

UNIVERZITET U BEOGRADU

MEDICINSKI FAKULTET

Milica N. Rašić

ISPITIVANJE UDRUŽENOSTI POLIMORFIZAMA GENA
REGULATORA VASKULARNE HOMEOSTAZE SA
RIZIKOM OD RAZVOJA TEŠKIH KOMPLIKACIJA I
ISHODOM KOD HIRURŠKIH PACIJENATA SA
SEKUNDARNIM PERITONITISOM

Doktorska disertacija

U Beogradu, 2026

UNIVERSITY OF BELGRADE

FACULTY OF MEDICINE

Milica N. Rašić

ANALYSIS OF THE ASSOCIATION BETWEEN
VASCULAR HOMEOSTASIS REGULATOR GENE
POLYMORPHISMS AND THE RISK OF SEVERE
COMPLICATIONS AND OUTCOMES IN SURGICAL
PATIENTS WITH SECONDARY PERITONITIS

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2026

MENTORI:

Prof. dr Nela Maksimović, vanredni profesor
Medicinski fakultet, Univerzitet u Beogradu

Prof. dr Krstina Doklešić Vasiljev, vanredni profesor
Medicinski fakultet, Univerzitet u Beogradu

ČLANOVI KOMISIJE:

Prof. dr Tatjana Damnjanović, redovni profesor
Medicinski fakultet, Univerzitet u Beogradu

Prof. dr Bojan Jovanović, vanredni profesor
Medicinski fakultet, Univerzitet u Beogradu

Prof. dr Dejan Ivanov, redovni profesor
Medicinski fakultet, Univerzitet u Novom Sadu

Datum odbrane

ZAHVALNICA

Veliku zahvalnost dugujem svojim mentorkama, prof. dr Neli Maksimović i prof. dr Krstini Doklešić Vasiljev, na poverenju, podršci, strpljenju i dragocenim savetima tokom izrade ove doktorske disertacije. Njihovo znanje, iskustvo i posvećenost bili su mi oslonac tokom svakog koraka ovog istraživanja i značajno su doprineli mom stručnom i naučnom razvoju.

Zahvaljujem članovima komisije na vremenu, pažnji i spremnosti da svojim stručnim sugestijama doprinesu oceni ovog rada.

Zahvalnost dugujem koautorima na radu proisteklom iz ove doktorske disertacije, na saradnji, stručnim savetima i doprinosu u oblikovanju i publikovanju rezultata ovog istraživanja.

Iskreno zahvaljujem kolegama sa Instituta za humanu genetiku Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu na pomoći, saradnji i podršci tokom rada, a svojim kolegicama iz sobe na svakodnevnom razumevanju i svim lepim trenucima koji su ovaj put činili lakšim. Posebno hvala našim divnim tehničarkama, Sandri i Marini, za pomoć u laboratorijskom delu ovog istraživanja.

Najdublju zahvalnost dugujem svojim roditeljima, Brankici i Nebojši, i sestri Mileni, koji su mi tokom celog života bili najveći oslonac. Njihova ljubav, strpljenje i vera u mene davali su mi snagu da istrajem i privedem kraju ovaj važan životni i profesionalni put.

Sa posebnom emocijom pominjem svoju baku Kosaru i deku, prof. Srboljuba Gulića, koji su od srca priželjkivali da dočekaju završetak ove disertacije. Iako nisu tu da vide njen kraj, njihova ljubav i trag koji su ostavili u mom životu trajno su utkani u ovaj rad.

Posebnu zahvalnost dugujem svom suprugu Petru na ljubavi, strpljenju, razumevanju i nesebičnoj podršci tokom izrade ovog rada. Ovu disertaciju sa ljubavlju posvećujem njemu i svojoj ćerki Sofiji, koji su moja najveća snaga i najdublji smisao svega što radim.

Ispitivanje udruženosti polimorfizama gena regulatora vaskularne homeostaze sa rizikom od razvoja teških komplikacija i ishodom kod hirurških pacijenata sa sekundarnim peritonitisom

SAŽETAK

Uvod: Sekundarni peritonitis predstavlja teško urgentno hirurško stanje koje može biti praćeno razvojem sepse, sindroma akutnog respiratornog distresa (ARDS), multiorganske disfunkcije (MODS), multiorganske insuficijencije (MOF) i smrtnim ishodom. Poremećaj vaskularne homeostaze i endotelna disfunkcija imaju važnu ulogu u nastanku i progresiji ovih komplikacija. Cilj rada bio je da se ispita učestalost genotipova i alela polimorfizama gena *NOS2* (rs2297518), *NOS3* (rs2070744, rs1799983, VNTR 4a/4b) i *ACE* (I/D, rs4646994), kao i njihova povezanost sa razvojem teških komplikacija i ishodom lečenja kod hirurških pacijenata sa sekundarnim peritonitisom.

Metod: Istraživanje je obuhvatilo 202 odrasla pacijenta sa sekundarnim peritonitisom. Praćeni su razvoj ARDS-a, MODS-a, MOF-a, sepse i intrahospitalni mortalitet. Genotipizacija je izvedena primenom metode polimerazne lančane reakcije (PCR), polimerazne lančane reakcije uz restrikcionu digestiju (PCR-RFLP) i polimerazne lančane reakcije u realnom vremenu (real-time PCR).

Rezultati: Učestalosti genotipova i alela polimorfizama *NOS2* i *NOS3* bile su u skladu sa Hardy-Weinberg ravnotežom. Polimorfizam *NOS3* c.-786T>C (rs2070744) bio je značajno povezan sa razvojem MODS-a i MOF-a, a TT genotip bio je nezavisan prediktor ovih komplikacija, uz gotovo petostruko veći rizik za razvoj MOF-a. Haplotip T4bG bio je značajno povezan sa MODS-om, MOF-om i sepsom.

Zaključak: Rezultati ove studije ukazuju da bi genske varijante *NOS3*, posebno polimorfizam c.-786T>C i haplotip T4bG, mogle biti povezane sa sklonošću ka razvoju teških komplikacija kod pacijenata sa sekundarnim peritonitisom i imati potencijalnu ulogu u ranoj proceni rizika za njihov razvoj.

Ključne reči: sekundarni peritonitis, polimorfizam, *NOS3*, *NOS2*, *ACE*, sepsa, MODS, MOF, ARDS, intrahospitalni mortalitet

Naučna oblast: Medicina

Uža naučna oblast: Molekularna medicina

UDK broj: _____

Analysis of the association between vascular homeostasis regulator gene polymorphisms and the risk of severe complications and outcomes in surgical patients with secondary peritonitis

ABSTRACT

Introduction: Secondary peritonitis is a severe surgical emergency that may be accompanied by the development of sepsis, acute respiratory distress syndrome (ARDS), multiple organ dysfunction syndrome (MODS), multiple organ failure (MOF), and fatal outcome. Disturbances of vascular homeostasis and endothelial dysfunction play an important role in the onset and progression of these complications. This study aimed to examine the frequencies of genotypes and alleles of polymorphisms in the *NOS2* (rs2297518), *NOS3* (rs2070744, rs1799983, VNTR 4a/4b), and *ACE* (I/D, rs4646994) genes, as well as their association with the development of severe complications and outcome in surgical patients with secondary peritonitis.

Method: The study included 202 adult patients with secondary peritonitis. The development of ARDS, MODS, MOF, sepsis, and in-hospital mortality were monitored. Genotyping was performed using polymerase chain reaction (PCR), polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP), and real-time PCR.

Results: The genotype and allele frequencies of *NOS2* and *NOS3* gene polymorphisms were consistent with the Hardy-Weinberg equilibrium. The *NOS3* c.-786T>C (rs2070744) polymorphism was significantly associated with the development of MODS and MOF, while the TT genotype emerged as an independent predictor of these complications, with an almost fivefold higher risk of developing MOF. The T4bG haplotype was significantly associated with MODS, MOF, and sepsis.

Conclusion: The results of this study indicate that *NOS3* gene variants, particularly the c.-786T>C polymorphism and the T4bG haplotype, may be associated with susceptibility to the development of severe complications in patients with secondary peritonitis and may have a potential role in the early assessment of risk for their development.

Key words: secondary peritonitis, polymorphism, *NOS3*, *NOS2*, *ACE*, sepsis, MODS, MOF, ARDS, in-hospital mortality

Scientific field: Medicine

Scientific subfield: Molecular medicine

UDK No: _____

SADRŽAJ

1. UVOD.....	1
1.1. PERITONITIS	1
1.1.1. Definicija peritonitisa	1
1.1.2. Klasifikacija peritonitisa	1
1.1.3. Etiologija peritonitisa	2
1.1.4. Sekundarni peritonitis.....	3
1.1.4.1. Epidemiologija sekundarnog peritonitisa	3
1.1.4.2. Klinička slika i tok sekundarnog peritonitisa.....	4
1.1.4.3. Mikrobiologija sekundarnog peritonitisa.....	5
1.1.4.4. Dijagnoza sekundarnog peritonitisa	6
1.1.4.5. Lečenje sekundarnog peritonitisa.....	7
1.2. KOMPLIKACIJE SEKUNDARNOG PERITONITISA.....	7
1.2.1. Sepsa, intraabdominalna sepsa i septički šok	7
1.2.2. MODS i MOF.....	8
1.2.3. ARDS.....	9
1.2.4. Ostale sistemske komplikacije	10
1.2.5. Lokalne i regionalne komplikacije	11
1.3. MOLEKULARNA I GENETSKA OSNOVA NASTANKA TEŠKIH KOMPLIKACIJA SEKUNDARNOG PERITONITISA	13

1.3.1. Vaskularna homeostaza i endotelna disfunkcija u sekundarnom peritonitisu	13
1.3.2. Genetska komponenta u nastanku sepse i multiorganske disfunkcije	15
1.3.3. Geni kandidati povezani sa vaskularnom homeostazom i oksidativnim stresom	15
1.4. POLIMORFIZMI GENA REGULATORA VASKULARNE HOMEOSTAZE	17
1.4.1. Genski polimorfizmi – osnovni pojmovi.....	17
1.4.2. Struktura, funkcija i polimorfizmi <i>NOS2</i> gena	18
1.4.3. Struktura, funkcija i polimorfizmi <i>NOS3</i> gena	19
1.4.4. Struktura, funkcija i polimorfizmi <i>ACE</i> gena	20
2. CILJEVI ISTRAŽIVANJA	22
3. ISPITANICI I METODE.....	23
3.1. ISPITANICI.....	23
3.1.1. Prikupljanje kliničkih podataka i definicije ishoda	23
3.2. METODE	24
3.2.1. Izolacija DNK.....	24
3.2.2. Metode korišćene u detekciji polimorfizama	24
3.2.2.1. Konvencionalni PCR	25
3.2.2.1.1. Genotipizacija <i>NOS3</i> VNTR 4a/4b (rs61722009).....	27
3.2.2.1.2. Genotipizacija <i>ACE</i> I/D polimorfizma (rs4646994).....	27
3.2.2.2. PCR–RFLP (PCR uz restrikcionu digestiju)	27
3.2.2.2.1. Genotipizacija <i>NOS3</i> c.-786T>C (rs2070744) i <i>NOS3</i> c.894G>T (rs1799983)	28

3.2.2.3. Real-time PCR (TaqMan alelna diskriminacija)	29
3.2.2.3.1. Genotipizacija <i>NOS2</i> c. 1823C>T (rs2297518).....	31
3.3. Statistička obrada podataka	32
4. REZULTATI	33
4.1. Učestalost praćenih komplikacija i ishoda	35
4.2. Poređenje ispitanika prema ishodu	35
4.3. Rezultati molekularno-genetičkih analiza	37
4.3.1. Učestalosti genotipova i alela u ukupnom uzorku	37
4.3.2. Udruženost analiziranih polimorfizama sa teškim komplikacijama.....	38
4.3.2.1. Udruženost analiziranih polimorfizama sa ARDS	39
4.3.2.2. Udruženost analiziranih polimorfizama sa MODS i MOF.....	39
4.3.2.3. Udruženost analiziranih polimorfizama sa sepsom	41
4.3.3. Udruženost analiziranih polimorfizama sa intrahospitalnim mortalitetom	42
4.3.4. Analiza haplotipova <i>NOS3</i> gena	43
5. DISKUSIJA	45
6. ZAKLJUČCI.....	53
7. LITERATURA	55

1. UVOD

1.1. PERITONITIS

1.1.1. Definicija peritonitisa

Peritonitis predstavlja upalu peritoneuma, serozne membrane koja obavlja trbušnu šupljinu i intraperitonealne organe (1,2). Inflamacija može nastati kao posledica intraabdominalne infekcije, hemijskog ili mehaničkog nadražaja, povrede, perforacije šupljih organa ili delovanja drugih patoloških procesa (1–3).

U zavisnosti od etiologije, obima zahvaćenosti i težine kliničke slike, peritonitis se može manifestovati u širokom spektru – od lokalizovane infekcije sa blagim simptomima do teškog difuznog procesa praćenog sepsom i multiorganskom disfunkcijom (1–3).

1.1.2. Klasifikacija peritonitisa

Klasifikacija peritonitisa ima važnu ulogu u proceni težine bolesti, izboru terapijskog pristupa i predviđanju ishoda (4,5). Tradicionalna podela, zasnovana na tzv. Hamburškoj klasifikaciji, obuhvata etiologiju (primarni, sekundarni, tercijarni peritonitis), lokalizaciju (lokalizovani naspram difuznog) i težinu inflamatornog procesa (blagi, umereni, teški oblici) (4). Tokom poslednjih decenija razvijeno je više sistema klasifikacije, koji uzimaju u obzir tok bolesti, lokalizaciju inflamatornog procesa, mikrobiološke karakteristike i odgovor domaćina. Savremene preporuke izdate od strane Svetskog udruženja za urgentnu hirurgiju (engl. *World Society of Emergency Surgery*, WSES), u saradnji sa drugim međunarodnim organizacijama, objavljene 2021. godine, nadograđuju klasičnu Hamburšku podelu naglašavanjem kliničkog značaja tercijarnog peritonitisa i uvode stratifikaciju prema težini bolesti i stepenu sistemskog odgovora (5,6).

U svakodnevnoj praksi peritonitis se, pojednostavljeno, najčešće klasifikuje na osnovu tri glavna kriterijuma: etiologiji, lokalizaciji inflamacije i težini kliničke slike, što je prikazano u Tabeli 1 (4–6).

Tabela 1. Klasifikacija peritonitisa prema kombinovanim kriterijumima Hamburške i WSES 2021 podele

Kriterijum	Kategorije	Opis
Etiologija	Primarni (spontani)	Nastaje bez očiglednog intraabdominalnog izvora infekcije
	Sekundarni	Nastaje kao posledica perforacije organa, povrede ili postoperativnih komplikacija
	Tercijarni	Perzistentna ili rekurentna infekcija nakon adekvatnog lečenja sekundarnog peritonitisa; često kod imunokompromitovanih bolesnika;
Lokalizacija	Lokalizovani	Inflamacija ograničena na deo peritonealne šupljine, često uz apsces
	Difuzni	Inflamacija zahvata veći deo ili celu trbušnu šupljinu
Težina kliničke slike	Blagi	Bez sistemskih znakova infekcije
	Umereni	Prisustvo sistemskih znakova infekcije
	Teški	Prisustvo multiorganske disfunkcije ili sepsa

1.1.3. Etiologija peritonitisa

Etiologija peritonitisa obuhvata širok spektar uzroka, koji se mogu podeliti na infektivne i neinfektivne (7). Najčešći je infektivni peritonitis, koji nastaje usled prodora mikroorganizama u peritonealnu šupljinu. U zavisnosti od porekla infekcije, razlikuju se primarni (spontani), sekundarni i tercijarni peritonitis (1,7).

Primarni peritonitis (spontani bakterijski peritonitis, SBP) javlja se u odsustvu jasno definisanog intraabdominalnog izvora infekcije. Najčešće se viđa kod bolesnika sa cirozom jetre i ascitesom, gde translokacija bakterija iz crevnog lumena kroz intestinalni epitel u limfni sistem i peritonealnu šupljinu predstavlja osnovni mehanizam nastanka infekcije (1,7,8). Najčešći uzročnici su enterične bakterije, uključujući *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* i *Streptococcus pneumoniae*, dok se infekcije uzrokovane multirezistentnim sojevima sve češće registruju, naročito među hospitalizovanim i prethodno lečenim pacijentima (1,8). Drugi značajan oblik primarnog peritonitisa je peritonitis povezan sa peritonealnom dijalizom (PD-peritonitis), koji nastaje usled kontaminacije tokom manipulacije kateterom ili kolonizacije peritonealne šupljine preko dijaliznog sistema (1,9). U etiologiji preovlađuju gram-pozitivne bakterije, prvenstveno *Staphylococcus aureus* i koagulaza-negativni stafilokoki, dok se gram-negativne bakterije i gljivice javljaju ređe, ali su često povezane sa težim tokom bolesti (1,9).

Sekundarni peritonitis je posledica direktne kontaminacije peritoneuma sadržajem gastrointestinalnog ili ređe, urogenitalnog trakta. Može nastati usled perforacije šupljih organa, intestinalne ishemije, nekroze creva, intraperitonealnog krvarenja nakon traume ili kao postoperativna komplikacija. Ovaj oblik je obično polimikroban, a spektar patogena zavisi od mesta perforacije i osnovne bolesti (1,2,7).

Tercijarni peritonitis označava perzistentnu ili rekurentnu intraperitonealnu infekciju koja se razvija nakon inicijalno adekvatnog zbrinjavanja sekundarnog peritonitisa (5). Najčešće se razvija kod imunokompromitovanih bolesnika, pacijenata sa produženim boravkom u jedinicama intenzivne nege (JIN) ili nakon višestrukih abdominalnih intervencija (5,6). Uzročnici su uglavnom mikroorganizmi niske virulentnosti (npr. *Enterococcus spp.*, *Candida spp.*, i koagulaza-negativni stafilokoki), često sa izraženom rezistencijom na standardnu antimikrobnu terapiju (6,7). Klinička prezentacija može biti atipična i nespecifična, što dodatno otežava pravovremenu dijagnostiku i lečenje (10).

1.1.4. Sekundarni peritonitis

Sekundarni peritonitis predstavlja najčešći oblik peritonitisa i najznačajniji klinički entitet u urgentnoj abdominalnoj hirurgiji (1,2,5). Osnovni patofiziološki mehanizam je narušavanje integriteta gastrointestinalnog ili urogenitalnog trakta, što omogućava ulazak mikroorganizama, crevnog sadržaja i inflamatornih medijatora u peritonealnu šupljinu (1,2,5). Najčešći etiološki faktori uključuju perforaciju gastroduodenalnih ulkusa, perforirani apendicitis i divertikulitis, ishemiju i nekrozu creva, traumatu abdomena i postoperativne komplikacije nakon prethodnih abdominalnih intervencija (1,2,5,11).

Infekcija je u najvećem broju slučajeva polimikrobna, sa dominacijom enterične flore, uključujući *Escherichia coli*, *Klebsiella spp.*, *Enterococcus spp.* i anaerobne bakterije poput *Bacteroides fragilis* i *Clostridium spp.* (2,5,7). Kod bolesnika sa prethodnom ili produženom hospitalizacijom sve češće se javljaju multirezistentni patogeni, uključujući enterobakterije koje proizvode beta-laktamaze proširenog spektra delovanja (ESBL-proizvodeće enterobakterije), *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter spp.* i gljivice roda *Candida* (12,13).

Ishod sekundarnog peritonitisa u velikoj meri zavisi od obima peritonealne kontaminacije, virulencije uzročnika, brzine dijagnostike i pravovremenog sprovođenja kontrole izvora infekcije (engl. "source control"), u kombinaciji sa adekvatnom empirijskom i naknadno ciljano prilagođenom antimikrobnom terapijom (2,5,14). Kašnjenje u uspostavljanju kontrole izvora infekcije značajno povećava rizik od razvoja teških komplikacija, kao što su sindrom disfunkcije više organa (engl. *Multiple Organ Dysfunction Syndrome*, MODS), otkazivanje više organa (engl. *Multiple Organ Failure*, MOF), sepsa i septički šok (11,14–16). Sekundarni peritonitis je stoga povezan sa značajnim morbiditetom i mortalitetom, naročito kod starijih pacijenata, onih sa komorbiditetima, kao i kod pacijenata sa postoperativnim komplikacijama (11,13,14,16,17). Ovi podaci naglašavaju potrebu za ranim prepoznavanjem bolesnika sa povećanim rizikom od nepovoljnog ishoda, uključujući i istraživanje genetičkih determinanti inflamatornog odgovora i vaskularne homeostaze koje mogu doprineti individualnoj varijabilnosti kliničkog toka (11,16–18).

1.1.4.1. Epidemiologija sekundarnog peritonitisa

Sa stanovišta urgentne abdominalne hirurgije i javnog zdravlja, sekundarni peritonitis predstavlja najčešći etiološki oblik peritonealne infekcije i vodeći uzrok abdominalne sepe (2,5). Prema dostupnim podacima, ovaj entitet obuhvata većinu intraabdominalnih infekcija (IAI) koje zahtevaju hiruršku intervenciju (1,2,5). Učestalost i etiološka struktura variraju u zavisnosti od karakteristika populacije i nivoa zdravstvene zaštite: u opštoj populaciji dominiraju perforirani apendicitis i divertikulitis, dok u tercijarnim ustanovama i JIN

preovlađuju postoperativni i posttraumatski slučajevi (1,13). Uprkos unapređenju dijagnostičkih i terapijskih protokola, uključujući ranu primenu antibiotika i pravovremenu kontrolu izvora infekcije, mortalitet kod sekundarnog peritonitisa i dalje ostaje visok. U većini studija stopa smrtnosti iznosi 20–30%, dok kod bolesnika sa septičkim šokom, odloženom hirurškom intervencijom ili značajnim komorbiditetima može prelaziti 40% (5,13,15,17). Na ishod utiču brojni faktori, uključujući životnu dob, komorbiditete, prisustvo multirezistentnih patogena, povišene prognostičke skorove, kao što su *Mannheim Peritonitis Index* (MPI), *Acute Physiology and Chronic Health Evaluation II* (APACHE II) i *Sequential Organ Failure Assessment* (SOFA), kao i vreme do adekvatnog operativnog zbrinjavanja (5,14–17).

Podaci iz Srbije i regiona ukazuju na slične epidemiološke obrasce, sa visokim udelom difuznih oblika sekundarnog peritonitisa, značajnim rizikom od razvoja sepse i MODS, kao i rastućim trendom infekcija uzrokovanih multirezistentnim mikroorganizmima (11,12). Nedostatak standardizovanih nacionalnih registara za sekundarni peritonitis dodatno naglašava potrebu za lokalnim istraživanjima i identifikacijom prognostičkih faktora, uključujući i genske markere, što je u skladu sa ciljevima ove disertacije.

1.1.4.2. Klinička slika i tok sekundarnog peritonitisa

Klinička slika sekundarnog peritonitisa u velikoj meri zavisi od mesta perforacije, uzroka i težine infekcije. Perforacije gornjeg dela gastrointestinalnog trakta (npr. gastrični ili duodenalni ulkus), obično se manifestuju naglim nastupom bola i brзом generalizacijom peritonitisa, dok perforacije donjeg dela trakta (kolon, divertikulum) često imaju podmutliji tok, sa izraženijom sistemskom inflamacijom (1,2).

