341 <https://doi.org/10.1038/s41590-018-0064-8>.
58. Niesler U, Palmer A, Rademacher P, Huber-Lang MS. Role of alveolar macrophages in the inflammatory response after trauma. *Shock* 2014;42(1):3-10. <https://doi.org/10.1097/SHK.0000000000000167>
59. Bortolotti P, Faure E, Kipnis E. Inflammasomes in tissue damages and immune disorders after trauma. *Front Immunol* 2018;9:1900 <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.01900>
60. Matthay M, Zemans R, Zimmerman G, Arabi Y, Beitler J, Mercat A, Herridge M, Randolph A, Calfee C. Acute respiratory distress syndrome. *Nature reviews, Disease primers* 2019;5:18. doi.org/10.1038/s41572-019-0069-0
61. Han S, Mallampalli RK. The acute respiratory distress syndrome from mechanism to translation. *J Immunol* 2015;194:855-60. <https://doi.org/10.4049/J.Immunol.14002513>

62. Della Torre V, Badenes R, Corradi F, Racca F, Lavinio A, Matta B, et al. Acute respiratory distress syndrome in traumatic brain injury: how do we manage it? *J Thoracic Dis* 2017;9(12):5368-81. <https://doi.org/10.21037/jtd.2017.11.03>.
63. Maca J, Jor O, Holub M, Sklienka P, Burša F, Burda M. Past and present ARDS mortality rates: a systematic review. *Respir Care* 2017;62(1):113-22. <https://doi.org/10.4187/respircare.04716>
64. Aderson R, Thielen K. Correlative study of adult respiratory distress syndrome by light, scanning, and transmission electron microscopy. *Ultrastructural Pathology* 1992; 16:615-628.
65. Teplitz C. The ultrastructural pathology of acute respiratory distress syndrome in adults (shock lung): transmission and stereoscaning electron microscopic observations. *Chest* 1971;60:304.
66. Bachofen M, Weibel ER. Structural alterations of lung parenchyma in the adult respiratory distress syndrome. *Clin Chest Med* 1982;3:35–56.
Fremont RD, Koyama T, Calfee CS, Wu W, Dossett LA, Bossert FR, Mitchell D, Wickersham N, Bernard GR, Matthay MA, May AK, Ware LB. Acute lung injury in patients with traumatic injuries: utility of a panel of biomarkers for diagnosis and pathogenesis. *J Trauma* 2010; 68:1121–1127.
67. Laorden I, Lorente J, Flores C, Slutsky A, Villar J. Biomarkers for the acute respiratory distress syndrome: how to make the diagnosis more precise. *ATM* 2017. <http://dx.doi.org/10.21037/atm.2017.06.49>
68. Bhargava M, Wendt C. Biomarkers in acute lung injury; *Transl Res.* 2012 April ; 159(4): 205–217. doi:10.1016/j.trsl.2012.01.007.
69. Ware LB, Koyama T, Zhao Z, et al. Biomarkers of lung epithelial injury and inflammation distinguish severe sepsis patients with acute respiratory distress syndrome. *Crit Care* 2013; 17:R253
70. Aitken E, Negri E, Barboza R, Lima M, Alvarez J, Marinho C, Caldini E, Epiphany S; Ultrastructure of the lung in a murine model of malaria-associated acute lung injury/acute respiratory distress syndrome; *Malaria Journal*;13:230
71. Pittet J, Mackerles R, Martin T, Matthay M; Biological markers of acute lung injury: prognostic and pathogenetic significance; *Am J Respir Crit Care Med*, Vol 155, pp 1187-1205, 1997
72. Chen S, Yang C, Zhu L, Jiang J; Plasma biomarkers of ALI and ARDS; *Int J Clin Exp Med* 2017;18(8):12308-12314
73. Depuydt O, Daeze C, Benoit D, Praet M, Vermassen E; Diagnostic potential of open lung biopsy in mechanically ventilated patients with diffuse pulmonary infiltrates of unclear aetiology; *Anaesthesia and intensive care*, Vol 41, No 5, September 2013.:610-617
74. Barbas C, Capelozzi V, Hoelz C, Magaldi B, Souya R, Sandeville M, Milaney de Campos J, Werebe E, Filho A, Knobel E; Impact of open lung biopsy on refractory acute respiratory failure; *J Bras Pneumol*, 2006;32(5):418-23
75. Fraire A, Cooper S, Greenberg D, Rowland L, Langston C; Transbronchial lung biopsy-histopathologic and morphometric assessment of diagnostic utility; *Chest*, 1992;102:748-52
76. Phillipponnet C, Cassagnes L, Pereira B, Kemeny JL, Devoussaoux-Shisheboran M, Lautrette A, Guerin C, Souweine B; *PLOS one*, May 25, 2018, <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0196795>
77. Lim S, Suh G, Choi J, Koh W, Lim Si, Han J, Lee K, Shim Y, Chung M, Kim H, Kwon J; Usefulness of open lung biopsy in mechanically ventilated patients with undiagnosed diffuse pulmonary infiltrates: influence of comorbidities and organ dysfunction; *Crit Care* 2007,11:R93; doi:10.1186/cc6106
78. Stapleton R, Suratt B, Neff M, Wurfel M, Ware L, Ruzinski J, Caldwell E, Hallstrand T, Pearsons P; Bronchoalveolar fluid and plasma inflammatory biomarkers in contemporary ARDS patients; *Am J Respir Crit Care Med*; 2012, Jun 1; 185(11):1225-34
79. Aisiku I, Yamal J, Doshi P, Benoit J, Gopinath S, Goodman J, Robertson C; Plasma cytokines IL-6, IL-8 and IL10 are associated with the development of acute respiratory distress syndrome in