Bolest najčešće ima akutan tok, sa naglo nastalim abdominalnim bolom, mučninom, povraćanjem, febrilnošću i znacima peritonealne iritacije. Napredovanjem procesa, javljaju se meteorizam, paralitički ileus i tahikardija (2,13), uz laboratorijske pokazatelje sistemske inflamacije (leukocitoza, povišen CRP i prokalcitonin) (19). Tok bolesti može biti i subakutan ili atipičan, naročito kod starijih i imunokompromitovanih bolesnika, gde klasični znaci peritonealne iritacije mogu izostati, dok nespecifični simptomi dominiraju kliničkom slikom (1,2,13). Takva atipična prezentacija često dovodi do odlaganja dijagnoze, čime se povećava rizik od komplikacija i smrtnog ishoda (2,5,14). Ukoliko se infekcija ne prepozna i ne zbrine pravovremeno, može doći do progresije inflamatornog odgovora, povećanja kapilarne permeabilnosti, hipovolemije i tkivne hipoperfuzije, nakon čega bolest prelazi u teški oblik IAI sa potencijalnim razvojem sepse, cirkulacionom nestabilnošću i potrebom za intenzivnom hemodinamskom podrškom (13,14). Ako dođe do napredovanja u septički šok, on se karakteriše refraktornom hipotenzijom uprkos adekvatnoj infuzionoј terapiji, uz potrebu za vazopresorima (20). Pored toga, nekontrolisana inflamacija i hipoperfuzija mogu dovesti do oštećenja vitalnih organa, prvenstveno bubrega, pluća i jetre, što se klinički manifestuje razvojem MODS, akutnom bubrežnom insuficijencijom, respiratornom insuficijencijom sa mogućim razvojem akutnog respiratornog distres sindroma (ARDS) i poremećajima koagulacije (13,14,21–24).

1.1.4.3. Mikrobiologija sekundarnog peritonitisa

Mikrobiološki profil sekundarnog peritonitisa u najvećoj meri odražava polimikrobnu prirodu kontaminacije peritonealne šupljine sadržajem gastrointestinalnog trakta. Uobičajeno se izoluje kombinacija Gram-negativnih bacila, Gram-pozitivnih koka i anaerobnih bakterija (1,5,13,25).

Među Gram-negativnim patogenima najčešće se identifikuju *Escherichia coli* i druge vrste iz porodice *Enterobacteriaceae*, dok su enterični anaerobi (posebno *Bacteroides fragilis*) naročito značajni kod infekcija poreklom iz kolona (5,13,25). Gram-pozitivni mikroorganizmi, naročito *Enterococcus spp.*, češće se detektuju u bolničkim i postoperativnim oblicima bolesti, u odnosu na infekcije nastale u vanbolničkim uslovima (5,12,26).

U poslednjim decenijama zabeležen je porast antimikrobne rezistencije kod komplikovanih intraabdominalnih infekcija, uključujući ESBL-produkujuće enterobakterije i druge nozokomijalne multirezistentne patogene, dok u pojedinim sredinama sve veći značaj imaju i karbapenem-rezistentne enterobakterije (5,25). Kod bolničkih infekcija, posebno kod pacijenata lečenih u JIN ili sa ponovljenim abdominalnim intervencijama klinički značaj imaju i *Staphylococcus aureus* rezistentan na meticilin (MRSA) i *Enterococcus* otporan na vankomicin (VRE) (5,7,14,26). Ovi sojevi značajno utiču na izbor empirijske antimikrobne terapije, zbog čega su pravovremena mikrobiološka dijagnostika i prilagođavanje terapije na osnovu antibiograma od suštinskog značaja (5,14). Spektar izolovanih mikroorganizama značajno zavisi od anatomskog izvora infekcije. Najčešća mesta izvora infekcije, odgovarajuće grupe mikroorganizama i dominantni uzročnici sumirani su u Tabeli 2.

Tabela 2. Lokalizacija infekcije i najčešći mikroorganizmi kod sekundarnog peritonitisa

Lokalizacija / izvor infekcije	Mikroorganizmi (grupa i najčešći uzročnici)	Napomena / reference
Gornji GIT: želudac, duodenum	Gram-negativne bakterije (<i>E. coli</i> , <i>Klebsiella spp.</i>), Gram-pozitivne koke (<i>Enterococcus spp.</i>), anaerobi	Perforacije ulkusa; brza generalizacija peritonitisa; obično monomikrobna infekcija u ranom stadijumu (1,5)
Donji GIT: kolon, divertikulitis, apendiks i ileocekalna regiju	Polimikrobne infekcije: enterična flora (<i>E. coli</i> , <i>Enterobacter spp.</i> , <i>Bacteroides fragilis</i> , <i>Clostridium spp.</i> , anaerobi)	Najčešći izvor sekundarnog peritonitisa; visoka učestalost anaeroba (5,13,25)
Žučni putevi i žučna kesa	<i>Enterococcus spp.</i> , <i>Klebsiella spp.</i> , <i>E. coli</i>	Perforacije i bilijarne infekcije; mogu biti postoperativne ili nastati zbog kamena u duktusu (1,5)
Urogenitalni trakt	<i>E. coli</i> , <i>Proteus spp.</i> , <i>Enterococcus spp.</i>	Redi izvor peritonitisa; povezan sa infekcijama urinarnog trakta i instrumentacijom (1,5)

Postoperativni i posttraumatski oblici bolesi	<i>Enterococcus spp.</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> (uklj. MRSA), <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>Acinetobacter spp.</i> , <i>Candida spp.</i>	Česti uzročnici tercijarnog i bolničkog peritonitisa; visoka stopa rezistencije; potreban ciljani antibiotik prema antibiogramu (5,7,12,14)
---	---	---

1.1.4.4. Dijagnoza sekundarnog peritonitisa

Dijagnoza sekundarnog peritonitisa zasniva se na integraciji kliničkih, laboratorijskih, mikrobioloških i radioloških nalaza, uz istovremenu procenu hemodinamske stabilnosti i ranog prepoznavanja sepse i njenih komplikacija. Pravovremeno postavljanje dijagnoze je od presudnog značaja, budući da i kratko kašnjenje značajno povećava rizik od životno ugrožavajućih komplikacija (5,27).

Anamneza i klinički pregled predstavljaju polaznu tačku, ali su često nedovoljni za definitivnu potvrdu dijagnoze, naročito kod starijih i imunokompromitovanih bolesnika sa atipičnim simptomima. Zato se dijagnostički pristup oslanja na kombinaciju kliničkih nalaza, laboratorijskih parametara i radioloških metoda (13).

Laboratorijska dijagnostika uključuje određivanje nespecifičnih markera inflamacije (broj leukocita, CRP i prokalcitonin), koji mogu pomoći u razlikovanju lokalizovane infekcije od sistemskog inflamatornog odgovora. Povišen serumski laktat važan je pokazatelj tkivne hipoperfuzije i ranog septičkog šoka (5,27).

Radiološke metode imaju ključnu ulogu u potvrdi dijagnoze i identifikaciji izvora infekcije. Ultrazvuk abdomena može pomoći u detekciji slobodne tečnosti, apscesa ili dilatacije creva, ali je ograničen u proceni dubokih struktura. Multislasna kompjuterizovana tomografija (engl. *Multi-Slice Computed Tomography*, MSCT) abdomena sa intravenskim kontrastom smatra se zlatnim standardom, jer omogućava detekciju perforacija, ekstraluminalnog gasa i kolekcija tečnosti, kao i procenu opsega inflamacije i vaskularne perfuzije (5,13,27). Kombinacija CT-a i ultrazvuka često pruža optimalnu dijagnostičku procenu, posebno kod hemodinamski nestabilnih bolesnika i u JIN (26).

Mikrobiološka dijagnostika obuhvata analizu peritonealne tečnosti i hemokultura uzetih pre započinjanja antimikrobne terapije. Izolacija uzročnika omogućava diferencijaciju između infekcija stečenih u zajednici i bolničkih (nozokomijalnih) infekcija, kao i prilagođavanje terapije prema antibiogramu (5,12,27). Kod sumnje na multirezistentne patogene i kod teških oblika bolesti, u centrima gde je dostupno, mogu se primeniti brze molekularne metode zasnovane na PCR tehnologiji kao dopuna standardnim mikrobiološkim kulturama, radi ranije identifikacije uzročnika i usmeravanja antimikrobne terapije (27,28).

Pored identifikacije uzročnika, dijagnostički proces mora uključiti procenu težine bolesti pomoću validiranih scoring sistema, kao što su MPI, APACHE II i SOFA skor. Ovi alati pomažu u proceni prognoze i izboru optimalnog terapijskog pristupa (15,17).

Sekundarni peritonitis je, uprkos savremenim dijagnostičkim i terapijskim modalitetima, i dalje praćen značajnim rizikom od razvoja teških komplikacija. Najvažnije među njima su MODS, MOF i ARDS, sepsa i septički šok, kao i brojne lokalne i regionalne komplikacije koje

produžavaju tok lečenja i utiču na konačan ishod (5,14,16,29–31). O ovim komplikacijama biće detaljnije reči u narednom poglavlju.

1.1.4.5. Lečenje sekundarnog peritonitisa

Savremeni pristup lečenju sekundarnog peritonitisa zasniva se na tri međusobno povezane komponente: ranoj hemodinamskoj stabilizaciji, pravovremenoj i adekvatnoj primeni antimikrobne terapije i efikasnoj kontroli izvora infekcije (hirurškom intervencijom ili perkutanom dreniranjem), uz multidisciplinarni pristup lečenju (5,14,26,27). Sa kliničkog stanovišta, od presudnog značaja je rano prepoznavanje sepsa i septičkog šoka, uz blagovremeno započinjanje infuzione terapije, ciljano uvođenje vazopresora i praćenje laktata (27,32). Po potrebi se može primeniti oksigenoterapija i mehanička ventilacija kod pacijenata sa respiratornom insuficijencijom ili ARDS-om, uz korekciju elektrolitnih poremećaja i rano započinjanje nutritivne podrške kada je izvodljivo (26,32,33).

Empirijska antimikrobna terapija bira se u skladu sa lokalizacijom i mehanizmom perforacije, težinom kliničke slike i procenom rizika za infekciju multirezistentnim patogenima (npr. prethodna hospitalizacija, boravak u JIN, nedavna antibiotska terapija) (5,27). Nakon dobijanja mikrobioloških rezultata terapija se sužava na najuži delotvorni spektar (5,29). Kada je izvor infekcije adekvatno kontrolisan, preporučuje se kraće trajanje antibiotske terapije (otprilike 4–7 dana), uz produženje samo u slučaju perzistiranja infektivnog žarišta ili pojave komplikacija (5,27,29).

Kontrola izvora infekcije obuhvata perkutanu drenažu drenabilnih kolekcija pod kontrolom slikovnih metoda, kao i hirurške procedure (laparoskopija ili laparotomija) sa ciljem zatvaranja perforacije, resekcije nekrotičnih segmenata, toaleta i drenaže peritonealne duplje. Kod teških difuznih i postoperativnih oblika danas se, kada god je to moguće, daje prednost relaparotomiji „po potrebi“ u odnosu na rutinski planirane relaparotomije, a pokazano je da rano i adekvatno zbrinjavanje izvora infekcije značajno poboljšava ishod (5,14,27).

Optimalno lečenje zahteva blisku saradnju hirurga, anesteziologa, intenziviste, infektologa i mikrobiologa, uz kontinuirano praćenje hemodinamskog statusa, stepena organske disfunkcije i inflamatornih markera, kao i pravovremeno prilagođavanje terapijskog pristupa (26,27,29).

1.2. KOMPLIKACIJE SEKUNDARNOG PERITONITISA

Sekundarni peritonitis je praćen širokim spektrom lokalnih i sistemskih komplikacija koje značajno utiču na tok lečenja i konačan ishod bolesti. Pored lokalnih i regionalnih komplikacija u vidu intraabdominalnih apscesa, dehiscencije anastomoze, enterokutanih fistula i produženog ileusa, od posebnog kliničkog značaja su teški sistemski oblici, kao što su sepsa, septički šok, MODS, MOF i ARDS. Ove komplikacije odražavaju intenzitet sistemskog inflamatornog odgovora i stepen poremećaja vaskularne homeostaze, te u najvećoj meri određuju rizik od smrtnog ishoda kod bolesnika sa sekundarnim peritonitisom (2,13,14,16,34). U nastavku će biti prikazane najvažnije komplikacije sekundarnog peritonitisa, sa posebnim osvrtom na one koje su u fokusu ovog istraživanja.

1.2.1. Sepsa, intraabdominalna sepsa i septički šok

Sepsa predstavlja jednu od najvažnijih sistemskih komplikacija sekundarnog peritonitisa i ključni mehanizam koji vodi ka razvoju organske disfunkcije i smrtnog ishoda (2,13). Prema savremenim *Sepsis-3* kriterijumima, sepsa se definiše kao životno ugrožavajuća disfunkcija organa nastala usled disregulisanog odgovora organizma na infekciju (20). U kontekstu sekundarnog peritonitisa, razvoj sepse odražava prelazak lokalne intraperitonealne infekcije u sistemski inflamatorni odgovor udružen sa poremećajem vaskularne homeostaze, mikrocirkulacije i perfuzije tkiva, sa mogućom progresijom ka organskoj disfunkciji i septičkom šoku (13,14,35).

Pojam intraabdominalna sepsa koristi se za opis sepse ili septičkog šoka kod bolesnika sa potvrđenom ili visoko verovatnom intraabdominalnom infekcijom kao primarnim izvorom, uključujući difuzni ili lokalizovani peritonitis, intraabdominalne apscese i postoperativne infekcije (5,14,36). Sekundarni peritonitis predstavlja vodeći uzrok intraabdominalne sepse u hirurškoj populaciji, a prisustvo sepse i potrebe za intenzivnim lečenjem povezano je sa značajno višom stopom mortaliteta u odnosu na bolesnike sa izolovanom lokalnom intraabdominalnom infekcijom (5,14).

Septički šok predstavlja najteži oblik sepse i karakteriše se perzistentnom arterijskom hipotenzijom uprkos adekvatnoj volumenskoj nadoknadi, uz potrebu za vazopresorskom podrškom i prisustvo hiperlaktatemije kao znaka tkivne hipoperfuzije (20). Kod bolesnika sa sekundarnim peritonitisom i razvojem septičkog šoka mortalitet je značajno viši u odnosu na pacijente sa lokalizovanom infekcijom ili sepsom bez hemodinamske nestabilnosti, što potvrđuju podaci iz više studija i preglednih radova (13,14,34,35).

Globalne analize tereta bolesti (engl. *Global Burden of Disease*, GBD) za 2021. godinu ukazuju da je sepsa bila povezana sa približno trećinom svih smrtnih ishoda na globalnom nivou (37). Sepsa je stoga prepoznata kao globalni prioritet javnog zdravlja, uz naglašenu potrebu za unapređenjem prevencije, ranog prepoznavanja i zbrinjavanja, posebno u zemljama sa niskim i srednjim prihodima (38,39). Intraabdominalne infekcije, uključujući sekundarni peritonitis, ubrajaju se među najčešće izvore sepse u hirurškoj populaciji, što dodatno naglašava klinički značaj pravovremenog prepoznavanja i optimalnog zbrinjavanja ovih bolesnika (5,37–39).

1.2.2. MODS i MOF

Sistemska inflamacija, endotelna disfunkcija i poremećaji mikrocirkulacije mogu dovesti do progresivnog otkazivanja više organskih sistema kod bolesnika sa sekundarnim peritonitisom (13,16,40). MODS označava kliničko stanje karakterisano istovremenom ili uzastopnom disfunkcijom više organskih sistema, pri čemu organizam više nije u stanju da održi homeostazu bez intenzivne terapijske podrške (16). U terminalnim stadijumima, MODS može napredovati ka ireverzibilnom otkazivanju više organa, odnosno MOF-u, praćenom visokom stopom smrtnosti (14,16).

Najčešće su pogođeni bubrezi, pluća, jetra, kardiovaskularni i koagulacioni sistem, pri čemu promena funkcije ovih organa odražava posledice globalne hipoperfuzije, inflamatornog oštećenja endotela i poremećaja regulacije vaskularnog tonusa (21–24,40). Klinička slika multiorganskog otkazivanja obuhvata kombinaciju akutnog oštećenja bubrega sa oligoanurijom ili potrebom za nadoknadom bubrežne funkcije, respiratorne insuficijencije

koja zahteva mehaničku ventilaciju, cirkulatorne nestabilnosti sa potrebom za vazopresorskom podrškom, hepatocelularne insuficijencije i koagulopatije, često udružene sa metaboličkom acidozom i laktacidozom (14,21–24).

Prisustvo MODS-a prepoznato je kao jedan od najsnažnijih prediktora nepovoljnog ishoda kod bolesnika sa sekundarnim peritonitisom. Studije su pokazale da smrtnost značajno raste sa brojem zahvaćenih organskih sistema i stepenom njihove disfunkcije, pri čemu kod bolesnika sa izraženim MODS-om i MOF-om može prelaziti 40% (2,14,16,34). Ovi nalazi su u skladu sa rezultatima savremenih istraživanja koja ističu da multiorganska disfunkcija predstavlja jedan od dominantnih prognostičkih činilaca kod akutnih intraabdominalnih infekcija, uključujući sekundarni peritonitis, uz životnu dob ili komorbiditete (13,34).

U kliničkoj praksi, prisustvo i težina MODS-a procenjuju se pomoću validiranih scoring sistema, kao što su SOFA i APACHE II, dok MPI omogućava specifičnu procenu rizika kod pacijenata sa peritonitisom (16,34). Viši skorovi na ovim skalama konzistentno su povezani sa većom verovatnoćom razvoja multiorganske disfunkcije i smrtnog ishoda, što naglašava njihovu vrednost u ranoj identifikaciji visokorizičnih bolesnika i planiranju intenziteta terapijskog pristupa (2,34).

1.2.3. ARDS

ARDS predstavlja najteži oblik akutne hipoksemijske respiratorne insuficijencije, koji nastaje kao posledica difuznog inflamatornog oštećenja alveolo-kapilarne barijere, uz bilateralne infiltrate na radiografiji ili CT-u pluća, koja se ne mogu u potpunosti objasniti srčanom insuficijencijom ili preopterećenjem tečnošću (21,41,42). Klasično se razlikuju blagi, umereni i teški ARDS u zavisnosti od stepena hipoksemije, dok etiološki spektar obuhvata direktne (pneumonija, aspiracija) i indirektne uzroke (sepsa, politrauma, pankreatitis, transfuzijske reakcije) (21,41–43).

Na patofiziološkom nivou, ARDS je karakterisan oštećenjem endotelnih i epitelnih ćelija alveolo-kapilarne barijere, povećanom vaskularnom permeabilnošću, nakupljanjem eksudata bogatog proteinima u alveolarnim prostorima, poremećajem ventilaciono-perfuzionog odnosa i razvojem teške, često refraktorne hipoksemije (43–45). Endotelna disfunkcija ima centralnu ulogu u nastanku i progresiji ARDS-a, povezujući lokalnu plućnu povredu sa sistemskim inflamatornim odgovorom, mikrocirkulatornim poremećajima i razvojem MODS (44,45).

Sepsa je najčešći indirektni uzrok ARDS, pri čemu bolesnici sa sepsom i septičkim šokom imaju najveći rizik od razvoja teških oblika ARDS i nepovoljnog ishoda (21,42). Kod hirurških pacijenata sa teškim IAI, među kojima je i sekundarni peritonitis, razvoj abdominalne sepse i postoperativnog ARDS povezan je sa većim morbiditetom, potrebom za invazivnom ventilacionom i hemodinamskom podrškom i povećanim rizikom od smrtnog ishoda (46).

Novija istraživanja pokazuju da ARDS nije jedinstven entitet, već obuhvata više bioloških i kliničkih podtipova koji se razlikuju po jačini inflamacije, obrascu vaskularne i endotelne povrede i načinu na koji pacijenti reaguju na terapiju (42,43,45). Ovakav koncept je posebno važan u kontekstu sekundarnog peritonitisa, gde kombinacija sistemske inflamacije, poremećaja vaskularne homeostaze i endotelne disfunkcije predstavlja ključnu kariku u

razvoju teških komplikacija, uključujući ARDS i MODS, što dodatno opravdava istraživanje naslednih determinanti vaskularne homeostaze u ovoj populaciji bolesnika (31,45).

1.2.4. Ostale sistemske komplikacije

Pored sepse, septičkog šoka, MODS, MOF i ARDS, sekundarni peritonitis može biti praćen čitavim nizom drugih sistemskih komplikacija koje dodatno opterećuju tok lečenja i doprinose nepovoljnom ishodu. Najvažnije među njima su akutno oštećenje bubrega (AOB), hepatična disfunkcija, koagulopatije i tromboembolijske komplikacije, kao i izraženi metabolički poremećaji (2,13,14,34).

AOB je česta i klinički značajna komplikacija sepse i intraabdominalnih infekcija. Patofiziološki, AOB udružen sa sepsom nastaje kao posledica kombinacije sistemske i intrarenalne hipoperfuzije, inflamatornog oštećenja endotela i tubularnih ćelija, mikrovaskularne tromboze i poremećene regulacije protoka krvi u bubrežima (47–49). Kod bolesnika sa sekundarnim peritonitisom, prisustvo AOB povezano je sa produženom hospitalizacijom, češćom potrebom za nadoknadom bubrežne funkcije i značajno višom stopom mortaliteta u poređenju sa pacijentima bez bubrežne disfunkcije (13,14,22). Sepsom indukovano AOB često se javlja u sklopu šire multiorganske disfunkcije i povezan je sa težim kliničkim tokom koji može doprineti progresiji ka MOF (48,49).

Hepatična disfunkcija kod bolesnika sa sekundarnim peritonitisom najčešće je posledica udruženog dejstva sistemske inflamacije, hipoperfuzije i sepsom izazvaneolestaze. Klinički se ispoljava porastom serumskih transaminaza i bilirubina, a može biti praćeno i poremećajem sintezne funkcije jetre, uključujući produženo protrombinsko vreme i hipoalbuminemiju (23,50). Prisustvo hepatične disfunkcije u sepsi povezano je sa težim tokom bolesti i lošijom prognozom, naročito kod bolesnika sa prethodnim hroničnim oboljenjima jetre (50,51).

Koagulacioni poremećaji su gotovo redovno prisutni kod teške sepse i sekundarnog peritonitisa i obuhvataju spektar od blage trombocitopenije i produženih koagulacionih vremena do diseminovane intravaskularne koagulacije (DIK) (24,52). Inflamatorna aktivacija endotela dovodi do pojačane ekspresije tkivnog faktora (faktor III) i smanjene aktivnosti prirodnih antikoagulanasa, pre svega antitrombina i proteina C i S. Ovakav disbalans pogoduje stvaranju mikrotromboza u mikrocirkulaciji, dok istovremeno poremećena fibrinoliza i trošenje koagulacionih faktora povećavaju sklonost ka krvarenju (24,31,53). Kod bolesnika sa sekundarnim peritonitisom, prisustvo koagulopatije povezano je sa većom učestalošću krvarenja, težim hemodinamskim poremećajima i nepovoljnijim ishodom, naročito u sklopu DIK-a i uznapredovalog MODS (13,14). Pored koagulopatije, kod ovih bolesnika povećan je i rizik od tromboembolijskih komplikacija, uključujući duboku vensku trombozu i plućnu emboliju. Sistemska inflamacija, hiperkoagulabilno stanje u sepsi, produženo ležanje i prisustvo centralnih venskih katetera doprinose nastanku venskog tromboembolizma (53,54).

Metabolički poremećaji, uključujući poremećaje glikoregulacije, laktacidozu i izražen elektrolitski disbalans, dodatno otežavaju kliničko zbrinjavanje ovih bolesnika i zahtevaju kontinuirano laboratorijsko praćenje i pažljiv hemodinamski nadzor (55,56).

Posmatrano u celini, ove „ostale“ sistemske komplikacije ne deluju izolovano, već se međusobno prepliću u sklopu kompleksne slike sepse i multiorganske disfunkcije, značajno doprinoseći morbiditetu i mortalitetu bolesnika sa sekundarnim peritonitisom (13,14,34). Glavne sistemske komplikacije sekundarnog peritonitisa, sa njihovim osnovnim patofiziološkim mehanizmima i kliničkim značajem, prikazane su u Tabeli 3.

Tabela 3. Sistemske komplikacije sekundarnog peritonitisa

Komplikacija	Osnovni patofiziološki mehanizmi	Klinički značaj/ishod
Sepsa/septički šok	Disregulisan inflamatorni odgovor; endotelna disfunkcija; vazodilatacija;	Hemodinamska nestabilnost; potreba za intenzivnim lečenjem; visok mortalitet;
MODS i MOF	Udružena disfunkcija više organa; mikrocirkulatorni i metabolički poremećaji	Česta potreba za organ-supstitucionom terapijom; snažni prediktori lošeg ishoda
ARDS	Oštećenje alveolo–kapilarne barijere; povećana permeabilnost; mikrotromboza	Teška hipoksemija; mehanička ventilacija; porast mortaliteta
AOB	Hipoperfuzija; inflamatorno oštećenje endotela i tubula; mikrotromboza	Nadoknada bubrežne funkcije; produžena hospitalizacija;
Hepatična disfunkcija	Sistemska inflamacija; hipoperfuzija;olestaza;	Hiperbilirubinemija i koagulopatija; lošija prognoza
Koagulopatije/DIK	Aktivacija tkivnog faktora; gubitak antikoagulanasa; potrošnja faktora koagulacije	Mikrotromboza i krvarenje; pogoršanje organske disfunkcije;
Venski tromboembolizam	Hiperkoagulabilnost; produženo ležanje; kateteri	Dodatni morbiditet; rizik od naglog pogoršanja
Metabolički poremećaji	Poremećena glikoregulacija; laktacidoza; elektrolitski disbalans	Otežano zbrinjavanje; veća učestalost komplikacija;

1.2.5. Lokalne i regionalne komplikacije

Pored sistemskih, sekundarni peritonitis je praćen i brojnim lokalnim i regionalnim komplikacijama koje značajno utiču na tok lečenja, trajanje hospitalizacije i potrebu za ponovnim intervencijama (2,13,25). Među najvažnijim su intraabdominalni apscesi, dehiscencija anastomoze, enterokutane fistule, perzistentni ili rekurentni peritonitis i produženi postoperativni ileus (2,13,25,57,58).

Intraabdominalni apscesi najčešće nastaju kao posledica nedovoljne kontrole izvora infekcije, neadekvatne drenaže ili progresije lokalizovanog peritonitisa (13,26,59). Mogu biti lokalizovani u različitim delovima peritonealne duplje, uključujući karlični i subfrenični prostor, kao i u neposrednoj blizini digestivnih anastomoza (60,61). Prisustvo apscesa povezano je sa perzistiranjem febrilnosti i laboratorijskih znakova inflamacije, produženom primenom antimikrobne terapije, potrebom za dodatnim perkutanim ili hirurškim intervencijama, kao i povećanim rizikom od razvoja sepse i nepovoljnijeg kliničkog toka (25,26,61).

Dehiscencija digestivnih anastomoza predstavlja jednu od najozbiljnijih lokalnih komplikacija hirurškog lečenja sekundarnog peritonitisa (2,14). Dehiscencija anastomoze dovodi do isticanja intestinalnog sadržaja u peritonealnu duplju i razvoja novog ili pogoršanja postojećeg peritonitisa, što može biti praćeno sepsom i septičkim šokom (62,63). Ova komplikacija povezana je sa visokim stopama morbiditeta i mortaliteta, produženom hospitalizacijom, potrebom za reoperacijama i većom verovatnoćom nastanka enterokutanih fistula (57,62,64).

Enterokutane fistule nastaju kao patološka komunikacija između lumena gastrointestinalnog trakta i kože, a najčešće su postoperativnog porekla, naročito nakon dehiscencije anastomoze ili jatrogenih povreda creva. One dovode do kontinuiranog gubitka digestivnog sadržaja, narušene ravnoteže tečnosti i elektrolita, malnutricije i povećanog rizika od lokalnih i sistemskih infektivnih komplikacija (57,65). Lečenje enterokutanih fistula je složeno i dugotrajno i obično zahteva kombinaciju intenzivne nutritivne podrške, adekvatne kontrole infekcije, optimalnog zbrinjavanja kožnih i mekotkivnih lezija oko fistule i, kod bolesnika kod kojih ne dođe do spontanog zatvaranja, ponovnu hiruršku intervenciju, uz produžen boravak u bolnici i visok terapijski trošak (57,65).

Perzistentni ili rekurentni peritonitis najčešće je posledica nedovoljne inicijalne kontrole izvora infekcije, zaostalog intraabdominalnog fokusa, uključujući apsces ili dehiscenciju anastomoze, kao i infekcije nozokomijalnim, multirezistentnim ili gljivičnim patogenima. Ovakva stanja često zahtevaju ponovnu dijagnostičku procenu, dodatne hirurške ili perkutane intervencije i prilagođavanje antimikrobne terapije, a povezana su sa perzistiranjem ili progresijom sepse, organske disfunkcije i povećanim rizikom od smrtnog ishoda (13,14,25).

Produženi postoperativni ileus predstavlja čestu regionalnu komplikaciju nakon abdominalnih operacija, uključujući i zahvate koji se izvode zbog sekundarnog peritonitisa. Nastaje usled kombinovanog delovanja inflamatornog odgovora peritoneuma i crevnog zida, manipulacije crevima tokom operacije, poremećaja ravnoteže tečnosti i elektrolita, kao i primene opioidnih analgetika (58,66). Klinički se najčešće ispoljava odsustvom stolice i gasova, distenzijom abdomena, mučninom, povraćanjem i netolerancijom peroralne ishrane, a kod pojedinih bolesnika može zahtevati privremenu gastrointestinalnu dekompresiju i odlaganje ponovnog uvođenja peroralne ishrane (58,66). Iako obično nema neposredan letalan ishod, produženi postoperativni ileus doprinosi produženju hospitalizacije, povećanju postoperativnog morbiditeta i sporijem oporavku bolesnika (58,66).

Ukupno gledano, ove lokalne i regionalne komplikacije mogu predstavljati izvor perzistentne ili ponovljene intraabdominalne infekcije, doprineti razvoju sepse, progresiji organske disfunkcije i nastanku ARDS-a, te na taj način posredno uticati na mortalitet. Zbog toga pravovremeno prepoznavanje i adekvatno zbrinjavanje lokalnih komplikacija predstavljaju važan deo integralnog pristupa lečenju bolesnika sa sekundarnim peritonitisom (2,13,25,42). Najvažnije lokalne i regionalne komplikacije sekundarnog peritonitisa, njihovi osnovni mehanizmi nastanka i uticaj na tok lečenja, sumirane su u Tabeli 4.

Tabela 4. Lokalne i regionalne komplikacije sekundarnog peritonitisa

Komplikacija	Osnovni patofiziološki mehanizmi	Klinički značaj/ishod
Intraabdominalni apsces	Neadekvatna kontrola izvora; neadekvatna drenaža; progresija lokalnog peritonitisa	Perzistentna infekcija; potreba za dodatnim intervencijama; veći rizik od sepse i nepovoljnijeg kliničkog toka
Dehiscencija anastomoze	Lokalna ishemija; infekcija; komorbiditeti	Novi ili pogoršani peritonitis; reoperacije; veći morbiditet i mortalitet
Enterokutane fistule	Postoperativno poreklo; dehiscencija anastomoze; jatrogene povrede creva	Gubitak sadržaja; poremećaj tečnosti i elektrolita; malnutricija; dugotrajno i skupo lečenje
Perzistentni / rekurentni peritonitis	Nedovoljna inicijalna kontrola izvora; zaostali intraabdominalni fokus; nozokomijalni, multirezistentni ili gljivični patogeni	Dodatne intervencije; produžena antibiotska terapija; veći rizik od sepse i smrtnog ishoda
Produženi postoperativni ileus	Inflamatorni odgovor peritoneuma; manipulacija crevima tokom operacije; poremećaji ravnoteže tečnosti i elektrolita; primena opioidnih analgetika	Distenzija, mučnina, povraćanje; odlaganje peroralne ishrane; produžena hospitalizacija; sporiji oporavak;

1.3. MOLEKULARNA I GENETSKA OSNOVA NASTANKA TEŠKIH KOMPLIKACIJA SEKUNDARNOG PERITONITISA

1.3.1. Vaskularna homeostaza i endotelna disfunkcija u sekundarnom peritonitisu

Vaskularna homeostaza predstavlja finu ravnotežu između vazodilatatornih i vazokonstriktornih, prokoagulantnih i antikoagulantnih, kao i proinflamatornih i antiinflamatornih mehanizama u krvnim sudovima. Ključnu ulogu u održavanju ove ravnoteže ima vaskularni endotel, koji se danas ne posmatra samo kao pasivna obloga krvnih sudova, već kao metabolički aktivan i dinamičan organ sa brojnim endokrinim, parakrinim i autokrinim funkcijama. Endotelne ćelije učestvuju u regulaciji vaskularnog tonusa, hemostaze, inflamatornog odgovora i permeabilnosti mikrocirkulacije, što je od ključnog značaja za adekvatnu perfuziju tkiva i funkciju vitalnih organa (67,68).

Regulacija tonusa glatkih mišića krvnih sudova ostvaruje se oslobađanjem različitih vazodilatatornih i vazokonstriktornih medijatora. Među najvažnijim endotelno zavisnim vazodilatatorima nalaze se azot-monoksid (NO) i prostaciklin, dok endotel produkuje i potentne vazokonstriktore, kao što su endotelin-1, angiotenzin II i tromboksan A₂ (68,69). Pored toga, endotel aktivno učestvuje u održavanju hemostatske ravnoteže sintezom prirodnih antikoagulanasa i regulacijom ekspresije prokoagulantnih molekula, čime se

održava balans između stvaranja i razgradnje tromba. U fiziološkim uslovima takva ravnoteža obezbeđuje prohodnost mikrocirkulacije, stabilan arterijski pritisak i adekvatnu oksigenaciju tkiva (67,68).

NO je jedan od ključnih regulatora vaskularne homeostaze. U endotelu se predominantno sintetiše dejstvom endotelne NO-sintaze (eNOS, NOS3), konstitutivnog enzima čija je aktivnost zavisna od intracelularne koncentracije kalcijuma i prisustva odgovarajućih kofaktora. U fiziološkim koncentracijama, NO dovodi do relaksacije vaskularne glatke muskulature, inhibicije agregacije trombocita, smanjenja adhezije leukocita za endotel i ograničavanja proliferacije glatkih mišićnih ćelija, čime doprinosi očuvanju vaskularne homeostaze i funkcije endotela (67,70). Nasuprot tome, inducibilna NO-sintaza (iNOS, NOS2), koja se snažno aktivira u uslovima inflamacije i teških infekcija, može dovesti do izrazitog povećanja produkcije NO, što doprinosi patološkoj sistemskoj vazodilataciji, smanjenoj vaskularnoj reaktivnosti na vazopresore, refraktarnoj hipotenziji i poremećaju tkivne perfuzije (70–72).

Savremeni pregledi ukazuju da je NO signalni put izrazito kompleksan i da u teškim infekcijama, uključujući sekundarni peritonitis sa sepsom, može imati i zaštitne i štetne efekte, u zavisnosti od izoforme NO-sintaze, koncentracije NO i ciljnog tkiva (70,71,73,74). Pored NO, prostaciklin, takođe endotelnog porekla, deluje kao snažan vazodilatator i inhibitor agregacije trombocita, dok endotelin-1 predstavlja jedan od najpotentnijih endogenih vazokonstriktora (69). Ravnoteža između NO, prostaciklina i endotelina-1, kao i interakcije sa sistemom renin–angiotenzin–aldosteron (RAAS), omogućava fino podešavanje vaskularnog tonusa i regionalne perfuzije. U tom kontekstu, angiotenzin-konvertujući enzim (ACE) ima dvostruku ulogu, jer katalizuje konverziju angiotenzina I u vazokonstriktorni angiotenzin II i istovremeno učestvuje u razgradnji bradikininina, pa promene u njegovoj aktivnosti mogu doprineti poremećaju ravnoteže između vazodilatatornih i vazokonstriktornih mehanizama (69,75,76).

Kod bolesnika sa sekundarnim peritonitisom i njegovim teškim komplikacijama, posebno sepsom i septičkim šokom, dolazi do izraženog poremećaja vaskularne homeostaze i razvoja endotelne disfunkcije. Inflamatorni citokini, reaktivne kiseonične vrste, strukture tipične za mikroorganizme (engl. *Pathogen-Associated Molecular Patterns*, PAMP) i molekuli oslobođeni iz oštećenog tkiva (engl. *Damage-Associated Molecular Patterns*, DAMP), dovode do aktivacije endotela, gubitka glikokaliksa, povećanja permeabilnosti kapilara i promene ekspresije adhezionih molekula (31,77,78). Rezultat je izlazak tečnosti kroz kapilare, intersticijalni edem i kompromitovana mikrocirkulacija, uz paralelnu aktivaciju koagulacije i inhibiciju fibrinolize, što pogoduje nastanku mikrotromboze i doprinosi razvoju multiorganske disfunkcije (31,67,78).

Na nivou regulacije vaskularnog tonusa, teške infekcije kao što su sekundarni peritonitis sa sepsom karakterišu kompleksne promene u NO i RAAS signalnim putevima. Dok je biodostupnost NO često poremećena usled oksidativnog stresa i endotelne disfunkcije, izražena aktivacija iNOS može dovesti do povećane produkcije NO u pojedinim tkivima, sa paradoksalnom kombinacijom regionalne hipoperfuzije i sistemske vazodilatacije (70,71,73). Istovremeno, poremećaji u aktivnosti ACE i drugih komponenti RAAS, kao i narušena ravnoteža između NO, prostaciklina i endotelina-1, dodatno doprinose

hemodinamskoj nestabilnosti, refraktornosti na vazopresore i razvoju organskog oštećenja (69,76,78).

S obzirom na centralnu ulogu endotela i njegovih medijatora u patogenezi teških komplikacija sekundarnog peritonitisa, sve veća pažnja posvećuje se genskim varijantama koje utiču na funkciju ključnih molekula, kao što su NO-sintaze (eNOS, iNOS) i ACE. Dosadašnja istraživanja ukazuju da polimorfizmi ovih gena mogu modifikovati rizik od razvoja sepse, težinu organske disfunkcije i ishod lečenja, ali da su rezultati često heterogeni i zavise od tipa populacije, izvora infekcije i definisanih krajnjih ishoda (75,79–81). Ove činjenice pružaju neposredan okvir za ispitivanje uloge polimorfizama gena regulatora vaskularne homeostaze u nastanku teških komplikacija kod bolesnika sa sekundarnim peritonitisom, što je predmet dalje analize u ovoj disertaciji.

1.3.2. Genetska komponenta u nastanku sepse i multiorganske disfunkcije

Odgovor domaćina na infekciju, uključujući sekundarni peritonitis, pokazuje izraženu interindividualnu varijabilnost. Dok se kod pojedinih bolesnika lokalna intraabdominalna infekcija ograničava na relativno blagi klinički tok, kod drugih se, uprkos pravovremenom hirurškom i intenzivističkom lečenju, razvijaju teški oblici sepse, septički šok i multiorganska disfunkcija (82,83). Ove razlike ne mogu se u potpunosti objasniti samo osobinama uzročnika, lokalizacijom infekcije ili primenjenim lečenjem, već ukazuju i na važnu ulogu karakteristika domaćina. Među njima se sve više ističe nasledna osnova, što potvrđuju studije koje su ispitivale genomsku varijabilnost i polimorfizme u sepsi (83–85).

Studije koje su analizirale kliničku heterogenost sepse i primenu genetičkih i imunoloških markera sugerišu da faktori domaćina doprinose sklonosti ka razvoju sepse, kao i težini njenih kliničkih manifestacija i ishodu. Identifikovane su brojne varijante gena uključenih u urođeni imunski odgovor, inflamaciju, hemostazu, oksidativni stres i ćelijski odgovor na hipoksiju, koje mogu modifikovati intenzitet inflamatornog odgovora, stepen oštećenja organa i verovatnoću preživljavanja (83–85).

U kontekstu sekundarnog peritonitisa, ovakva genetička heterogenost može doprineti objašnjenju zašto deo bolesnika sa sličnim uzrokom perforacije, komorbiditetima i terapijskim pristupom razvija teške komplikacije kao što su septički šok, MODS, ARDS i sepsom udruženo AOB, dok se kod drugih infekcija uspešno ograničava bez razvoja ovakvih komplikacija (83–85).

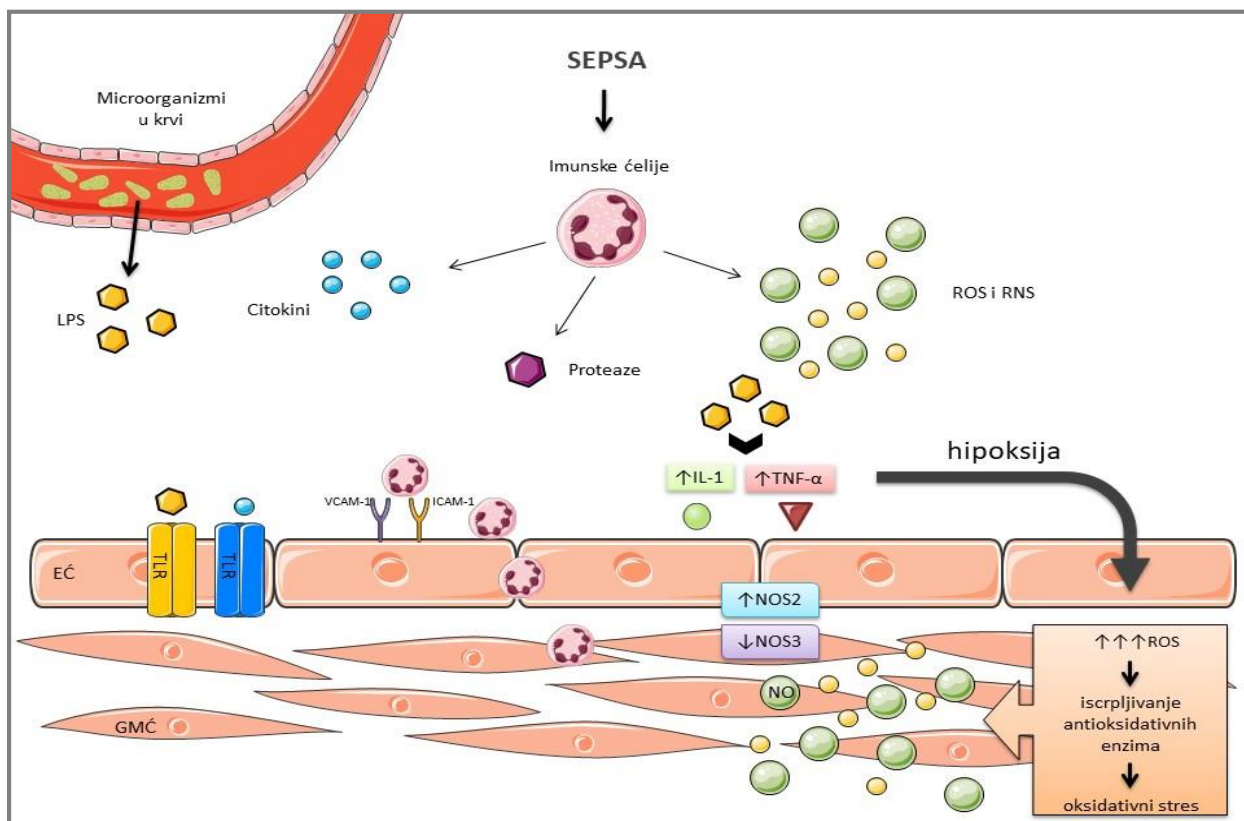
1.3.3. Geni kandidati povezani sa vaskularnom homeostazom i oksidativnim stresom

Dosadašnja istraživanja genetičke predispozicije za razvoj sepse i njenih komplikacija uglavnom su bila usmerena na gene koji kodiraju medijatore urođenog imenskog odgovora (npr. TLR, TNF, IL-6), komponente koagulacionog sistema (npr. PAI-1, protein C) i regulatorne molekule uključene u intracelularno signalizovanje i ćelijski odgovor na stres, kao što su NF- κ B, IRAK4 i proteini toplotnog šoka (engl. *heat shock proteins*, HSP)(84,85). Međutim, sve je više podataka koji ukazuju da geni uključeni u regulaciju vaskularne homeostaze i oksidativnog stresa predstavljaju važne kandidate u nastanku hemodinamske nestabilnosti i organske disfunkcije, naročito kod sepse (31,67,78).

Kako je prikazano u prethodnom poglavlju, endotel predstavlja centralnu tačku na kojoj se prepliću inflamatorni, koagulacioni i metabolički procesi u sepsi. Promene u produkciji NO,

prostaciklina i endotelina-1, disbalans u aktivaciji RAAS, kao i pojačano formiranje reaktivnih kiseoničnih (engl. *reactive oxygen species*, ROS) i azotnih vrsta (engl. *reactive nitrogen species*, RNS), dovode do poremećaja vaskularnog tonusa, gubitka integriteta barijere i mikrocirkulatorne disfunkcije (31,67,69).

Sepsa dovodi do intenzivne aktivacije endotela, pojačane ekspresije iNOS-a i povećanog stvaranja NO, istovremeno stimulišući različite izvore ROS, uključujući mitohondrije i NADPH-oksidazu (67,73,74). Višak NO u prisustvu ROS pogoduje nastanku RNS, oštećenju endotelnih ćelija i gubitku glikokaliksa, što dovodi do povećane vaskularne permeabilnosti, mikrotromboze i poremećaja mikrocirkulacije (31,78). Antioksidativni enzimi kao što su superoksid-dismutaza 2 (SOD2) i glutation-peroksidaza 1 (GPx1) ublažavaju ovo oštećenje detoksikacijom ROS, ali se određene varijante ovih gena dovode u vezu sa poremećajem antioksidativne odbrane i nepovoljnijim ishodom kod kritično obolelih (86–88). Uticaj sepsa na endotelnu aktivaciju i nastanak oksidativnog stresa prikazan je šematski na slici 1.



Slika 1. Shematski prikaz efekata sepsa na endotelnu aktivaciju, oksidativni stres i oštećenje organa.