- patients with severe traumatic brain injury. *Crit Care*. 2016 Sep 15;20:288. doi: 10.1186/s13054-016-1470-7.
80. Cartin-Ceba R, Hubmayr RD, Qin R, et al. Predictive value of plasma biomarkers for mortality and organ failure development in patients with acute respiratory distress syndrome. *J Crit Care* 2015;30:219.e
 81. Moore A, Pienkos S, Sinha P, Guan J et al. Elevated plasma interleukin-18 identifies high-risk acute respiratory distress syndrome patients not distinguished by prior latent class analyses using traditional inflammatory cytokines: a retrospective analysis of two randomised clinical trials. *Critical Care Medicine* 2023;51(12):p e269-e274,December.doi:10.1097/CCM0000000000006028
 82. Dolinay T, Kim Y, Howrlyak J, Hunnin Ghake G, Hyeok An C, Freneburgh L, Massaro A, Rogers A, Gazourian L, Nakahire K, Haspel J, Landazury R, Eppanapally S, Christie J, Meyer N, Ware L, Christiani D, Ryter S, Baron R, Choi A. Inflammasome-regulated cytokines are critical mediators of acute lung injury; *Am J Respir Crit Care Med* 2012 Jun 1;185(11):1225-34. doi: 10.1164/rccm.201201-0003OC. Epub 2012 Mar 29.
 83. Molina D Kimberley, DiMaio Vincent, Normal organ weights in men part II the brain, lungs, liver, spleen and kidneys. *The American journal of forensic medicine and pathology* 33(4):p 368-732, December 2012. doi:10.1097/PAF.0b013e31823d29ad
 84. Hwang D, Chamberlain D, Poutanen S, Low D, Asa S, Butanz J; Pulmonary pathology of severe acute respiratorz szndrome in Toronto; *Modern pathology* (2005)18,1-10
 85. Geramizadeh B, Marzban M; Histopathological findings of coronavirus in lung: a mini review; <https://doi.org/10.1177/2632010X20951823>
 86. Suess C, Hausmann R; Gross and histopathological pulmonary findings in a COVID-19 associated death during self-isolation; *International journal of legal medicine* (2020) 134:1285-1290
 87. Pelaia C, Tinello C, Vatrella A, De Sarro G, Pelaia G; Lung under attack by COVID-19-induced cytokine storm: pathogenic mechanisms and therapeutic implications; *Therapeutic advances in respiratory distress*, Sage journals, Vol14, Jan-dec 2020; <https://doi.org/10.1177/1753466620933508>