*Napomena: Slika je delimično generisana korišćenjem Servier Medical Art materijala, koje obezbeđuje Servier, a dostupni su pod licencom Creative Commons Attribution 3.0 Unported.

**Skraćenice: LPS – lipopolisaharidi; EĆ – endotelne ćelije; GMĆ – glatke mišićne ćelije; TLR – Toll-like receptori; VCAM-1 – adhezioni molekul vaskularnih ćelija 1; ICAM-1 – intercelularni adhezioni molekul 1; IL1 – inteleukin 1; TNF-α – tumor nekrotizujući faktor alfa; ROS – reaktivne vrste kiseonika; RNS – reaktivne vrste azota; NO – azot-monoksid.

Posebnu grupu gena kandidata čine geni koji kodiraju enzime uključene u sintezu NO i u antioksidativnu odbranu. Varijante u genima za *NOS2* i *NOS3* mogu uticati na obim i dinamiku produkcije NO, što može doprineti sklonosti ka patološkoj vazodilataciji, refraktarnosti na vazopresore i razvoju mikrocirkulatornog oštećenja (72–74,80,81). Slično tome, varijante u genima za antioksidativne enzime, kao što su *SOD2* i *GPx1*, povezivane su sa promenjenom enzimskom aktivnošću, većom sklonošću ka oksidativnom oštećenju i nepovoljnijim ishodom kod kritično obolelih (86–88).

Ovi nalazi ukazuju da genske varijante u molekulima koji učestvuju u regulaciji vaskularnog tonusa, integriteta endotela i oksidativnog stresa ne deluju izolovano, već u okviru međusobno povezanih signalnih puteva. Balans između produkcije NO i ROS-a, s jedne strane, i kapaciteta antioksidativne odbrane, s druge strane, može biti pod uticajem naslednih karakteristika pojedinca. Stoga je opravdano pretpostaviti da polimorfizmi u genima koji regulišu vaskularnu homeostazu i oksidativni stres, među kojima se nalaze i *NOS2*, *NOS3* i *ACE*, mogu doprineti individualnim razlikama u predispoziciji za razvoj teških komplikacija kod bolesnika sa sekundarnim peritonitisom.

1.4. POLIMORFIZMI GENA REGULATORA VASKULARNE HOMEOSTAZE

1.4.1. Genski polimorfizmi – osnovni pojmovi

Genski polimorfizam podrazumeva postojanje dve ili više varijanti (alela) istog genskog lokusa u populaciji, pri čemu je učestalost svake varijante najmanje 1%. Varijante sa nižom učestalošću tradicionalno su označavane kao retke varijante ili mutacije. Za razliku od retkih, često visoko penetrantnih mutacija koje mogu dovesti do monogenskih bolesti, polimorfizmi se uglavnom smatraju „uobičajenim“ varijantama koje same po sebi ne moraju izazvati bolest, ali mogu da utiču na fenotipska svojstva, uključujući i individualni odgovor na infekciju, lekove ili druge štetne agense (89,90).

Najčešći oblik genskih polimorfizama jesu jednobazne zamene, odnosno polimorfizmi pojedinačnih nukleotida (engl. *single nucleotide polymorphisms*, SNP), kod kojih je jedan nukleotid u DNK sekvenci zamenjen drugim (npr. C→T ili G→A). Pored SNP-ova, u genomu se sreću polimorfizmi broja uzastopnih ponavaka (engl. *variable number of tandem repeats*, VNTR), insercije/delecije kraćih ili dužih DNK segmenata (engl. *INsertion/DELetion*, INDEL), kao i strukturne varijante većih hromozomskih regiona. Funkcionalne posledice polimorfizama zavise od njihove lokalizacije: varijante u promotorskim i drugim regulatornim regionima mogu menjati nivo genske ekspresije, dok polimorfizmi u kodirajućim regionima mogu dovesti do promena koje ne menjaju aminokiselinski niz (tzv. „tihe“ promene) ili do promena koje menjaju aminokiselinski niz, sa posledičnim izmenama strukture i aktivnosti proteina, pa čak i nastankom skraćenih ili nefunkcionalnih proteina (89,91–93).

Kod kompleksnih bolesti kao što su sepsa i multiorganska disfunkcija, pojedinačni polimorfizmi najčešće deluju kao faktori predispozicije malog do umerenog efekta, ali njihov doprinos postaje klinički značajan u kombinaciji sa drugim genskim varijantama i faktorima sredine. Posebno su od interesa polimorfizmi u genima koji kodiraju molekule uključene u regulaciju vaskularnog tonusa, integriteta endotela i oksidativnog stresa, kao što su *NOS2*, *NOS3* i *ACE*, jer mogu modifikovati hemodinamski odgovor, mikrocirkulaciju i sklonost ka

razvoju teških komplikacija, što ih čini naročito relevantnim za ispitivanje kod bolesnika sa sekundarnim peritonitisom (72,73,79–81).

1.4.2. Struktura, funkcija i polimorfizmi *NOS2* gena

Gen *NOS2* nalazi se na hromozomu 17q11.2–12 i kodira iNOS, koji se, za razliku od neuronske i endotelne izoforme, koje su stalno prisutne i aktivne u fiziološkim uslovima, odlikuje sposobnošću da u uslovima inflamatorne stimulacije proizvodi veoma visoke koncentracije NO (73,94). Humani *NOS2* gen sastoji se od 27 egzona, pri čemu egzoni 1–13 kodiraju oksigenazni, a egzoni 14–27 reduktazni domen enzima. Ovakva organizacija gena je značajna jer polimorfizmi u različitim regionima mogu različito uticati na ekspresiju i funkciju iNOS-a, a samim tim i na obim stvaranja NO (94). Za razliku od eNOS-a, čija je aktivnost zavisna od kratkotrajnih promena intracelularne koncentracije kalcijuma, ekspresija iNOS-a je u fiziološkim uslovima niska, a naglo se pojačava delovanjem proinflamatornih citokina (TNF- α , IL-1 β , IFN- γ), bakterijskog lipopolisaharida (LPS) i drugih molekulskih obrazaca tipičnih za patogene (engl. *pathogen-associated molecular patterns*, PAMP) (72–74). Kada se jednom aktivira, iNOS ispoljava trajno pojačanu aktivnost, u velikoj meri nezavisnu od daljih promena intracelularnog kalcijuma, što dovodi do kontinuiranog stvaranja velikih količina NO (73,74). U uslovima infekcije i inflamacije, aktivacija iNOS-a predstavlja važan deo odbrambenog odgovora domaćina, jer visoke koncentracije NO i RNS učestvuju u eliminaciji patogena u ćelijama urođenog imuniteta i utiču na modulaciju lokalnog inflamatornog odgovora i vaskularne reaktivnosti (70,72,74).

Sa druge strane, u stanjima poput sepse, ovako pojačana produkcija NO putem iNOS-a smatra se jednim od važnih mehanizama razvoja sistemske vazodilatacije, refraktarne hipotenzije i poremećaja mikrocirkulacije, uz istovremeno dejstvo na inflamatorni odgovor i oštećenje tkiva (70–73). Stoga, NO možemo posmatrati kao važan molekul na raskrsnici između zaštitnog i potencijalno štetnog odgovora domaćina na teške infekcije.

NOS2 je polimorfan gen koji sadrži više varijanti koje mogu imati funkcionalni značaj. Opisani su polimorfizmi u promotorskom regionu, uključujući zamene jednog nukleotida i polimorfizmi broja uzastopnih ponavaka (npr. (CCTTT)_n mikrosatelit), koji mogu uticati na vezivanje transkripcionih faktora i nivo ekspresije gena, kao i polimorfizmi u kodirajućim regionima koji dovode do zamene aminokiselina u proteinskom lancu i potencijalno menjaju katalitičku aktivnost, stabilnost ili regulaciju iNOS-a (80,81,95,96).

SNP *NOS2* c.1823C>T (rs2297518), nalazi se u egzonu 16 i dovodi do zamene aminokiseline serin u aminokiselinu leucin. Ova varijanta dovodi se u vezu sa povećanom aktivnošću iNOS i većom produkcijom NO. Reč je o jednom od češće ispitivanih *NOS2* polimorfizama u kontekstu sepse, pri čemu je u kineskoj populaciji opisana povezanost sa pojavom septičkog šoka (80). U evropskoj populaciji pokazano je da je jedna varijanta u egzonu 22 *NOS2* gena češće prisutna kod bolesnika sa sepsom nego kod neinficiranih kontrola, što ukazuje da i drugi polimorfizmi *NOS2* mogu biti povezani sa sklonošću ka razvoju sepse (81).

Van sepse, uloga *NOS2* i njegovih genskih varijanti ispitivana je i u drugim inflamatornim i infektivnim oboljenjima. Pokazano je da pojedini polimorfizmi *NOS2A* mogu biti povezani sa sklonošću ka inflamatornim bolestima creva (95) i razlikama u kliničkom toku infekcije *Plasmodium falciparum* (96), dok je kod bolesnika sa vrlo ranim početkom inflamatorne bolesti creva opisana pojačana aktivnost iNOS (97). Ovi nalazi ukazuju da *NOS2* i njegove

varijante, kao i poremećaji njegove aktivnosti, mogu imati širi značaj u modulaciji inflamatornog odgovora, što je važno u kontekstu proučavanja njihove uloge u sepsi i njenim komplikacijama kod bolesnika sa sekundarnim peritonitisom.

1.4.3. Struktura, funkcija i polimorfizmi *NOS3* gena

Gen *NOS3* kodira endotelnu izoformu NO-sintaze, koja ima ključnu ulogu u održavanju vaskularne homeostaze. *NOS3* se nalazi u regionu 7q35–7q36 na hromozomu 7, obuhvata 26 egzona i 25 introna i kodira enzim koji je pretežno eksprimiran u endotelnim ćelijama (98). eNOS katalizuje nastanak NO iz L-arginina, uz formiranje L-citrulina, pri čemu su za normalnu aktivnost enzima važni dostupnost supstrata i prisustvo odgovarajućih kofaktora, posebno tetrahidrobiopterina (BH₄), kao i NADPH kao donora elektrona (73). Aktivnost eNOS-a fino je regulisana na više nivoa: transkripcionom kontrolom, posttranskripcionim mehanizmima, fosforilacijom, interakcijama sa regulatornim proteinima (npr. kalmodulin) i dostupnošću kofaktora (73,98).

U fiziološkim uslovima, eNOS proizvodi niske, pulsne količine NO zavisne od kalcijuma, koje dovode do relaksacije vaskularne glatke muskulature, inhibicije agregacije trombocita i ograničavanja adhezije leukocita na endotel. Na taj način, NO poreklom iz eNOS-a deluje kao važan regulator vaskularnog tonusa, integriteta endotela i prohodnosti mikrocirkulacije (68,98). Poremećaj funkcije eNOS-a, usled oksidativnog stresa, nedostatka kofaktora ili genskih varijanti, može dovesti do smanjene raspoloživosti NO i razvoja endotelne disfunkcije, što je povezano sa različitim kardiovaskularnim oboljenjima (67,68,98). U uslovima pojačanog oksidativnog stresa i relativnog deficita BH₄ može doći do tzv. „razdvajanja” (engl. *uncoupling*) eNOS-a, pri čemu se smanjuje sinteza NO, a povećava stvaranje reaktivnih kiseoničnih vrsta, što dodatno pogoršava endotelnu disfunkciju (67,73).

Gen *NOS3* je izrazito polimorfan, a više varijanti su identifikovane kao potencijalno funkcionalno značajne. Među najčešće proučavanim polimorfizmima nalaze se:

1. c.-786T>C (rs2070744) u promotorskom regionu, koji može uticati na transkripcionu aktivnost *NOS3* gena i smanjiti ekspresiju eNOS-a;
2. c.894G>T (rs1799983, Glu298Asp) u egzonu 7, koji dovodi do zamene glutamata aspartatom u proteinskom lancu i potencijalno menja stabilnost i aktivnost enzima;
3. intronska varijanta u intronu 4 (rs61722009, 4a/4b VNTR), gde prisustvo kraće alelne varijante (4a) može biti povezano sa smanjenom produkcijom NO (98).

Ove varijante su široko proučavane u različitim kardiovaskularnim i metaboličkim oboljenjima, uključujući koronarnu bolest, hipertenziju, moždani udar i dijabetes, gde je pokazano da pojedini genotipovi mogu biti udruženi sa većim rizikom oboljevanja ili nepovoljnijim tokom bolesti, iako rezultati nisu uvek konzistentni između populacija (98).

U kontekstu kritičnih stanja i sepse, polimorfizmi *NOS3* privlače pažnju jer promene u bioraspoloživosti NO mogu uticati na hemodinamsku stabilnost, mikrocirkulaciju i razvoj organske disfunkcije. U pojedinim studijama ispitivana je povezanost varijanti c.-786T>C, G894T (Glu298Asp) i VNTR 4a/4b sa sklonošću ka razvoju sepse, kao i sa nepovoljnijim ishodima kod kritično obolelih, pri čemu su dosadašnji nalazi pokazali izvesnu varijabilnost između populacija i kliničkih kohorti (81,98).

S obzirom na važnu ulogu eNOS-a u regulaciji vaskularnog tonusa i integriteta endotela, kao i na to da su sepsa, septički šok i multiorganska disfunkcija kod bolesnika sa sekundarnim peritonitisom praćeni izraženim poremećajem vaskularne homeostaze, polimorfizmi *NOS3* gena predstavljaju važne kandidate za ispitivanje genetske predispozicije za razvoj ovih komplikacija u okviru ove disertacije (31,98).

1.4.4. Struktura, funkcija i polimorfizmi *ACE* gena

Gen *ACE* (angiotenzin-konvertujući enzim) kodira membranski vezanu cink-metalopeptidazu koja predstavlja centralnu komponentu sistema renin–angiotenzin–aldosteron (RAAS). *ACE* katalizuje konverziju angiotenzina I u angiotenzin II, snažan vazokonstriktor sa proinflamatornim i prokoagulantnim efektima, a istovremeno razgrađuje bradikinin, vazodilatatorni peptid. Zbog toga promene u aktivnosti *ACE* mogu uticati na vaskularni tonus, permeabilnost i intenzitet inflamatornog odgovora što je od posebnog značaja u stanjima praćenim hemodinamskom nestabilnošću i endotelnom disfunkcijom, kao što su sepsa i septički šok (75,76).

ACE gen se nalazi na hromozomu 17q23.3 i sastoji se od 26 egzona i 25 introna (99). Najčešće proučavana genetska varijanta u okviru *ACE* gena je inserciono/deleciona (I/D) varijanta u intronu 16 (rs4646994), definisana prisustvom (I) ili odsustvom (D) inserta dužine približno 287 bp (Alu sekvenca), što dovodi do genotipova II, ID i DD (99,100). Ovaj polimorfizam se u literaturi često dovodi u vezu sa razlikama u aktivnosti i nivou cirkulišućeg *ACE*, pri čemu se D alel (odnosno DD genotip) u više studija opisuje kao alel povezan sa višim nivoima *ACE* u poređenju sa I alelom, mada veličina efekta može varirati između populacija (101,102).

U kontekstu sepse, klinički značaj *ACE* I/D polimorfizma razmatran je kroz njegov potencijalni uticaj na predispoziciju za razvoj sepse i varijabilnost kliničkog toka i ishoda kod kritično obolelih, što je ispitivano u više opservacionih studija i u meta-analizama (75,79). Pored toga, *ACE* I/D varijanta je razmatrana i u studijama koje su obuhvatale ARDS kod kritično obolelih bolesnika (103).

S obzirom na ulogu *ACE* u regulaciji vaskularnog tonusa i interakciji RAAS-a sa endotelnom funkcijom, kao i na činjenicu da je sepsa veoma značajna komplikacija sekundarnog peritonitisa, u kojoj je poremećaj vaskularne homeostaze posebno izražen, *ACE* I/D polimorfizam predstavlja potencijalnog kandidata za ispitivanje predispozicije za razvoj teških komplikacija i nepovoljnog ishoda u okviru ove disertacije (75,76,79).

U Tabeli 5 prikazan je pregled polimorfizama *NOS2*, *NOS3* i *ACE* gena analiziranih u okviru ove disertacije, zajedno sa njihovim prijavljenim funkcionalnim efektima i najčešće navođenim kliničkim asocijacijama.

Tabela 5. Pregled analiziranih polimorfizama *NOS2*, *NOS3* i *ACE* gena i njihovog značaja

Polimorfizam (rsID)	Lokacija / tip	Prijavljeni funkcionalni efekat	Najčešće navođene kliničke asocijacije
<i>NOS2</i> c.1823C>T (rs2297518)	Egzon 16, missense varijanta	Varijantni alel se povezuje sa povećanom aktivnošću iNOS i većom produkcijom NO.	Sepsa, septički šok; inflamatorna oboljenja
<i>NOS3</i> c.-786T>C (rs2070744)	Promotor	C alel se dovodi u vezu sa smanjenom promotorskom aktivnošću eNOS-a i smanjenom sintezom NO.	Hipertenzija, endotelna disfunkcija; u kritičnim stanjima ispitivan u odnosu na tok/ishod sepse.
<i>NOS3</i> VNTR, 4a/4b (rs61722009)	Intron 4	4a alel se povezuje sa nižom ekspresijom eNOS-a i nižim nivoima NO u plazmi.	Kardiovaskularna oboljenja; osetljivost na infekcije.
<i>NOS3</i> c.894G>T (rs1799983; Glu298Asp)	Egzon 7, missense varijanta	T alel dovodi u vezu sa izmenjenom stabilnošću eNOS-a i smanjenom bioraspoloživošću NO	Kardiovaskularna oboljenja; u kritičnim stanjima ispitivan u odnosu na sepsu i ishod
<i>ACE</i> I/D (rs4646994)	Intron 16, insercija/delecija	D alel se povezuje sa višim nivoima ACE u cirkulaciji u poređenju sa I alelom.	Kardiovaskularna oboljenja i hipertenzija; u kritičnim stanjima ispitivan u odnosu na rizik od sepse, ishod i ARDS

Skraćenice: NOS – NO-sintaza; eNOS – endotelna NO-sintaza; iNOS – inducibilna NO-sintaza; VNTR – polimorfizmi broja uzastopnih ponavaka; ACE – angiotenzin-konvertujući enzim; RAAS – renin–angiotenzin–aldosteron sistem.

2. CILJEVI ISTRAŽIVANJA

Istraživanje je sprovedeno s ciljem da se kod hirurških pacijenata sa sekundarnim peritonitisom:

1. Utvrde učestalosti genotipova i alela izabranih polimorfizama gena: *NOS2* (rs2297518), *NOS3* (rs 61722009, rs 1799983, rs 2070744) i *ACE* (rs4646994) kod hirurških pacijenata sa sekundarnim peritonitisom
2. Analizira povezanost ispitivanih polimorfnihih genskih varijanti sa razvojem teških komplikacija kod ovih pacijenata
3. Analizira povezanost ispitivanih polimorfnihih genskih varijanti sa ishodom kod ovih pacijenata

3. ISPITANICI I METODE

3.1. ISPITANICI

U studiju su uključena 202 pacijenta sa dijagnozom sekundarnog peritonitisa lečena na Klinici za urgentnu hirurgiju Kliničkog centra Srbije (KCS). Uključeni su odrasli pacijenti (≥ 18 godina) sa kliničkom slikom akutnog abdomena, kod kojih je intraoperativno potvrđen sekundarni peritonitis nastao perforacijom šupljeg organa.

Kriterijumi za uključivanje bili su: uzrast ≥ 18 godina i dijagnoza sekundarnog peritonitisa usled perforacije šupljeg organa.

Kriterijumi za isključivanje bili su: terminalna faza maligne bolesti, terminalna faza hroničnog sistemskog oboljenja, hronična terapija steroidima ili imunosupresivnim lekovima; sindrom imunodeficijencije, trudnoća.

Svi uključeni pacijenti operisani su zbog peritonitisa i postoperativno lečeni u skladu sa savremenim protokolima za intraabdominalne infekcije. Empirijska antibiotska terapija širokog spektra započinjana je na osnovu kliničke procene, a nakon dobijanja mikrobioloških rezultata (intraoperativno uzeta peritonealna tečnost, postoperativne hemokulture i brisevi prema indikaciji) terapija je prilagođavana u skladu sa antibiogramom.

U prvih 24 sata od prijema izračunavan je APACHE II skor radi procene težine bolesti i rizika od komplikacija i smrtnog ishoda (104). Kod svih pacijenata izračunavan je i MPI kao specifičan prognostički skor za peritonitis (17).

Praćenje tokom hospitalizacije obuhvatalo je kliničko praćenje, laboratorijske analize (kompletna krvna slika, markeri inflamacije, koagulacioni parametri i biohemijski profil) i radiološku dijagnostiku (EHO, RTG, MSCT) prema kliničkoj indikaciji. Ishod lečenja analiziran je kroz dužinu boravka u jedinici intenzivnog lečenja, morbiditet i mortalitet, dok su postoperativne komplikacije klasifikovane prema Clavien–Dindo klasifikaciji (105).

Za molekularno-genetička ispitivanja uziman je uzorak 5 mL venske krvi u vakutajner sa antikoagulansom (EDTA i/ili Na-citrat), koji je dalje korišćen za izolaciju DNK i genotipizaciju ispitivanih polimorfizama.

Istraživanje je sprovedeno u skladu sa važećim etičkim principima i odobreno od strane Etičkog odbora Kliničkog centra Srbije (broj odobrenja: 5030/2) i Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu (broj odobrenja: 1322/IX-71).

3.1.1. Prikupljanje kliničkih podataka i definicije ishoda

Klinički podaci prikupljeni su iz medicinske dokumentacije tokom hospitalizacije (prijemna dokumentacija, operativni nalaz, postoperativni tok, izveštaji jedinice intenzivnog lečenja i otpusna lista). Beleženi su demografski podaci, etiologija peritonitisa, ključni intraoperativni nalazi i parametri postoperativnog toka relevantni za praćene komplikacije i ishode.

Definicije ishoda. Kao ključni ishodi/komplikacije praćeni su: ARDS, MODS, MOF, sepsa i mortalitet. ARDS je definisan prema Berlin kriterijumima (41). MODS i MOF su definisani kao razvoj disfunkcije ili insuficijencije dva ili više organskih sistema tokom kritičnog stanja, u skladu sa ACCP/SCCM konsenzusom (106), dok su kriterijumi za procenu stepena organske disfunkcije zasnovani na *Marshall*-ovom pristupu (107). Sepsa je definisana prema važećim

kriterijumima u vreme lečenja pacijenata (*Sepsis-2* ili *Sepsis-3*), u zavisnosti od perioda hospitalizacije (20,108). Mortalitet je praćen kao intrahospitalni mortalitet.

3.2. METODE

3.2.1. Izolacija DNK

Sva molekularno-genetička ispitivanja sprovedena su u laboratoriji Instituta za humanu genetiku Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu. Genomska DNK izolovana je iz leukocita periferne krvi primenom modifikovane metode izolovanja (engl. *salting out*) prema *Miller-u* (109). Metoda izolovanja izabrana je zbog pouzdanosti i dobre reproduktivnosti, kao i zbog mogućnosti dobijanja DNK adekvatnog kvaliteta za dalju analizu.

Izolacija je izvođena u dve faze. U početnom koraku, uzorak periferne krvi (5 mL) pomešan je sa jednakom zapreminom pufera za lizu eritrocita (0,32 M saharoza, 10 mM Tris-HCl, 1% Triton X-100, 5 mM MgCl₂) i inkubiran na niskoj temperaturi (4°C) oko 20 minuta, nakon čega je vršeno centrifugiranje. Nakon toga, supernatant je uklonjen, a dobijeni ćelijski talog je ispran fiziološkim puferom (0,075 M NaCl, 0,025 M EDTA, pH 8). Ispiranje i centrifugiranje ponavljani su po potrebi više puta, sve dok se nije dobio bledo-beli talog, čime je postignuto uklanjanje ostataka membrana i hemoglobina.

Nakon završnog ispiranja talog je resuspendovan u puferu A (10 mM Tris-HCl, 400 mM NaCl, 2 mM EDTA, pH 8), uz dodatak 10% SDS i proteinaze K (10 mg/mL). Ovako pripremljeni uzorci inkubirani su preko noći na 37°C radi potpune digestije proteina i oslobađanja genomske DNK. Sledećeg dana proteini su uklanjani dodatkom koncentrovanog NaCl (6 M), uz intenzivno mešanje i centrifugiranje, nakon čega je supernatant prebacivan u čistu epruvetu. Postupak precipitacije proteina ponovljen je još dva puta radi postizanja veće čistoće.

DNK je zatim precipitirala dodatkom izopropanola u zapremini jednakoj zapremini supernatanta, uz blago mešanje do pojave beličastih vlakana DNK. Precipitirani DNK uzorak izdvojen je (staklenim štapićem), ispran kratko u hladnom 70% etanolu, osušen na sobnoj temperaturi i rastvoren u 300 µL sterilne vode (voda za injekcije).

Koncentracija i čistoća izolovane DNK procenjivane su spektrofotometrijski merenjem apsorbancije na 260 nm i 280 nm. Odnos A₂₆₀/A₂₈₀ korišćen je kao pokazatelj čistoće uzorka, a vrednosti u rasponu 1,8–2,0 smatrane su prihvatljivim za dalja molekularna ispitivanja.

3.2.2. Metode korišćene u detekciji polimorfizama

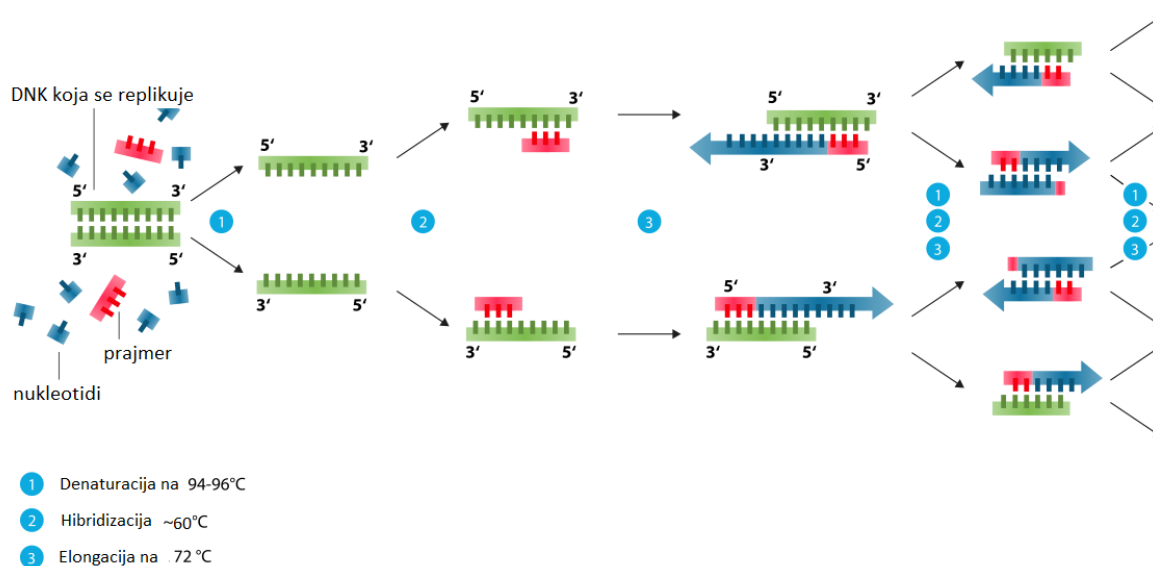
Genotipizacija ispitivanih polimorfizama sprovedena je primenom metoda zasnovanih na PCR tehnologijama. U zavisnosti od tipa ispitivanog polimorfizma i laboratorijskog protokola, korišćene su:

- (1) konvencionalni PCR sa analizom dužine amplifikata,
- (2) PCR uz restrikcionu digestiju (PCR–RFLP) ili
- (3) Real-time PCR.

3.2.2.1. Konvencionalni PCR

Polimerazna lančana reakcija (PCR) predstavlja standardnu metodu za in vitro amplifikaciju definisanog segmenta DNK, zasnovanu na cikličnim promenama temperature koje omogućavaju razdvajanje dvostruke DNK spirale, specifično vezivanje prajmera i sintezu novih lanaca (110–112). PCR se zasniva na upotrebi termostabilne DNK-polimeraze, para prajmera koji uokviruju ciljnu sekvencu, dNTP, Mg^{2+} i odgovarajućeg pufera, uz DNK matricu, pri čemu se amplifikacija odvija u termocikleru kroz ponovljene cikluse (110,111).

Jedan PCR ciklus obuhvata tri osnovna koraka: denaturaciju (razdvajanje dvostrukog lanca DNK), hibridizaciju/annealing (vezivanje prajmera za komplementarne sekvence) i elongaciju/ekstenziju (sinteza novog lanca DNK), pri čemu ponavljanje ovih koraka dovodi do eksponencijalnog umnožavanja ciljnog fragmenta (111,112). Osnovni koraci PCR reakcije (denaturacija, hibridizacija prajmera i elongacija) prikazani su na Slici 2.



Slika 2. Shematski prikaz osnovnih koraka PCR reakcije (denaturacija, annealing prajmera i elongacija).

Izvor: Enzoklop (2014), Wikimedia Commons; CC BY-SA 3.0 (prilagođeno/prevod).

Specifičnost reakcije u najvećoj meri zavisi od dizajna prajmera i uslova hibridizacije, dok na efikasnost amplifikacije utiču koncentracije Mg^{2+} , prajmera i DNK uzorka, kao i broj ciklusa i odabrana DNK-polimeraza (110,112).

PCR amplifikacija ciljnog regiona sprovedena je korišćenjem standardnih komponenti PCR reakcije (reakcioni pufer sa $MgCl_2$, dNTP, prajmeri, termostabilna DNK-polimeraza i genomska DNK). Radi ujednačenosti uslova izvođenja, sastav standardne PCR reakcione smeše koja je korišćena u analizama prikazan je u Tabeli 6, dok su sekvence prajmera i temperaturni profili reakcije bili prilagođeni pojedinačnim polimorfizmima i prikazani u odgovarajućim pododeljcima.

Tabela 6. Sastav standardne PCR reakcije smeše (ukupan volumen: 25 µL)

Komponenta	Zapremina po uzorku
Ampulirana voda	17,85 µl
10 x pufer B	2,5 µl
MgCl ₂ (25 mM)	2 µl
dNTP (10 mM)	0,25 µl
F prajmer (10 nmol/µl)	0,4 µl
R prajmer (10 nmol/µl)	0,4 µl
<i>FIREPol® Taq</i> polimeraza (5 U/µl)	0,1 µl
DNK (100 ng/µl)	1,5 µl

Napomena: Oznake F i R odnose se na *forward* i *reverse* prajmere korišćene za amplifikaciju ciljne DNK sekvence.

Dobijeni PCR produkti razdvajani su vertikalnom gel-elektroforezom u 8% poliakrilamidnom gelu (engl. *polyacrylamide gel electrophoresis*, PAGE), pri čemu je veličina fragmenata određivana poređenjem sa odgovarajućim DNK markerom (engl. *DNA ladder*). Gelovi su bojeni SYBR® Safe DNA Gel Stain (Invitrogen), a trake su vizualizovane na UV transiluminatoru (ETX-F20.M, Vilber). Uzorci sa nejasnim obrascem traka su ponavljani (111,112). Sastav 8% poliakrilamidnog gela prikazan je u Tabeli 7.

Tabela 7. Sastav 8% poliakrilamidnog gela za elektroforezu DNK

Komponenta	Količina
Destilovana voda	3,96 ml
5x TBE pufer	1,3 ml
Akril-amid (40%)	1,3 ml
APS (10%)	46 µl
TEMED	8,4 µl

Skraćenice: TBE - Tris-Borat-EDTA; APS – amonijum-persulfat; TEMED - N, N, N', N'-tetrametiletildiamin;

3.2.2.1.1. Genotipizacija *NOS3* VNTR 4a/4b (rs61722009)

Polimorfizam *NOS3* VNTR 4a/4b (rs61722009) određivan je konvencionalnim PCR-om, pri čemu je genotip utvrđivan na osnovu razlike u dužini PCR produkata. Nakon amplifikacije ciljnog regiona, PCR produkti su razdvajani i vizualizovani na 8% poliakrilamidnom gelu prema postupku opisanom u odeljku 3.2.2.1. Genotipovi su određivani prema obrascu traka koji odgovara alelnim varijantama 4a i 4b (Tabela 8).

Tabela 8. Genotipizacija *NOS3* VNTR 4a/4b (rs61722009) PCR metodom

Polimorfizam	Prajmeri (5'-3')	PCR uslovi (sažeto)	Očekivani produkti (bp)
<i>NOS3</i> VNTR 4a/4b (rs61722009)	F: CTATGGTAGTGCCTTGGCTGG AGG R: ACCGCCCAGGGAAGTCCGCT	Početna denaturacija 94°/3 min; 32 ciklusa: 94°/1min, 60°/1min, 72°/1 min; Završna elongacija: 72°C/7 min	4a: 183 4a/4b: 210/183 4b: 210

3.2.2.1.2. Genotipizacija *ACE* I/D polimorfizma (rs4646994)

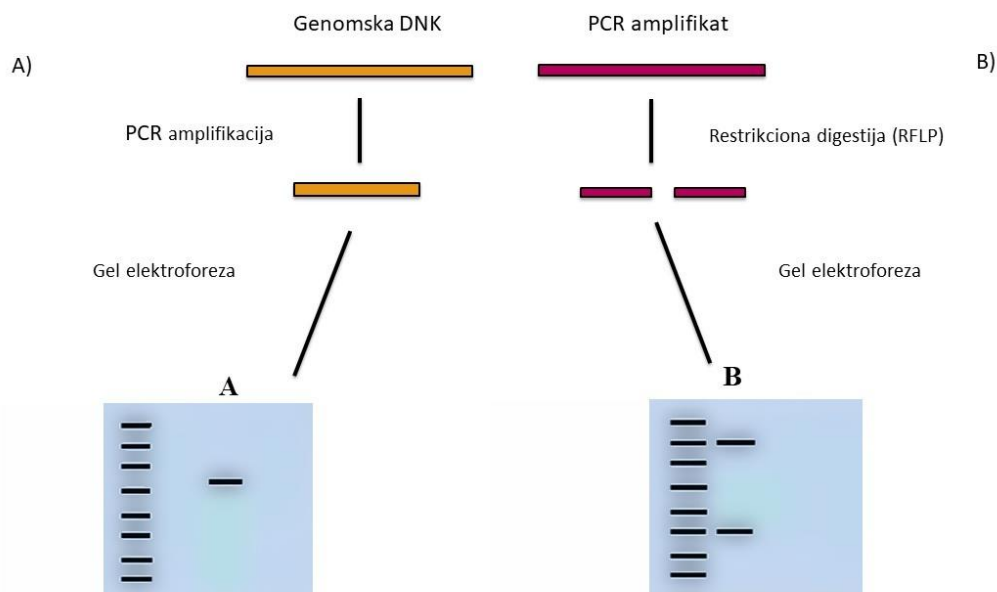
Polimorfizam *ACE* I/D (rs4646994) određivan je takođe konvencionalnom PCR metodom, pri čemu je genotip utvrđivan na osnovu dužine PCR produkata nakon vertikalne gel-elektroforeze. Prajmeri, PCR uslovi i očekivane dužine fragmenata prikazani su u Tabeli 9.

Tabela 9. Genotipizacija *ACE* I/D (rs4646994) PCR metodom

Polimorfizam	Prajmeri (5'-3')	PCR uslovi	Očekivani produkti (bp)
<i>ACE</i> I/D (rs4646994)	F: CTGGACACCACTCCCATCCTT TCT R: GATGTGGCCATCACATTCGTC AGAT	Početna denaturacija 94°C/5 min; 35 ciklusa: 94°C/30 s, 63°C/30 s, 72°C/30 s; Završna elongacija 72°C/7 min	II: ~490 DD: ~203 ID: ~490 + ~203

3.2.2.2. PCR-RFLP (PCR uz restrikcionu digestiju)

PCR-RFLP (engl. *polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism*) je metoda genotipizacije u kojoj se najpre PCR-om amplifikuje region DNK koji sadrži ispitivanu varijantu, a zatim se dobijeni PCR produkt podvrgava restrikcionoj digestiji odgovarajućom endonukleazom. Osnovni princip metode zasniva se na tome da polimorfizam može dovesti do nastanka ili gubitka restrikcionog mesta, čime se menja obrazac fragmenata nakon digestije, pa se genotip određuje na osnovu prisustva nedigestiranog produkta, digestiranih fragmenata ili njihove kombinacije (113). Princip PCR-RFLP metode prikazan je na Slici 3.



Slika 3. Shematski prikaz PCR–RFLP genotipizacije: (A) vizualizacija PCR amplifikata gel-elektroforezom nakon PCR amplifikacije ciljnog regiona; (B) restrikciona digestija PCR amplifikata (RFLP) i gel-elektroforetsko razdvajanje dobijenih restrikcioni fragmenta radi određivanja genotipa na osnovu obrasca traka.

PCR–RFLP je tehnički relativno jednostavna i troškovno prihvatljiva metoda pogodna za analizu ograničenog broja varijanti, ali njena primenljivost zavisi od postojanja odgovarajućeg restrikcionog mesta, kvaliteta amplifikacije i mogućnosti jasnog razdvajanja fragmenata na gelu, što ujedno predstavlja i glavna ograničenja ove metode (114).

U ovoj studiji, nakon PCR amplifikacije ciljnog regiona, restrikciona digestija sprovedena je u skladu sa uputstvima proizvođača za korišćeni restrikcioni enzim (temperatura i vreme inkubacije). Dobijeni restrikcioni fragmenti razdvajani su i vizualizovani na 8% poliakrilamidnom gelu prema postupku opisanom u odeljku 3.2.2.1 (Tabela 7), nakon čega su genotipovi određivani na osnovu karakterističnog obrasca restrikcioni fragmenta.

3.2.2.2.1. Genotipizacija *NOS3* c.-786T>C (rs2070744) i *NOS3* c.894G>T (rs1799983)

Polimorfizmi *NOS3* c.-786T>C (rs2070744) i *NOS3* c.894G>T (rs1799983) određivani su metodom PCR–RFLP. Nakon PCR amplifikacije ciljnog regiona, PCR produkti su podvrgavani restrikciono digestiji odgovarajućim endonukleazama, pri čemu su uslovi inkubacije (temperatura i vreme) primenjivani u skladu sa preporukama proizvođača. Restrikcioni fragmenti dobijeni nakon digestije razdvajani su i vizualizovani na 8% poliakrilamidnom gelu prema postupku opisanom u odeljku 3.2.2.1.

Prajmeri i PCR uslovi amplifikacije, kao i očekivane dužine PCR produkata prikazani su u Tabeli 10. Pregled restrikcioni endonukleaza, sastava restrikcione smeše i uslova inkubacije prikazan je u Tabeli 11, dok su očekivani restrikcioni fragmenti za pojedine genotipove prikazani u Tabeli 12.

Tabela 10. PCR uslovi amplifikacije za *NOS3* c.-786T>C (rs2070744) i *NOS3* c.894G>T (rs1799983)

Polimorfizam	Prajmeri (5'-3')	PCR uslovi (program)	PCR produkt (bp)
<i>NOS3</i> c.-786T>C (rs2070744)	F:CCCAGCAAGGATGTAGTGAC R:GTGTACCCACCTGCATTCT	Početna denaturacija 94°/3 min;	306
<i>NOS3</i> c.894G>T (rs1799983)	F:AAGGCAGGAGACAGTGGATGGA R:CCCAGTCAATCCCTTTGGTGC TCA	40 ciklusa: 94°/ 1min, 60°/1min i 72°/1 min Završna elongacija 72°C/7 min	248

Tabela 11. PCR-RFLP genotipizacija *NOS3* c.-786T>C (rs2070744) i *NOS3* c.894G>T (rs1799983)

Polimorfizam	Restrikcioni enzim	Restrikciona smeša (po uzorku)	Inkubacija (T/ vreme)
<i>NOS3</i> c.-786T>C (rs2070744)	PdiI (NaeI)	PCR produkt: 3 µL; pufer: 1,4 µL;	37°/1h
<i>NOS3</i> c.894G>T (rs1799983; Glu298Asp)	MboI	enzim: 0,6 µL; H ₂ O do 15µL	37°/1h

Tabela 12. Interpretacija PCR-RFLP genotipova za *NOS3* c.-786T>C (rs2070744) i *NOS3* c.894G>T (rs1799983)

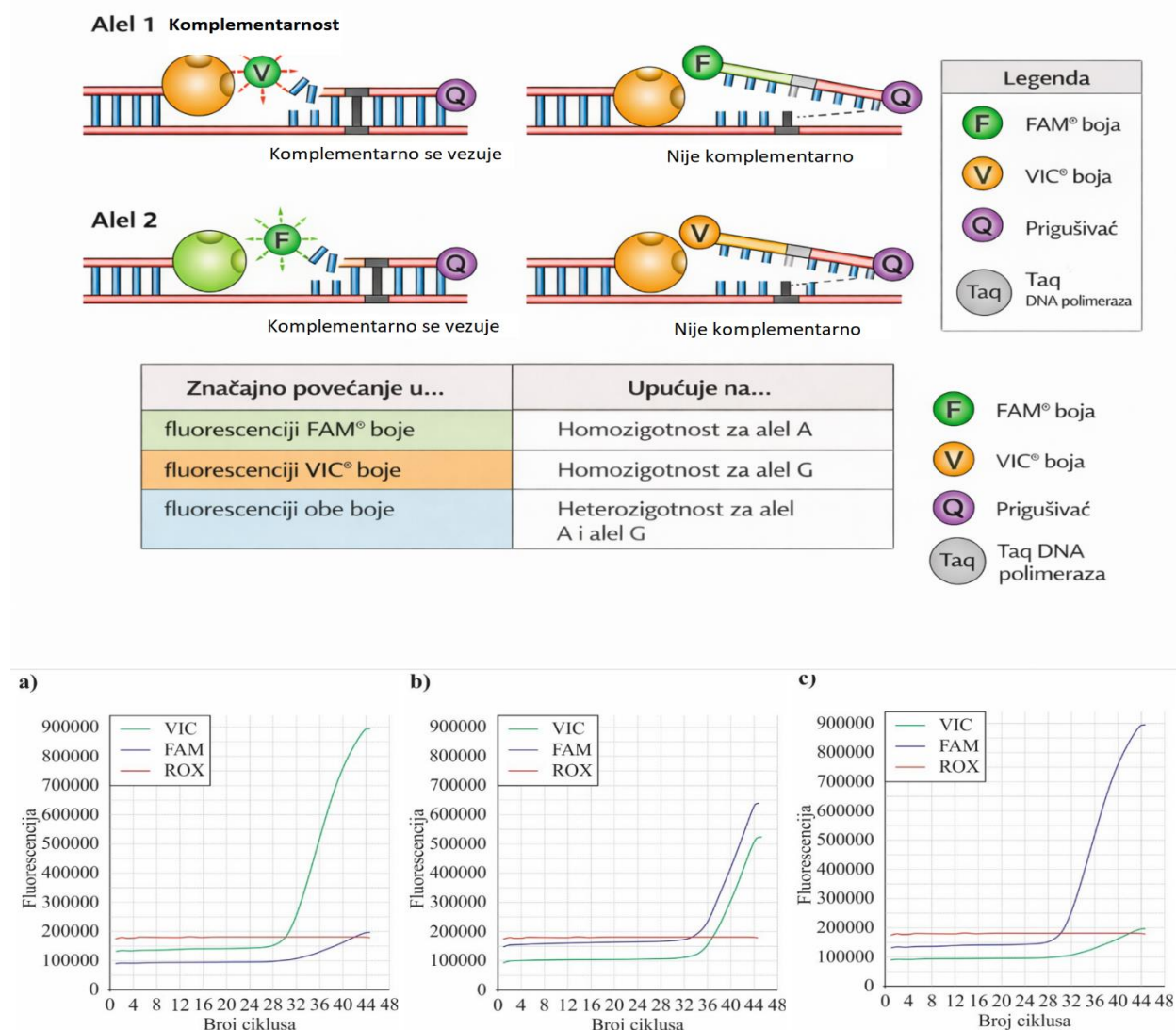
Polimorfizam	Genotip	Očekivani fragmenti nakon digestije (bp)
<i>NOS3</i> c.-786T>C (rs2070744)	TT	306
	TC	306/225/81
	CC	225/81
<i>NOS3</i> c.894G>T (rs1799983)	GG	248
	GT	248/158/90
	TT	158/90

3.2.2.3. Real-time PCR (TaqMan alelna diskriminacija)

Real-time PCR je PCR pristup kod koga se amplifikacija ciljne DNK ne procenjuje tek nakon završetka reakcije, već se njen tok prati u realnom vremenu preko fluorescentnog signala koji raste proporcionalno količini nastalog produkta. Na taj način se dobijaju pouzdani podaci bez naknadne gel-elektroforeze, uz veću reproduktivnost i mogućnost obrade većeg broja uzoraka(115). U genotipizaciji SNP varijanti najčešće se koristi *TaqMan* esej (5'-nukleaza metoda), koja se zasniva na alel-specifičnim probama obeleženim različitim fluorescentnim bojama. Probe se vezuju za ciljnu sekvencu između prajmera, a tokom elongacije DNK-polimeraza, zahvaljujući 5'-nukleaznoj aktivnosti, razgrađuje hibridizovanu

probu. Tada dolazi do razdvajanja reportera od prigušivača (engl. „*quencher*“) i porasta fluorescentnog signala, što omogućava alelnu diskriminaciju (116,117).

Genotip se određuje na osnovu relativnog intenziteta fluorescentnih signala za svaki alel, pri čemu se uzorci u alelnu-diskriminacionom prikazu grupišu u klastere koji odgovaraju homozigotima za prvi alel, heterozigotima i homozigotima za drugi alel (115,117). Na osnovu završnih intenziteta FAM i VIC signala u završnim ciklusima PCR reakcije, softver automatski formira klastere alelne diskriminacije, što omogućava jasno razdvajanje genotipskih grupa (115). Princip TaqMan alelne diskriminacije i tipične amplifikacione krive prikazani su na Slici 4.