Prilozi

Publikovani radovi iz ove doktorske disertacije:

1. *Kuzmanović J, Savić S, Bogdanović M, Martinović T, Bumbaširević V, Stevović TK. Micromorphological features and interleukin 6, 8, and 18 expressions in post-mortem lung tissue in cases with acute respiratory distress syndrome. Forensic Sci Med Pathol 2024; 20(1):1-7. (M22, IF 1,8)*

BIOGRAFIJA

Jelena Kuzmanović rođena je u Beogradu 10.5.1979. godine. Osnovnu školu i gimnaziju završila u Beogradu. Diplomirala je 2006. na Medicinskom fakultetu Univerziteta u Beogradu sa prosečnom ocenom 7,49. Specijalističke akademske studije, modul Histologija, histochemija, elektronska mikroskopija i embriologija, upisala 2010/2011. školske godine na Medicinskom fakultetu Univerziteta u Beogradu i završila ih sa prosečnom ocenom 8,82. Završni akademski specijalistički rad "Značaj antropoloških mera - odnos struk/kuk u proceni visceralne gojaznosti i rizika obolevanja od hroničnih nezaraznih bolesti" pod mentorstvom prof. dr Slobodana Savića odbranila je 2012. godine. Specijalističke studije iz patološke anatomije upisala je 2012. godine na Medicinskom fakultetu Univerziteta u Beogradu, a specijalistički ispit je položila u januaru 2019. godine.

Doktorske studije iz Molekularne medicine na Medicinskom fakultetu upisala je 2012.

Od decembra 2007. do januara 2011. radila je u službi Opšte medicine za odrasle Doma zdravlja "Savski venac". Od januara 2011. godine zaposlena je u službi za patološko-anatomsku dijagnostiku Univerzitetskog Kliničko-bolničkog centra „Zvezdara” u Beogradu, gde obavlja mikroskopske analize biopsijskih materijala primenjujući histochemijske, specijalne histološke i imunohistochemijske metode obrade materijala. Vršiti pregled „EX TEMPORE“ za potrebe hirurških medicinskih jedinica i obavlja obdukcije umrlih pacijenata.

Udata je i majka je troje dece.

Član je Udruženja patologa i citologa Srbije, Evropskog udruženja patologa, član sekcije za patologiju Srpskog lekarskog društva.

Autor je dva rada i koautor 7 radova sa SCI liste. Učesnik je brojnih kongresa na kojima je prezentovala jedan rad.

Prilog 1.

Izjava o autorstvu

Ime i prezime autora: Jelena Kuzmanović

Broj indeksa: MM 19/12

Izjavljujem

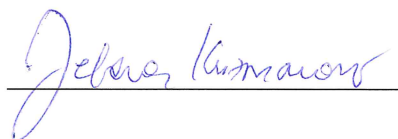
da je doktorska disertacija pod naslovom

Uloga interleukina 6, 8 i 18 u patogenezi akutnog respiratornog distres sindroma

- rezultat sopstvenog istraživačkog rada,
- da disertacija u celini ni u delovima nije bila predložena za sticanje druge diplome prema studijskim programima drugih visokoškolskih ustanova,
- da su rezultati korektno navedeni i
- da nisam kršio/la autorska prava i koristio intelektualnu svojinu drugih lica.

Potpis doktoranda

U Beogradu, jun 2024. godine



Prilog 2.

Izjava o istovetnosti štampane i elektronske verzije doktorskog rada

Ime i prezime autora: Jelena Kuzmanović

Broj indeksa: MM 19/12

Studijski program: Molekularna Medicina

Naslov rada: Uloga interleukina 6, 8 i 18 u patogenezi akutnog respiratornog distres sindroma

Mentor: Slobodan Savić

Komentor: Sofija Glumac

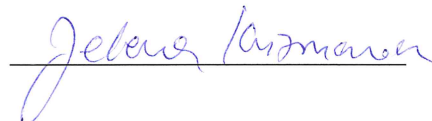
izjavljujem da je štampana verzija mog doktorskog rada istovetna elektronskoj verziji koju sam predala radi pohranjivanja u **Digitalnom repozitorijumu Univerziteta u Beogradu**.