Slika 4. Princip TaqMan real-time PCR alelne diskriminacije (5'-nukleaza metoda). U gornjem delu prikazano je vezivanje alel-specifičnih proba obeleženih fluorescentnim bojama FAM® i VIC® u slučaju podudaranja i nepodudaranja sa ciljnom sekvencom. Tokom elongacije, zahvaljujući 5'-nukleaznoj aktivnosti, DNK-polimeraza razgrađuje hibridizovanu probu, što dovodi do razdvajanja reportera od prigušivača i porasta fluorescentnog signala. U donjem

delu prikazane su tipične amplifikacione krive za (a) homozigot sa dominantnim VIC signalom, (b) heterozigot (signal obe boje) i (c) homozigot sa dominantnim FAM signalom; ROX predstavlja pasivnu referentnu boju.

*Izvor: Prilagođeno prema *Applied Biosystems* (115).

3.2.2.3.1. Genotipizacija *NOS2* c. 1823C>T (rs2297518)

Genotipizacija polimorfizma *NOS2* c.1823C>T (rs2297518) sprovedena je metodom real-time PCR korišćenjem komercijalnog TaqMan SNP Genotyping Assay-a (Assay ID: C_11889257_10) na instrumentu Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR System. Reakcije su pripremane u ukupnoj zapremini od 13 µL po uzorku (Tabela 13).

Tabela 13. Sastav reakcione smeše za real-time PCR (ukupno 13 µL po uzorku)

Komponenta	Količina
Ampulirana voda	5,125 µL
TaqMan Universal Master Mix	6,25 µL
TaqMan SNP Genotyping Assay	0,625 µL
DNK	1,0 µL
Ukupno	13,0 µL

Amplifikacija i očitavanje fluorescentnih signala izvođeni su u standardizovanom termičkom profilu prikazanom u Tabeli 14.

Tabela 14. Termički profil real-time PCR

Korak	Temperatura	Vreme	Broj ciklusa
Inicijalna denaturacija i aktivacija enzima	95°C	10 min	1
Denaturacija	92°C	15 s	40
Hibridizacija/elongacija (očitanje signala)	60°C	1 min	40
Završni korak	72°C	1 min	1

Genotipovi su određivani postupkom alelne diskriminacije, na osnovu klasterizacije uzoraka prema intenzitetu signala dve fluorescentne boje (VIC i FAM), pri čemu je VIC boja odgovarala alelu A, a FAM boja alelu G.

3.3. Statistička obrada podataka

Tokom faze planiranja studije, minimalna veličina uzorka određena je primenom softvera *G*Power* (verzija 3.1.9.7). Uz pretpostavljenu veličinu efekta od 0,3, stopu greške tipa I (α) od 0,05 i statističku snagu od 0,95, uz 2 stepena slobode (df), izračunata minimalna veličina uzorka iznosila je 172 ispitanika.

U opisivanju podataka korišćene su mere deskriptivne statistike (mere centralne tendencije i mere varijabiliteta), uz tabelarni i grafički prikaz rezultata. Razlike u frekvencijama genotipova i alela analizirane su primenom hi-kvadrat (χ^2) testa ili Fisher-ovog egzaktnog testa, u zavisnosti od očekivanih frekvencija. Odstupanja od Hardi-Vajnbergove ravnoteže (engl. *Hardy-Weinberg Equilibrium*, HWE) testirana su Pearson-ovim χ^2 testom. Statističke analize sprovedene su u programu SPSS, verzija 16.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, SAD).

Normalnost raspodele kontinuiranih varijabli proveravana je Shapiro-Wilk testom, a homogenost varijansi Leveneovim testom. Kontinuirane varijable prikazane su kao $\bar{x} \pm SD$ ili medijana (Q1–Q3), u zavisnosti od distribucije, i poređene Studentovim t-testom (odnosno Welch-ovim t-testom kada varijanse nisu jednake) ili Mann-Whitney U testom. Analize su sprovedene na dostupnim podacima, dok je udeo nedostajućih vrednosti ključnih laboratorijskih parametara procenjen u odnosu na ishod.

Prilikom ispitivanja udruženosti genetskih varijanti sa kliničkim ishodima, korekcija na višestruka testiranja sprovedena je kontrolom stope lažnih otkrića (engl. *False Discovery Rate*, FDR) primenom Benjamini-Hochberg procedure ($q = 0,05$). FDR korekcija izračunavana je pomoću *False Discovery Rate Online Calculator*-a (118). Varijable koje su u univarijantnim analizama pokazale statističku značajnost uvršćene su zatim u multivarijantni model logističke regresije, pri čemu je loš ishod (pojava teških komplikacija i/ili smrtni ishod) predstavljao zavisnu varijablu. Haplotipska analiza gena *NOS3* sprovedena je korišćenjem softvera *Haploview 4.2* (Broad Institute, Cambridge, MA, SAD) (119). Vrednosti $p \leq 0,05$ smatrane su statistički značajnim, osim u analizama sa FDR korekcijom gde je prag značajnosti definisan kao $q \leq 0,05$.

4. REZULTATI

U našu studiju uključeno je ukupno 202 pacijenta sa dijagnozom sekundarnog peritonitisa. Demografske i osnovne kliničke karakteristike ispitanika prikazane su u Tabeli 15.

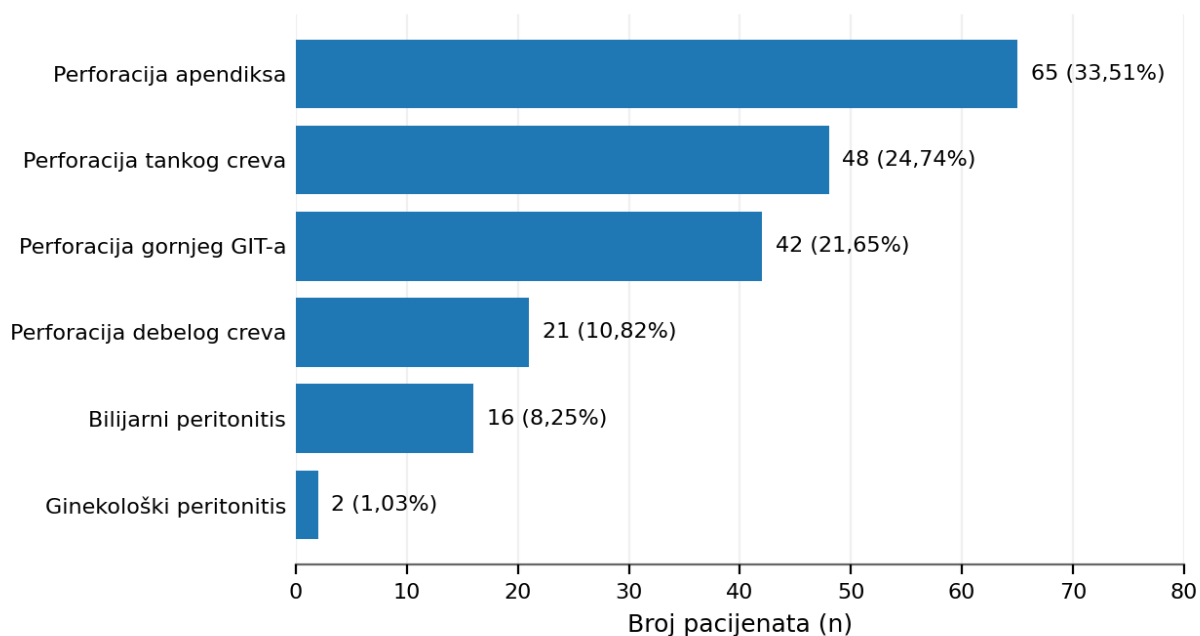
Tabela 15. Demografske i osnovne kliničke karakteristike pacijenata sa sekundarnim peritonitisom

Varijabla	Ispitanici, n (%) / $\bar{x} \pm SD$
Ukupan broj	202
Starost (godine)	56,83 $\pm$ 17,7
Pol	
muški	111 (55,0)
ženski	91 (45,0)
APACHE II skor	10,63 $\pm$ 7,23
MPI	20,30 $\pm$ 7,46
Dužina boravka u JIN (dani)	2,93 $\pm$ 9,35
Izvor peritonitisa, n (%)	
Perforacija gornjeg GIT-a	42 (21,65)
Perforacija tankog creva	48 (24,74)
Perforacija debelog creva	21 (10,82)
Perforacija apendiksa	65 (33,51)
Ginekološki peritonitis	2 (1,03)
Bilijarni peritonitis	16 (8,25)
Tip peritonitisa, n (%)	
Purulentni	155 (80,73)
Sterkoralni	23 (11,98)
Bilijarni	14 (7,29)
Leukociti ($10^9/L$)	14,2 $\pm$ 7,0
Neutrofili (%)	84,30 $\pm$ 11,75
Trombociti ($10^9/L$)	277,33 $\pm$ 105,17
Urea (mmol/L)	8,55 $\pm$ 7,16
Kreatinin ($\mu\text{mol/L}$)	114,02 $\pm$ 83,80
Bilirubin ($\mu\text{mol/L}$)	18,63 $\pm$ 23,75
C-reaktivni protein (mg/L)	168,04 $\pm$ 150,71

Napomena: APACHE II – Acute Physiology and Chronic Health Evaluation II; MPI – Mannheim Peritonitis Index; JIN – jedinica intenzivnog lečenja; GIT – gastrointestinalni trakt.

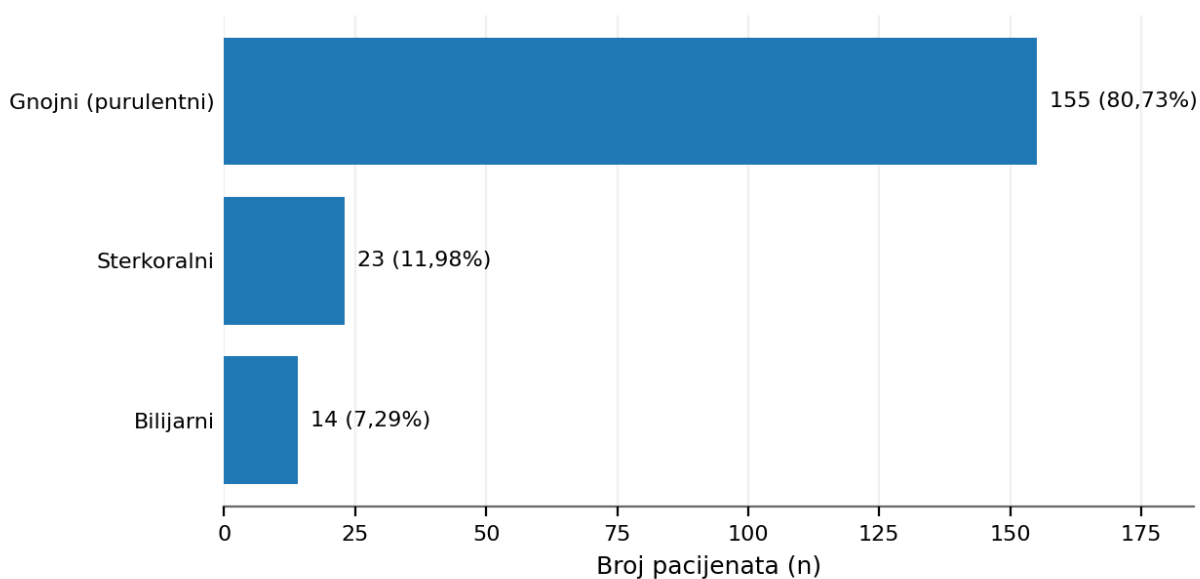
Prosečna starost ispitanika iznosila je 56,83 $\pm$ 17,70 godina, uz blagu dominaciju muškog pola (55,0%). Prosečna vrednost APACHE II skora pri prijemu bila je 10,63 $\pm$ 7,23, što ukazuje na umerenu težinu bolesti u ispitivanoj populaciji. Mannheim Peritonitis Index (MPI) iznosio je u proseku 20,30 $\pm$ 7,46, odražavajući obim i težinu peritonitisa u kohorti.

Kada je reč o izvoru peritonitisa, perforacija apendiksa bila je najčešći uzrok (33,51%), zatim perforacija tankog creva (24,74%) i perforacije gornjeg gastrointestinalnog trakta (21,65%) (Slika 5).



Slika 5. Izvor sekundarnog peritonitisa u ispitivanoj grupi. Podaci su prikazani kao broj pacijenata i procenat (n, %).

Po tipu peritonitisa, gnojni (purulentni) peritonitis bio je najzastupljeniji i registrovan je kod 80,73% pacijenata (Slika 6).



Slika 6. Tip peritonitisa u ispitivanoj grupi. Podaci su prikazani kao broj pacijenata i procenat (n, %).

Osnovni laboratorijski parametri na prijemu prikazani su u Tabeli 15. Povišene vrednosti leukocita, neutrofila i C-reaktivnog proteina bile su u skladu sa sistemskim inflamatornim odgovorom. Parametri bubrežne funkcije (urea i kreatinin), kao i nivo bilirubina, pokazivali su znatnu varijabilnost, što ukazuje na heterogenost kliničke slike i težine bolesti u ispitivanoj grupi.

4.1. Učestalost praćenih komplikacija i ishoda

Tokom hospitalizacije praćena je pojava klinički najznačajnijih komplikacija sekundarnog peritonitisa, uključujući sepsu, multiorgansku disfunkciju/insuficijenciju (MODS/MOF) i akutni respiratorni distress sindrom (ARDS), kao i smrtni ishod. Učestalost navedenih komplikacija i ishoda u ispitivanoj grupi prikazana je u Tabeli 16. Sepsa je registrovana kod 20 (9,9%), MODS kod 29 (14,4%), MOF kod 26 (12,9%), a ARDS kod 26 (12,9%) pacijenata; smrtni ishod zabeležen je kod 26 (12,9%) pacijenata. Prisustvo najmanje jedne komplikacije tokom hospitalizacije registrovano je kod 34 (16,8%) pacijenta, pri čemu je jedan pacijent mogao ispoljiti više različitih komplikacija.

Tabela 16. Učestalost praćenih komplikacija i ishoda kod pacijenata sa sekundarnim peritonitisom.

Komplikacija / ishod	n (%)
Sepsa	20 (9,9)
MODS	29 (14,4)
MOF	26 (12,9)
ARDS	26 (12,9)
Smrtni ishod (intrahospitalni)	26 (12,9)
Prisustvo ≥ 1 komplikacije tokom hospitalizacije	34 (16,8)

4.2. Poređenje ispitanika prema ishodu

Radi identifikacije kliničkih faktora povezanih sa nepovoljnim tokom, ispitanici su podeljeni u dve grupe prema definisanom ishodu: bez lošeg ishoda (bez teških komplikacija) i sa lošim ishodom (pojava ≥ 1 teške komplikacije i/ili smrtni ishod). Uporedna analiza demografskih, kliničkih i laboratorijskih parametara između navedenih grupa prikazana je u Tabeli 17.

Tabela 17. Poređenje demografskih, kliničkih i laboratorijskih parametara u odnosu na ishod (bez komplikacija vs sa ≥ 1 komplikacijom / loš ishod).

Varijabla	Bez komplikacija (n=168)	Sa ≥ 1 komplikacijom (n=34)	p
Starost (godine)	53,89 $\pm$ 16,90	71,24 $\pm$ 14,56	< 0,001
APACHE II	8,75 $\pm$ 4,84	19,94 $\pm$ 9,64	< 0,001
MPI	18,97 $\pm$ 6,18	27,25 $\pm$ 9,50	< 0,001
Dužina boravka u JIN (dani)	0,0 (0,0–0,0)	8,0 (2,25–16,5)	< 0,001
Dužina hospitalizacije (dani)	8,0 (6,0–10,0)	15,5 (6,0–24,0)	< 0,001
Leukociti ($\times 10^9$ /L)	12,70 (9,51–15,93)	8,90 (5,40–18,75)	0,024
Neutrofili (%)	87,30 (84,00–90,90)	88,70 (81,50–92,80)	0,237
Trombociti ($\times 10^9$ /L)	220,5 (175,25–274,75)	227,0 (157,0–304,5)	0,967
Urea (mmol/L)	5,15 (3,63–7,30)	12,50 (8,55–20,85)	< 0,001
Kreatinin (μ mol/L)	76,0 (58,25–92,0)	143,0 (110,0–197,5)	< 0,001
Bilirubin (μ mol/L)	11,6 (7,4–16,0)	14,7 (8,0–21,0)	0,132
CRP (mg/L)	191,6 (88,75–273,0)	172,6 (134,35–253,85)	0,870
Pol			0,905
	muški	92 (54,8%)	19 (55,9%)
	ženski	76 (45,2%)	15 (44,1%)
Izvor peritonitisa			0,002
	Perforacija gornjeg GIT-a	32 (19,5%)	10 (33,3%)
	Perforacija tankog creva	38 (23,2%)	10 (33,3%)
	Perforacija debelog creva	15 (9,1%)	6 (20,0%)
	Perforacija apendiksa	65 (39,6%)	0 (0,0%)
	Ginekološki peritonitis	2 (1,2%)	0 (0,0%)
	Bilijarni peritonitis	12 (7,3%)	4 (13,3%)

Napomena. Kontinuirane varijable prikazane su kao $\bar{x} \pm SD$ ili medijana (Q1–Q3), a kategorijske kao n (%). Poređenje grupa izvršeno je t-testom/Welch-ovim t-testom ili Mann–Whitney U testom, a za kategorijske varijable χ^2 testom (ili Fisher-ovim egzaktnim testom). $p < 0,05$ smatrano je statistički značajnim. (Broj validnih merenja može varirati zbog nedostajućih podataka.)

Ispitanici sa lošim ishodom bili su značajno stariji u odnosu na ispitanike bez komplikacija ($p < 0,001$), uz istovremeno značajno više vrednosti skora težine bolesti (APACHE II) i Mannheim Peritonitis Index-a (MPI) (oba $p < 0,001$). Takođe, u grupi sa lošim ishodom

registrovani su značajno duži boravak u jedinici intenzivne nege i duža hospitalizacija (oba $p < 0,001$).

U pogledu laboratorijskih parametara, vrednosti uree i kreatinina preoperativno bile su značajno više u grupi sa lošim ishodom (oba $p < 0,001$), dok za bilirubin i CRP nije utvrđena statistički značajna razlika između grupa ($p = 0,132$ i $p = 0,870$). Preoperativni broj leukocita se statistički značajno razlikovao između grupa ($p = 0,024$), dok razlike u procentu neutrofila i broju trombocita nisu bile značajne ($p = 0,237$ i $p = 0,967$).

Distribucija pola bila je slična u obe grupe, bez statistički značajne razlike ($p = 0,905$). Nasuprot tome, etiologija/izvor sekundarnog peritonitisa pokazala je značajnu razliku u raspodeli između grupa ($p = 0,002$), pri čemu je u grupi sa lošim ishodom uočen veći udeo perforacija gornjeg gastrointestinalnog trakta i kolona, dok perforacija apendiksa nije bila zastupljena u ovoj grupi (Tabela 17).

4.3. Rezultati molekularno-genetičkih analiza

Nakon prikaza osnovnih kliničkih karakteristika i ishoda, u nastavku su prikazani rezultati genotipizacije ispitivanih polimorfizama i analiza njihove udruženosti sa praćenim kliničkim ishodima.

Molekularno-genetička analiza polimorfizama *NOS2* c.1823C>T (rs2297518), *NOS3* c.-786T>C (rs2070744), *NOS3* c.894G>T (rs1799983), *NOS3* VNTR 4a/4b (rs61722009) i *ACE* I/D (rs4646994) sprovedena je kod svih pacijenata.

Učestalosti genotipova analiziranih polimorfizama bile su u saglasnosti sa HWE, a učestalosti alela bile su uporedive sa podacima dostupnim u javno dostupnim referentnim bazama (npr. NCBI/dbSNP) i odgovarale su evropskim referentnim populacijama (120). Izuzetak je predstavljao *ACE* I/D polimorfizam (rs4646994, novi referentni broj u bazama je rs1799752), za koji je u našoj populaciji utvrđeno odstupanje od HWE, dok u javno dostupnim referentnim bazama (npr. NCBI/dbSNP) za ovaj polimorfizam nisu dostupni populacioni podaci o frekvencijama alela.

4.3.1. Učestalosti genotipova i alela u ukupnom uzorku

Distribucije genotipova i alela analiziranih polimorfizama u ukupnom uzorku prikazane su u Tabeli 18. Kod polimorfizma *NOS2* c.1823C>T (rs2297518), genotip GG je identifikovan kod 58,9% pacijenata, dok su GA i AA bili zastupljeni sa 33,7% i 7,4%; alelne frekvencije iznosile su G=0,76 i A=0,24.

U okviru polimorfizma *NOS3* c.-786T>C (rs2070744), najčešći genotipovi bili su TC (47,0%) i TT (45,0%), dok je CC genotip bio zastupljen kod 7,9% pacijenata; alelne frekvencije iznosile su T=0,69 i C=0,31.

Za *NOS3* VNTR 4a/4b (rs61722009), najzastupljeniji genotip bio je 4b/4b (67,3%), uz alelne frekvencije 4b=0,83 i 4a=0,17.

Polimorfizam *NOS3* c.894G>T (rs1799983) pokazao je predominaciju genotipa GG (52,0%), dok su genotipovi GT i TT bili zastupljeni sa 39,6% i 8,4%; alelne frekvencije iznosile su G=0,72 i T=0,28.

ACE I/D (rs4646994) je u odnosu na ostale polimorfizme pokazao odstupanje od HWE (manjak heterozigota), dok su učestalosti genotipova i alela prikazane u Tabeli 17.

Tabela 18. Učestalosti genotipova i alela analiziranih polimorfizama (N=202).

Polimorfizam (rsID)	Genotipovi/Aleli*	Učestalost
<i>NOS2</i> c.1823C>T (rs2297518)**	GG	119 (58,9)
	GA	68 (33,7)
	AA	15 (7,4)
	G	0,76
	A	0,24
<i>NOS3</i> c.-786T>C (rs2070744)	TT	91 (45,0)
	TC	95 (47,0)
	CC	16 (7,9)
	T	0,69
	C	0,31
<i>NOS3</i> VNTR 4a/4b (rs61722009)	4b/4b	136 (67,3)
	4a/4b	64 (31,7)
	4a/4a	2 (1,0)
	4b	0,83
	4a	0,17
<i>NOS3</i> c.894G>T (rs1799983)	GG	105 (52,0)
	GT	80 (39,6)
	TT	17 (8,4)
	G	0,72
	T	0,28
<i>ACE</i> I/D (rs4646994)	DD	103 (51,0)
	ID	59 (29,2)
	II	40 (19,8)
	D	0,66
	I	0,34

Napomena: *Alelne vrednosti su prikazane kao frekvencije (f). ***NOS2* c.1823C>T (rs2297518): u prikazu alela i genotipova korišćena je oznaka G/A prema genomskom DNK lancu (G = C, A = T prema HGVS nomenklaturi, a u tabeli su zadržane genomske oznake radi usklađenosti sa ostalim polimorfizmima).

4.3.2. Udruženost analiziranih polimorfizama sa teškim komplikacijama

Udruženost polimorfizama sa teškim komplikacijama analizirana je primenom dominantnog genetičkog modela (nosioci varijantnog alela u jednoj grupi, u poređenju sa referentnim homozigotima). Rezultati univarijantnih analiza za ARDS, MODS, MOF i sepsu prikazani su u Tabelama 19, 20 i 22, dok su rezultati multivarijantne logističke regresije za MODS i MOF prikazani u Tabeli 21.

4.3.2.1. Udruženost analiziranih polimorfizama sa ARDS

U univariјantnoj analizi, statistički značajna asociјacija sa razvoјem ARDS utvrđena je za *NOS2* c.1823C>T (rs2297518), gde je genotip GG bio zastupljen u većem procentu kod pacijenata sa ARDS u odnosu na grupu bez ARDS (76,9% naspram 56,3%; $p=0,046$) (Tabela 19). U multivariјantnom logističkom regresionom modelu, povezanost genotipa *NOS2* c.1823C>T GG sa povećanim rizikom za razvoj ARDS nije dostigla statističku značajnost ($p_{ARDS}=0,211$). Za ostale analizirane polimorfizme *NOS3* i *ACE* gena nije uočena statistički značajna povezanost sa razvoјem ARDS ($p>0,05$).

Tabela 19. Udruženost analiziranih polimorfizama sa razvoјem ARDS kod pacijenata sa sekundarnim peritonitisom (N=202).

Polimorfizam (rsID) / genotip	Bez ARDS, n (%)	Sa ARDS, n (%)	p*
<i>NOS2</i> c.1823C>T (rs2297518)**			0,046
GG	99 (56,3)	20 (76,9)	
GA+AA	77 (43,8)	6 (23,1)	
<i>NOS3</i> c.-786T>C (rs2070744)			0,165
TT	76 (43,2)	15 (57,7)	
TC+CC	100 (56,8)	11 (42,3)	
<i>NOS3</i> VNTR 27 bp 4a/4b (rs61722009)			0,503
4b/4b	117 (66,5)	19 (73,1)	
4a/4b + 4a/4a	59 (33,5)	7 (26,9)	
<i>NOS3</i> c.894G>T (rs1799983)			0,143
GG	88 (50)	17 (65,4)	
GT+TT	88 (50)	9 (34,6)	
<i>ACE</i> I/D (rs4646994)			0,755
DD	89 (50,6)	14 (53,8)	
ID+II	87 (49,4)	12 (46,2)	

* p-vrednosti dobijene χ^2 testom ili Fisher-ovim egzaktnim testom. Prikazan je dominantni model (varijantni nosioci vs referentni homozigoti). ** *NOS2*: aleli su prikazani kao G/A prema genomskom DNK lancu (G = C, A = T prema HGVS).

4.3.2.2. Udruženost analiziranih polimorfizama sa MODS i MOF

U odnosu na razvoj MODS i MOF, statistički značajne asociјacije u univariјantnoj analizi utvrđene su za polimorfizam *NOS3* c.-786T>C (rs2070744), gde je genotip TT bio zastupljen u većem procentu kod pacijenata sa MODS (65,5% naspram 41,6%; $p=0,017$) i MOF (69,2% naspram 41,5%; $p=0,008$) u poređenju sa nosiocima alela C (TC+CC) (Tabela 20).

Kod polimorfizma *NOS2* c.1823C>T, genotip GG je takođe bio zastupljen u većem procentu kod pacijenata sa MODS u odnosu na grupu bez MODS (75,9% naspram 56,1%; $p=0,045$), dok udruženost sa razvojem MOF nije bila statistički značajna (65,4% naspram 58,0%; $p=0,472$) (Tabela 20). Ostali analizirani polimorfizmi nisu pokazali statistički značajne asocijacije sa MODS ili MOF ($p>0,05$).

Tabela 20. Udruženost analiziranih polimorfizama sa razvojem MODS i MOF kod pacijenata sa sekundarnim peritonitisom (N=202).

Polimorfizam (rsID) / genotip	Bez MODS, n (%)	Sa MODS, n (%)	p^*	Bez MOF, n (%)	Sa MOF, n (%)	p^*
NOS2 c.1823C>T (rs2297518)			0,045			0,472
GG	97 (56,1)	22 (75,9)		102 (58)	17 (65,4)	
GA+AA	76 (43,9)	7 (24,1)		74 (42)	9 (34,6)	
NOS3 c.-786T>C (rs2070744)			0,017			0,008
TT	72 (41,6)	19 (65,5)		73 (41,5)	18 (69,2)	
TC+CC	101 (58,4)	10 (34,5)		103 (58,5)	8 (30,8)	
NOS3 VNTR 4a/4b (rs61722009)			0,290			0,264
4b/4b	114 (65,9)	22 (75,9)		116 (65,9)	20 (76,9)	
4a/4b + 4a/4a	59 (34,1)	7 (24,1)		60 (34,1)	6 (23,1)	
NOS3 c.894G>T (rs1799983)			0,439			0,296
GG	88 (50,9)	17 (58,6)		89 (50,6)	16 (61,5)	
GT+TT	85 (49,1)	12 (41,4)		87 (49,4)	10 (38,5)	
ACE I/D (rs4646994)			0,626			0,249
DD	87 (50,3)	16 (55,2)		87 (49,4)	16 (61,5)	
ID+II	86 (49,7)	13 (44,8)		89 (50,6)	10 (38,5)	

* p -vrednosti dobijene χ^2 testom ili Fisher-ovim egzaktnim testom. Prikazan je dominantni model (varijantni nosioci vs referentni homozigoti).

Nakon korekcije na multipla testiranja metodom *False Discovery Rate* (FDR, $q=0,05$), asocijacija između *NOS3* c.-786T>C i MOF ostala je statistički značajna ($p=0,032$), dok je asocijacija sa MODS izgubila statističku značajnost, uz trend ka povećanom riziku ($p=0,068$). Asocijacija *NOS2* c.1823C>T sa MODS nije zadržala statističku značajnost nakon FDR korekcije ($p=0,090$).

U multivarijantnim logističkim regresionim modelima, prilagođenim za pol, starost, izvor peritonitisa i APACHE II skor, genotip *NOS3* c.-786T>C TT ostao je nezavisan prediktor

razvoja MOF ($p=0,006$; OR=4,86; 95% CI 1,56–15,13) i MODS ($p=0,047$; OR=3,67; 95% CI 1,02–13,19) (Tabela 22). U oba modela, starija dob ($p_{MODS}=0,009$; $p_{MOF}=0,030$) i viši APACHE II skor ($p_{MODS}<0,001$; $p_{MOF}=0,002$) bili su značajni prediktori nepovoljnih ishoda, dok pol i izvor peritonitisa nisu pokazali statistički značajnu povezanost (Tabela 21). Povezanost genotipa *NOS2* c.1823C>T GG sa razvojem MODS-a nije dostigla statističku značajnost u multivarijantnim modelima ($p_{MODS}=0,146$).

Tabela 21. Multivarijantna logistička regresija za MODS i MOF.

Prediktor	MODS OR (95% CI)*	p	MOF OR (95% CI)*	p
<i>NOS3</i> c.-786T>C (TT genotip)	3,67 (1,02–13,19)	0,047	4,86 (1,56–15,13)	0,006
Pol	0,67 (0,19–2,42)	0,539	1,5 (0,517–4,58)	0,438
Uzrast	1,08 (1,02–1,15)	0,009	1,05 (1,01–1,1)	0,030
Izvor peritonitisa	0,78 (0,53–1,13)	0,189	0,85 (0,62–1,18)	0,337
APACHE II skor	1,25 (1,13–1,38)	<0,001	1,13 (1,05–1,21)	0,002

*Prikazani su prilagođeni odnosi šansi (OR) sa 95% intervalima pouzdanosti (CI).

4.3.2.3. Udruženost analiziranih polimorfizama sa sepsom

Udruženost analiziranih polimorfizama sa pojavom sepse nije pokazala statistički značajne asocijacije ($p>0,05$) (Tabela 22).

Tabela 22. Udruženost analiziranih polimorfizama sa pojavom sepse kod pacijenata sa sekundarnim peritonitisom.

Polimorfizam (rsID)/Genotip	Bez sepse, n (%)	Sa sepsom, n (%)	p*
<i>NOS2</i> c.1823C>T (rs2297518)			0,154
GG	104 (57,1)	15 (75)	
GA+AA	78 (42,9)	5 (25)	
<i>NOS3</i> c.-786T>C (rs2070744)			0,639
TT	81 (44,5)	10 (50)	
TC+CC	101 (55,5)	10 (50)	
<i>NOS3</i> VNTR 27 bp 4a/4b (rs61722009)			0,788
4b/4b	122 (67)	14 (70)	
4a/4b + 4a/4a	60 (33)	6 (30)	
<i>NOS3</i> c.894G>T (rs1799983)			0,776
GG	94 (51,6)	11 (55)	
GT+TT	88 (48,4)	9 (45)	
<i>ACE</i> I/D (rs4646994)			0,705
DD	92 (50,5)	11 (55)	
ID+II	90 (49,5)	9 (45)	

* p-vrednosti dobijene χ^2 testom ili Fisher-ovim egzaktnim testom. Prikazan je dominantni model (varijantni nosioci vs referentni homozigoti).

4.3.3. Udruženost analiziranih polimorfizama sa intrahospitalnim mortalitetom

Udruženost analiziranih polimorfizama sa intrahospitalnim mortalitetom prikazana je u Tabeli 23. Analize su sprovedene primenom dominantnog genetičkog modela, pri čemu su nosioci varijantnog alela grupisani zajedno (heterozigoti + varijantni homozigoti) i upoređeni sa referentnim homozigotima.

Tabela 23. Udruženost analiziranih polimorfizama sa intrahospitalnim mortalitetom kod pacijenata sa sekundarnim peritonitisom.

Polimorfizam (rsID)/Genotip	Pacijenti, n (%)	Preživeli, n (%)	Umrli, n (%)	p
<i>NOS2</i> c.1823C>T (rs2297518)				0,252
GG	119 (58,9)	101 (57,4)	18 (69,2)	
GA+AA	83 (41,1)	75 (42,6)	8 (30,8)	
<i>NOS3</i> c.-786T>C (rs2070744)				0,070
TT	91 (45,0)	75 (42,6)	16 (61,5)	
TC+CC	111 (55,0)	101 (57,4)	10 (38,5)	
<i>NOS3</i> VNTR 27 bp 4a/4b (rs61722009)				0,264
4b/4b	136 (67,3)	116 (65,9)	20 (76,9)	
4a/4b + 4a/4a	66 (32,7)	60 (34,1)	6 (23,1)	
<i>NOS3</i> c.894G>T (rs1799983)				0,532
GG	105 (52,0)	90 (51,1)	15 (57,7)	
GT+TT	97 (48,0)	86 (48,9)	11 (42,3)	
<i>ACE</i> I/D (rs4646994)				0,755
DD	103 (51,0)	89 (50,6)	14 (53,8)	
ID+II	99 (49,0)	87 (49,4)	12 (46,2)	

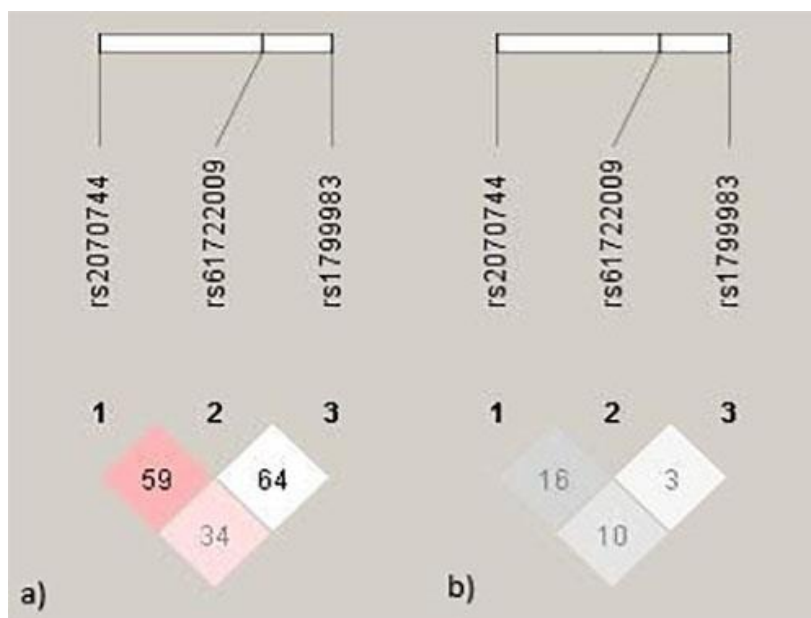
Skraćenice: SNP – polimorfizam pojedinačnih nukleotida; NOS – azot-monoksid sintetaza; VNTR – polimorfizmi broja uzastopnih ponavaka.

U univariјantnoj analizi nije utvrđena statistički značajna povezanost nijednog od ispitivanih polimorfizama, uključujući i *ACE* I/D (rs4646994), sa intrahospitalnim mortalitetom ($p>0,05$). U grupi umrlih bilo je ukupno 26 (12,9%) pacijenata.

U cilju dodatne procene kombinovanog efekta varijanti *NOS3* gena, u nastavku je sprovedena analiza haplotipova formiranih na osnovu polimorfizama rs2070744, rs61722009 i rs1799983.

4.3.4. Analiza haplotipova *NOS3* gena

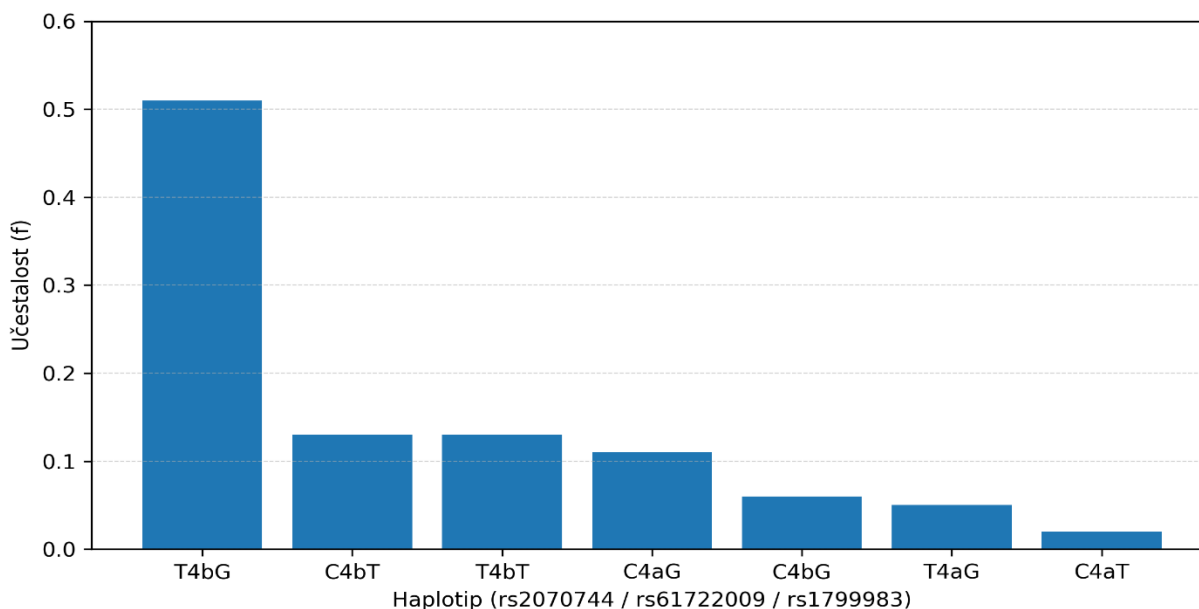
Analiza haplotipova sprovedena je radi procene kombinovanog efekta tri polimorfizma *NOS3* gena: c.-786T>C (rs2070744), VNTR 4a/4b (rs61722009) i c.894G>T (rs1799983). Neravnoteža vezanosti (LD) između analiziranih varijanti procenjena je na osnovu vrednosti D' i r^2 , a rezultati su prikazani na Slici 7. U ispitivanom uzorku nije identifikovan jasno definisan haplotip-blok, što ukazuje na odsustvo jake povezanosti između ispitivanih varijanti.



Slika 7. Neravnoteža vezanosti (LD) između polimorfizama *NOS3* gena.

(a) Prikazane su parne D' vrednosti obeležene nijansama crvene boje i numeričkim oznakama. Tamnocrvena boja ukazuje na potpunu LD povezanost ($D'=1$) uz $\text{LOD}>2$, dok svetlije nijanse predstavljaju niže vrednosti. (b) Prikazane su parne r^2 vrednosti obeležene nijansama sive boje i numeričkim oznakama. Tamnije nijanse ukazuju na jaču korelaciju (više r^2) između varijanti.

U ukupnom uzorku identifikovano je sedam haplotipova (redosled polimorfizama: rs2070744 / rs61722009 / rs1799983): T4bG, C4bT, T4bT, C4aG, C4bG, T4aG i C4aT. Najzastupljeniji haplotip bio je T4bG ($f=0,51$). Haplotipovi C4bT i T4bT bili su prisutni sa frekvencijama od po 0,13, dok su učestalosti ostalih haplotipova iznosile 0,11 (C4aG), 0,06 (C4bG), 0,05 (T4aG) i 0,02 (C4aT). Grafički prikaz učestalosti haplotipova prikazan je na Slici 8.



Slika 8. Učestalosti haplotipova *NOS3* gena u ukupnom uzorku (N=202). Haplotipovi su formirani na osnovu rs2070744, rs61722009 i rs1799983. Na ordinati je prikazana učestalost (f) haplotipova.

U analizi udruženosti haplotipova sa kliničkim ishodima, haplotip T4bG bio je statistički značajno češći kod pacijenata sa teškim komplikacijama (Tabela 24). Učestalost T4bG haplotipa bila je veća kod pacijenata sa MODS u odnosu na pacijente bez MODS-a (0,64 vs. 0,48; $p=0,026$), kao i kod pacijenata sa MOF (0,61 vs. 0,48; $p=0,048$). Takođe, T4bG haplotip bio je značajno češći kod pacijenata sa sepsom u odnosu na one bez sepse (0,70 vs. 0,49; $p=0,018$). Ostali haplotipovi nisu pokazali statistički značajne asocijacije sa analiziranim ishodima ($p>0,05$).

Tabela 24. Učestalost T4bG haplotipa u odnosu na MODS, MOF i sepsu.

Ishod	T4bG (sa ishodom), f	T4bG (bez ishoda), f	p*
MODS	0,64	0,48	0,026
MOF	0,61	0,48	0,048
Sepse	0,70	0,49	0,018

* p-vrednosti dobijene su poređenjem frekvencija haplotipa između grupa (sa/bez ishoda).

5. DISKUSIJA

Sekundarni peritonitis predstavlja jedno od najtežih stanja urgentne abdominalne hirurgije, čiji klinički tok često nije određen samo lokalnom intraperitonealnom infekcijom, već pre svega razvojem sistemskih komplikacija koje značajno produžavaju lečenje i povećavaju rizik od nepovoljnog ishoda (2,13). Klinička specifičnost ovog stanja je da konačni ishod zavisi od pravovremenosti i uspešnosti hirurške sanacije izvora infekcije i intenziteta sistemskog odgovora domaćina, pri čemu upravo taj sistemski odgovor može pokrenuti kaskadu endotelne disfunkcije i mikrocirkulatornih poremećaja (5,121). Teške komplikacije najčešće obuhvataju sepsu, ARDS, MODS i MOF, dok je multiorganska disfunkcija jedna od ključnih determinanti prognoze (20,30).

Patofiziološka osnova ovih komplikacija zasniva se na izraženoj endotelnoj disfunkciji, poremećaju mikrocirkulacije i disbalansu mehanizama koji regulišu vaskularni tonus, permeabilnost i hemostazu. U savremenim pregledima se ističe da endotelna aktivacija predstavlja centralni događaj u razvoju sepsom indukovane multiorganske disfunkcije, ali i progresiji sistemskih komplikacija kod teških infekcija, uključujući intraabdominalne infekcije (78,85).

U okviru regulatornih mehanizama vaskularne homeostaze, NO signalni put ima centralno mesto: eNOS (NOS3) doprinosi održavanju fiziološke vaskularne reaktivnosti i integriteta endotela, dok se iNOS (NOS2) tokom inflamacije snažno aktivira i doprinosi vazoplegiji, hipotenziji i poremećaju tkivne perfuzije (72–74). Paralelno, RAAS predstavlja dodatnu osovinu regulacije vaskularnog tonusa i endotelne funkcije, zbog čega je ACE I/D polimorfizam razmatran kao potencijalni faktor rizika u teškim infekcijama i njihovim komplikacijama. Rezultati dosadašnjih studija i meta-analiza su neujednačeni, a neka istraživanja nisu potvrdila povezanost sa ishodom kod kritično obolelih (75,79,122,123).

Na osnovu ovih patofizioloških pretpostavki, u ovoj studiji je ispitivana povezanost polimorfizama *NOS2*, *NOS3* i *ACE* gena sa razvojem teških komplikacija i ishodom kod bolesnika sa sekundarnim peritonitisom. Nije uočena statistički značajna povezanost između ispitivanih polimorfizama i intrahospitalnog mortaliteta, što je očekivano imajući u vidu da letalni ishod najčešće predstavlja rezultat kompleksne interakcije kliničkih faktora (težina bolesti, starost, komorbiditeti i kontrola izvora infekcije), dok se genetski uticaj može odraziti na težinu kliničkog toka bolesti, pre svega kroz sklonost ka razvoju komplikacija (85,124). Zbog toga ishodi poput MODS i MOF mogu biti pogodniji za uočavanje genetskih asocijacija nego intrahospitalni mortalitet, budući da neposrednije odražavaju poremećaje mikrocirkulacije, endotelne barijere i perfuzije tkiva (20,40). Dodatno, na mortalitet snažno utiču i faktori organizacije lečenja, poput blagovremene dijagnostike, brzine hirurške sanacije i primene adekvatne terapije, pa se eventualni mali genetski doprinos teže uočava kada se posmatra samo krajnji ishod (125,126). U tom kontekstu, u ovoj studiji je utvrđena značajna povezanost *NOS3* c.-786T>C polimorfizma sa razvojem MODS i MOF, pri čemu je TT genotip zadržao značaj i nakon multivarijantnog prilagođavanja za pol, uzrast, izvor peritonitisa i APACHE II skor. Posebno je važno istaći da je u modelu za MOF TT genotip bio povezan sa gotovo petostruko većim odnosom šansi za razvoj ove komplikacije (OR 4,86; 95% CI 1,56–15,13; $p=0,006$), dok je i za MODS potvrđena značajna povezanost (OR 3,67; 95% CI 1,02–13,19; $p=0,047$). Ovakav nalaz može imati potencijalni praktični značaj pre svega u domenu stratifikacije rizika za multiorganske komplikacije, odnosno ranijeg

prepoznavanja bolesnika kod kojih postoji veća verovatnoća razvoja MODS i MOF uprkos standardnoj proceni težine bolesti. U praktičnom smislu, genotip ne bi trebalo tumačiti izolovano, već kao dopunu kliničkim pokazateljima, pri čemu bi njegova eventualna korist mogla biti najveća u ranoj fazi hospitalizacije, kada se donose odluke o intenzitetu praćenja i učestalosti ponovne procene organskih funkcija. Takav pristup ne bi podrazumevao promenu terapijskih principa na osnovu samog genotipa, već pre svega pažljivije kliničko praćenje i ranije prepoznavanje bolesnika kod kojih je verovatniji razvoj multiorganske disfunkcije. Istovremeno, imajući u vidu veličinu uzorka, širinu intervala poverenja i potrebu za potvrdom u nezavisnim kohortama, kao i potrebu da se proceni dodatna prediktivna vrednost u odnosu na postojeće kliničke skorove, ove rezultate za sada treba posmatrati kao osnovu za dalja istraživanja, a ne kao dovoljan osnov za rutinsku primenu genotipizacije u kliničkoj praksi. U nastavku diskusije ovi nalazi biće sagledani u kontekstu rezultata ranijih istraživanja, uz razmatranje mogućih razloga neujednačenosti nalaza u literaturi i izostanka značajnosti za pojedine varijante.