Dozvoljavam da se objave moji lični podaci vezani za dobijanje akademskog zvanja doktora nauka, kao što su ime i prezime, godina i mesto rođenja i datum odbrane rada.

Ovi lični podaci mogu se objaviti na mrežnim stranicama digitalne biblioteke, u elektronskom katalogu i u publikacijama Univerziteta u Beogradu.

U Beogradu, jun 2024. godine

Potpis doktoranda

Handwritten signature of Jelena Kuzmanović in blue ink, written over a horizontal line.

Prilog 3.

Izjava o korišćenju

Ovlašćujem Univerzitetsku biblioteku „Svetozar Marković“ da u Digitalni repozitorijum Univerziteta u Beogradu unese moju doktorsku disertaciju pod naslovom:

Uloga interleukina 6, 8 i 18 u patogenezi akutnog respiratornog distres sindroma

koja je moje autorsko delo.

Disertaciju sa svim priložima predala sam u elektronskom formatu pogodnom za trajno arhiviranje.

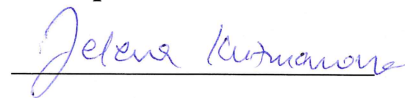
Moju doktorsku disertaciju pohranjenu u Digitalni repozitorijum Univerziteta u Beogradu i dostupnu u otvorenom pristupu mogu da koriste svi koji poštuju odredbe sadržane u odabranom tipu licence Kreativne zajednice (Creative Commons) za koju sam se odlučila.

1. Autorstvo
2. Autorstvo - nekomercijalno
3. **Autorstvo – nekomercijalno – bez prerade**
4. Autorstvo – nekomercijalno – deliti pod istim uslovima
5. Autorstvo – bez prerade
6. Autorstvo – deliti pod istim uslovima

(Molimo da zaokružite samo jednu od šest ponuđenih licenci, kratak opis licenci dat je na poledini lista).

U Beogradu, jun 2024. godine

Potpis doktoranda



1. Autorstvo. Dozvoljavate umnožavanje, distribuciju i javno saopštavanje dela, i prerade, ako se navede ime autora na način određen od strane autora ili davaoca licence, čak i u komercijalne svrhe. Ovo je najslobodnija od svih licenci.
2. Autorstvo – nekomercijalno. Dozvoljavate umnožavanje, distribuciju i javno saopštavanje dela, i prerade, ako se navede ime autora na način određen od strane autora ili davaoca licence. Ova licenca ne dozvoljava komercijalnu upotrebu dela.
3. Autorstvo – nekomercijalno – bez prerada. Dozvoljavate umnožavanje, distribuciju i javno saopštavanje dela, bez promena, preoblikovanja ili upotrebe dela u svom delu, ako se navede ime autora na način određen od strane autora ili davaoca licence. Ova licenca ne dozvoljava komercijalnu upotrebu dela. U odnosu na sve ostale licence, ovom licencom se ograničava najveći obim prava korišćenja dela.
4. Autorstvo – nekomercijalno – deliti pod istim uslovima. Dozvoljavate umnožavanje, distribuciju i javno saopštavanje dela, i prerade, ako se navede ime autora na način određen od strane autora ili davaoca licence i ako se prerada distribuira pod istom ili sličnom licencom. Ova licenca ne dozvoljava komercijalnu upotrebu dela i prerada.
5. Autorstvo – bez prerada. Dozvoljavate umnožavanje, distribuciju i javno saopštavanje dela, bez promena, preoblikovanja ili upotrebe dela u svom delu, ako se navede ime autora na način određen od strane autora ili davaoca licence. Ova licenca dozvoljava komercijalnu upotrebu dela.
6. Autorstvo – deliti pod istim uslovima. Dozvoljavate umnožavanje, distribuciju i javno saopštavanje dela, i prerade, ako se navede ime autora na način određen od strane autora ili davaoca licence i ako se prerada distribuira pod istom ili sličnom licencom. Ova licenca dozvoljava komercijalnu upotrebu dela i prerada.

Slična je softverskim licencama, odnosno licencama otvorenog koda.