U okviru *NOS2* gena u našoj studiji ispitivana je samo varijanta rs2297518. Reč je o polimorfizmu u kodirajućem delu gena (opisivan i kao c.1823C>T), u egzonu 16, koji dovodi do zamene aminokiseline serin u leucin na poziciji 608 u iNOS proteinu (Ser608Leu), pa se u literaturi razmatra u kontekstu jačine inflamatornog odgovora i intenziteta NO produkcije tokom teških infekcija (73,74). U našoj kohorti rs2297518 nije pokazala statistički značajnu povezanost sa sepsom, MOF niti sa intrahospitalnim mortalitetom. Međutim, u univarijantnoj analizi uočena je povezanost sa razvojem MODS i ARDS, pri čemu je GG genotip bio češći među pacijentima koji su razvili ove komplikacije, ali se nakon multivarijantnog prilagođavanja ova značajnost nije održala. S tim u vezi, treba imati u vidu da su MODS i ARDS u našoj kohorti bili relativno retki događaji (14,4% i 12,9%), što može umanjiti statističku snagu i doprineti tome da se asocijacija ne održi nakon prilagođavanja za relevantne kliničke faktore.

Biološka osnova za razmatranje ovog polimorfizma u kontekstu ARDS-a postoji zato što je iNOS jedan od ključnih izvora NO tokom intenzivne inflamacije, a NO u plućima može imati dvosmerno dejstvo. Sa jedne strane doprinosi antimikrobnoj odbrani i regulaciji perfuzije, dok u uslovima prekomerne produkcije može podstaći oksidativni i nitrozativni stres, nastanak peroksinitrita i oštećenje alveolokapilarne barijere (127,128). Ovaj koncept podržavaju i eksperimentalni nalazi u sepsi i akutnoj povredi pluća. U mišjem CLP modelu (cekalna ligatura i punkcija), koji predstavlja standardni eksperimentalni model polimikrobne sepse ili peritonitisa, Wang i sar. su pokazali da je sepsom indukovano curenje proteina kroz plućnu mikrocirkulaciju zavisno od iNOS, pri čemu je presudan doprinos poticao od iNOS u inflamatornim ćelijama porekla iz koštane srži, dok je njegovo odsustvo ili inhibicija ublažavalo poremećaj propustljivosti (129). U endotoksičnom modelu, Kristof i sar. su opisali da kod iNOS "*knockout*" miševa dolazi do blaže akutne povrede pluća i manjeg poremećaja alveolokapilarne barijere u poređenju sa "*wild-type*" miševima, uz izostanak izraženih markera nitrozativnog stresa (130). Pojedini noviji radovi u endotoksemiji dodatno ukazuju da smanjenje iNOS ekspresije može pratiti blaže oštećenje pluća. Na primer, u HDAC6 "*knockout*" modelu opisana je niža iNOS ekspresija uz blaže inflamatorne i histološke promene u plućima (131).

Istovremeno, noviji radovi ukazuju da se efekti iNOS mogu razlikovati u zavisnosti od faze sepse i dominantnog mehanizma koji se posmatra. U ranoj fazi eksperimentalne sepse, pre razvoja kasnijih hemodinamskih i multiorganskih promena, u modelu indukovanom intraperitonealnom inokulacijom žive *E. coli* kod miševa bez mijeloperoksidaze (MPO-/-), opisano je da povišena bazalna ekspresija iNOS i veća produkcija NO prate blažu povredu pluća i bolji rani ishod (132). U istoj studiji, inhibicija iNOS u ovoj grupi bila je praćena izraženijim edemom i nižim preživljavanjem, što dodatno naglašava da efekat iNOS može biti vremenski uslovljen. Nasuprot tome, u CLP modelu sepse pokazano je da u kasnijoj fazi iNOS-posredovana produkcija NO može biti povezana sa razvojem hipodinamskog stanja i težim tokom bolesti, uz izraženu indukciju iNOS u plućima (133). Ovi modeli ne mogu direktno objasniti genetske asocijacije kod ljudi, ali pružaju važan biološki okvir za razumevanje potencijalnih posledica varijabilnosti iNOS aktivnosti.

U pojedinim kliničkim studijama ova varijanta se povezuje i sa specifičnim ishodima tokom sepse. Na primer, u jednoj kohorti pacijenata sa sepsom opisana je veća učestalost septičkog šoka kod nosilaca A alela (GA/AA) u odnosu na nosioce GG genotipa (80). U istom radu je urađen i eksperiment u ćelijskoj kulturi, gde je GA genotip pokazao trend ka višoj iNOS-posredovanoj produkciji NO u odnosu na GG genotip (80). Ono što je takođe bitno naglasiti je da se rs2297518 ne razmatra isključivo u okviru akutne inflamacije, već je ispitivana i u hroničnim inflamatornim stanjima, gde se pojačana aktivnost iNOS i posledična produkcija NO smatraju relevantnim mehanizmima oštećenja tkiva. Kod inflamatorne bolesti creva sa veoma ranim početkom (engl. *very early onset inflammatory bowel disease*, VEO-IBD) rs2297518 je bila povezana sa bolešću, uz funkcionalne nalaze koji ukazuju na višu produkciju NO procenjenju Griess reakcijom (kolorimetrijska metoda koja indirektno meri NO preko koncentracije nitrita i nitrata) i izraženije bojenje na nitrotirozin u biopsijama uzetim iz kolona, što ukazuje na izraženiji nitrozativni stres u inflamiranom tkivu (97). Pored toga, ova varijanta je ispitivana i u dijabetesu tipa 2, stanju koje se uopšteno povezuje sa hroničnom sistemskom inflamacijom niskog intenziteta i povećanim oksidativnim stresom. U jednoj studiji je navedeno da je A alel bio češći među obolelima, a da je kombinacija rs2297518 sa polimorfizmom u genu za glutation S-transferazu (*GSTT1*, rs17856199) pokazala jaču povezanost sa rizikom za dijabetes tipa 2 (134). Ovi podaci ukazuju da ovaj polimorfizam u *NOS2* genu može biti potencijalno relevantan za intenzitet iNOS odgovora u različitim kliničkim okvirima, što je važno pri interpretaciji nalaza u hirurškim kohortama sa sekundarnim peritonitisom.

Uočena povezanost *NOS3* c.-786T>C sa razvojem MODS i MOF može se razmatrati u svetlu uloge eNOS u održavanju endotelne funkcije, vaskularne reaktivnosti i mikrocirkulacije. U uslovima sistemske inflamacije poremećaj endotelne homeostaze predstavlja jedan od ključnih mehanizama progresije ka multiorganskoj disfunkciji (78). NO pritom ima složenu, dvosmernu ulogu: iNOS-posredovana produkcija NO može doprineti gubitku vaskularnog tonusa i hemodinamskoj nestabilnosti, dok promene u eNOS signalnom putu mogu pogoršati mikrocirkulaciju i perfuziju tkiva, čime se olakšava nastanak organske disfunkcije (72–74). Zbog toga je verovatnije da se efekat promotorske varijante *NOS3* ne ispoljava kao jednostavna promena nivoa NO, već kroz finije promene u endotelnoj reaktivnosti u uslovima izraženog inflamatornog i oksidativnog stresa.

Dosadašnja istraživanja ukazuju da varijanta c.-786T>C može uticati na promotorsku aktivnost *NOS3*, pri čemu se C alel u više radova dovodi u vezu sa nižom transkripcionom aktivnošću i potencijalno nižom bazalnom bioraspoloživostu NO, što bi moglo doprineti većoj osetljivosti endotela u uslovima sistemskog stresa (98,135,136).

Međutim, kliničke studije u sepsi nisu dale ujednačene rezultate, što je u skladu sa kompleksnom ulogom NO kod teško obolelih pacijenata. U studiji Zhu i sar. (2010), sprovedenoj kod pacijenata sa teškom sepsom, analizirani su polimorfizmi *NOS3* gena i njihova povezanost sa parametrima težine kliničkog toka i ishodom lečenja. U toj studiji nije uočena značajna povezanost varijante c.-786T>C sa težinom bolesti niti sa ishodom, dok su pojedine druge *NOS3* varijante u istom dizajnu pokazale udruženost sa analiziranim parametrima (137). Slično tome, Ma i sar. u kohorti bolesnika sa teškom sepsom nisu našli povezanost ovog polimorfizma sa stepenom organske disfunkcije niti sa mortalitetom, iako je u istoj studiji druga ispitivana varijanta c.894G>T pokazala značajnu povezanost sa težinom bolesti i smrtnim ishodom (138). Nasuprot tome, Özkan i sar. (139) su u turskoj studiji slučaja i kontrola koja je uključila 188 odraslih pacijenata sa sepsom i 188 zdravih kontrola analizirali *NOS3* c.-786T>C i pokazali da je prisustvo TC genotipa i C alela bilo udruženo sa većom verovatnoćom za nastanak sepse, uz multivarijantno prilagođavanje za starost i pol. Ovakve razlike između studija verovatno odražavaju razlike u dizajnu (slučaj-kontrola naspram kohorte), populaciji i, što je posebno važno, izboru krajnjih ishoda: jedne studije procenjuju podložnost za sepsu, dok druge procenjuju težinu toka i komplikacije kod već obolelih.

Upravo to može pomoći da se objasni i zašto se kod nas kao faktor rizika izdvaja T alel/TT genotip, dok se u nekim ranijim radovima naglašava C alel. Kod sekundarnog peritonitisa, koji odlikuje infekcija sa izraženim inflamatornim i oksidativnim stresom, posledice nisu određene samo količinom NO, već time kako endotel reaguje u uslovima sistemske inflamacije. U takvom okruženju, veća aktivnost eNOS ne mora biti nužno zaštitna, ona može pratiti ili pojačati hemodinamsku nestabilnost kroz izraženu vazodilataciju i pad perifernog otpora, ali i doprineti nitrozativnom stresu i poremećaju mikrocirkulacije. Zbog toga se efekat promotorske varijante *NOS3* verovatno ne svodi na prosto „više ili manje NO”, već na to da li je endotelna regulacija dovoljno stabilna da održi adekvatnu perfuziju i barijernu funkciju kada je inflamacija intenzivna (127,128,140). Posebnu težinu ima činjenica da je asocijacija uočena upravo u odnosu na MODS i MOF, ishode koji predstavljaju neposrednu posledicu poremećaja mikrocirkulacije i integriteta endotelne barijere, te se mogu dovesti u jasnu patofiziološku vezu sa eNOS i NO regulacijom. Takođe, stabilnost ove povezanosti nakon multivarijantnog prilagođavanja za ključne kliničke faktore govori u prilog tome da nalaz ne predstavlja samo odraz opšte težine bolesti.

U okviru *NOS3* gena, analiza haplotipova pruža dodatni uvid jer sagledava zajednički efekat varijanti koje se često nasleđuju zajedno, a koje u kombinaciji mogu bolje odraziti razlike u regulaciji eNOS i bioraspoloživosti NO u endotelu nego svaka varijanta posmatrana izolovano. U našoj kohorti identifikovano je sedam haplotipova formiranih od rs2070744 (c.-786T>C), rs61722009 (intron 4 VNTR 4a/4b) i rs1799983 (c.894G>T), pri čemu je najzastupljeniji bio haplotip T4bG. U našem uzorku posebno se izdvaja nalaz da je haplotip T4bG bio učestaliji kod bolesnika sa teškim komplikacijama, naročito kod pacijenata sa MODS i MOF, kao i kod onih sa sepsom u odnosu na pacijente bez tih ishoda, dok ostali

haplotipovi nisu dostigli statističku značajnost. Funkcionalni podaci pružaju dodatni okvir za tumačenje ovakvih nalaza. Wang i sar. su u funkcionalnom eksperimentalnom modelu pokazali da efekat promotorske varijante c.-786T>C na transkripcionu aktivnost promotora NOS3 zavisi od toga koja je varijanta intronskog 27-bp VNTR prisutna uz nju. Testirane su četiri kombinacije ovih varijanti (T-5x, T-4x, C-5x i C-4x), pri čemu 4x i 5x označavaju kraću i dužu VNTR varijantu sa četiri, odnosno pet ponovaka od 27 bp. Dobijene razlike u obrascu aktivnosti govore u prilog haplotip-specifičnoj regulaciji transkripcione aktivnosti promotora NOS3, odnosno ekspresije NOS3 gena (141). Oliveira-Paula i sar. ukazuju da analiza NOS3 haplotipova često pruža potpuniji uvid u funkcionalne i kliničke efekte nego analiza pojedinačnih polimorfizama (98). U studiji Metzger i sar. haplotip C-4b-Glu bio je povezan sa nižim koncentracijama nitrita u plazmi, što dodatno ukazuje da se kombinacije varijanti mogu odraziti na pokazatelje metabolizma azot monoksida (142). Sa kliničke strane, Özkan i sar. su u studiji sprovedenoj u turskoj populaciji pokazali da se raspodela NOS3 haplotipova razlikuje između pacijenata sa sepsom i zdravih kontrola, pri čemu je haplotip 4bGC bio učestaliji, a haplotip 4bTT ređi u grupi sa sepsom, dok za preostale haplotipove nije potvrđena razlika u učestalosti (139). Ipak, treba imati u vidu da se učestalost i struktura haplotipova razlikuju između populacija, kao i da različite studije analiziraju različite ishode, od podložnosti za sepsu do ARDS-a, MODS/MOF i mortaliteta, što doprinosi neujednačenosti nalaza. Zbog toga rezultat haplotipa u našoj kohorti tumačimo kao dopunu glavnom nalazu za NOS3 c.-786T>C u kontekstu multiorganskih komplikacija, a ne kao nalaz nezavisan od kliničkog okvira. Istovremeno, pri tumačenju haplotipskih nalaza potrebno je zadržati oprez, jer kada jedna varijanta već pokazuje udruženost kao pojedinačna, deo uočenog efekta na nivou haplotipa može odražavati upravo njen doprinos, dok kombinacija alela može dodatno modifikovati intenzitet ili uslove ispoljavanja tog efekta.

Kada se posmatra intronska VNTR varijanta NOS3 gena (4a/4b), u našoj kohorti nije uočena statistički značajna povezanost sa pojavom sepse niti sa glavnim sistemskim komplikacijama (ARDS, MODS, MOF), a izostala je i povezanost sa intrahospitalnim mortalitetom.

Reč je o polimorfizmu zasnovanom na različitom broju ponavljanja kratkog DNK segmenta od 27 bp u intronu 4, pa se razlikuju alel 4a (kraći, sa manjim brojem ponovaka) i alel 4b (duži, sa većim brojem ponovaka) (143). Iako se intron 4 VNTR razmatra kao potencijalno relevantan marker koji se dovodi u vezu sa stvaranjem NO u endotelu, funkcionalni mehanizmi nisu u potpunosti razjašnjeni (98). U laboratorijskim uslovima je predloženo da VNTR u intronu 4 može uticati na ekspresiju NOS3 preko posttranskripcionih mehanizama, pri čemu se kraći 4a alel u pojedinim eksperimentalnim modelima dovodi u vezu sa promenama u ekspresiji eNOS i posredno nižom bioraspoloživošću NO (98). Ovakav mehanizam je ispitivan u modelima humanih endotelnih ćelija, uključujući endotelne ćelije humane umbilikalne vene (engl. *Human Umbilical Vein Endothelial Cells*, HUVEC) i humane aortne endotelne ćelije (engl. *Human Aortic Endothelial Cells*, HAEC), gde je pokazano da je VNTR region u intronu 4 povezan sa generisanjem 27-nukleotidne male intronske RNK (engl. *27-nucleotide short intronic repeat RNA*, 27nt sir-RNA), koja učestvuje u regulaciji ekspresije NOS3 gena (144). U dodatnim eksperimentalnim analizama opisano je da ovakva regulacija može biti povezana i sa promenama histonske acetilacije i DNK metilacije u regionima relevantnim za transkripciju NOS3 gena (145). U kliničkom kontekstu, pojedine asocijacije ovog polimorfizma opisane su i u infekcijama koje se razlikuju od sekundarnog peritonitisa,

poput osteomijelitisa, gde je prijavljena povezanost sa podložnošću toj infekciji (146). U sekundarnom peritonitisu, tok bolesti u velikoj meri oblikuju klinički faktori, kao što su pravovremenost i uspešnost hirurške sanacije izvora infekcije, početna težina bolesti i komorbiditeti, što može umanjiti vidljivost relativno manjeg doprinosa pojedinačnih genskih varijanti u ukupnoj kohorti. U tom smislu, odsustvo povezanosti u našim rezultatima može ukazivati da eventualni efekat ove varijante, ukoliko postoji, nije dovoljno izražen na nivou analiziranih ishoda.

Slično tome, za *NOS3* c.894G>T (Glu298Asp) u našoj studiji nije uočena značajna povezanost ni sa analiziranim komplikacijama ni sa intrahospitalnim mortalitetom. Ova varijanta se nalazi u kodirajućem delu gena, u egzonu 7, i dovodi do zamene aminokiseline glutaminske kiseline (Glu) asparaginskom kiselinom (Asp) na poziciji 298 (147). Njen potencijalni funkcionalni značaj u literaturi se najčešće razmatra kroz moguće promene stabilnosti eNOS proteina i raspoloživosti NO u endotelu, ali podaci o kliničkom značaju ove varijante nisu dosledni (98).

U ranijim istraživanjima zabeleženi su neujednačeni nalazi u okviru sepse i bakterijemije. U kohorti bolesnika sa teškom sepsom nosioci c.894G>T (posebno GT genotipa) imali su izraženiju organsku disfunkciju i višu stopu mortaliteta (138), dok u drugoj studiji septičnih pacijenata nisu potvrđene dosledne asocijacije ovog polimorfizma sa težinom bolesti i ishodom (137). Dodatno, u studiji bakterijemije uzrokovane *E. coli* ista varijanta dovođena je u vezu sa većom sklonošću ka hipotenziji kod nosilaca T alela (tj. GT i TT genotipova), dok takva povezanost nije potvrđena kod bakterijemije izazvane Gram-pozitivnim uzročnicima (147). Ovakva neujednačenost može proisteći iz razlika u populaciji i uzročnicima, dizajnu studije, ali i iz činjenice da c.894G>T može biti relevantniji za određene, uže definisane kliničke manifestacije kao što je hemodinamska nestabilnost, nego za složene ishode poput MODS i MOF. U okviru sekundarnog peritonitisa, gde je klinički tok snažno određen hirurškim faktorima i pravovremenošću sanacije izvora infekcije, naš nalaz ide u prilog tome da c.894G>T sama po sebi verovatno nije glavni faktor rizika za razvoj teških komplikacija. Izostanak asocijacije u našoj kohorti ne isključuje mali ili selektivan genetički doprinos, ali ukazuje da se on ne ispoljava dosledno na nivou glavnih komplikacija koje smo analizirali.

U okviru RAAS signalnog puta, ACE I/D polimorfizam (rs4646994, rs1799752) razmatran je kao potencijalni faktor u teškim infekcijama. U sepsi i septičkom šoku, kao i u ARDS-u kao komplikaciji teških infekcija, razmatra se poremećen odgovor RAAS, uključujući promene u raspoloživosti i efektima angiotenzina II, što može imati posledice po vaskularni tonus, permeabilnost i hemodinamsku stabilnost (148,149).

Međutim, rezultati kliničkih studija nisu ujednačeni. U kohorti bolesnika sa teškom sepsom nije potvrđena udruženost ACE I/D sa razvojem teških komplikacija (uključujući sepsom-indukovani ARDS), kao ni sa mortalitetom (103), dok su podaci iz meta-analize ukazali da ACE I/D može biti povezan sa podložnošću za sepsu, ali bez jasne veze sa mortalitetom (79). Pored sepse kao kliničkog okvira, ACE I/D je razmatran i u studijama ARDS-a, pri čemu je u meta-analizi više studija opisano da je D alel povezan sa većim rizikom od smrtnog ishoda kod pacijenata sa ARDS-om (75).

U našoj kohorti, ACE I/D nije pokazao statistički značajnu povezanost sa analiziranim teškim komplikacijama niti sa intrahospitalnim mortalitetom ($p>0,05$). Pri interpretaciji rezultata

važno je naglasiti i da je ACE I/D varijanta po svojoj prirodi insercija/delecija (I/D) Alu sekvence u intronu 16, pa se razlikuje od uobičajenih SNP varijanti (100). Zbog razlika u načinu beleženja i prikazivanja ovakvih varijanti u različitim izvorima, u javno dostupnim referentnim bazama (npr. NCBI/dbSNP) za ovaj polimorfizam često izostaju populacioni podaci o frekvencijama alela, što otežava direktno poređenje učestalosti između studija (150). U našoj populaciji je uočeno odstupanje od HWE u smislu manjka heterozigota, zbog čega nalaz treba tumačiti uz oprez i sagledati ga u kontekstu varijabilnih rezultata u prethodnim istraživanjima.

U celini posmatrano, u našoj kohorti se kao najupečatljiviji izdvaja nalaz za *NOS3* c.-786T>C, gde je TT genotip bio povezan sa razvojem MODS i MOF i zadržao značaj nakon multivarijantnog prilagođavanja, dok za ostale analizirane polimorfizme nije potvrđena stabilna povezanost sa ishodom. Nalazi haplotipske analize, uz dominantan T4bG obrazac i njegovu veću učestalost kod sepse i multiorganskih komplikacija, mogu se posmatrati kao dopuna ovom rezultatu, uz napomenu da haplotipovi opisuju kombinacije alela u okviru jednog lokusa, čija se raspodela može razlikovati među populacijama i u različitim kliničkim okvirima.

Izostanak značajne povezanosti za *NOS2* rs2297518 u odnosu na većinu ishoda, kao i za *NOS3* VNTR (4a/4b) i c.894G>T, može upućivati na to da se potencijalni efekti pojedinačnih varijanti u sekundarnom peritonitisu ispoljavaju u zavisnosti od definicije ishoda, trenutka procene tokom toka bolesti i intenziteta sistemskog inflamatornog odgovora. Zbog toga poređenje između studija zahteva pažnju prema dizajnu i kliničkom okviru (podložnost za sepsu naspram toka bolesti kod već obolelih), kao i prema definiciji i vremenu procene ishoda, jer uočena povezanost može biti prisutna u jednom, a izostati u drugom kontekstu. Kod pojedinih varijanti, kao što je *NOS2* rs2297518, uočena univarijantna veza sa ARDS nije potvrđena nakon multivarijantnog prilagođavanja, što može odražavati ulogu kliničkih determinanti (npr. težina inicijalnog stanja, komorbiditeti, potreba za vazopresorima ili mehaničkom ventilacijom) kao i ograničenu učestalost ARDS u uzorku.

Pri interpretaciji rezultata potrebno je imati u vidu i heterogenost sekundarnog peritonitisa kao sindroma, jer etiologija i lokalizacija izvora infekcije, vreme do hirurške sanacije, adekvatnost antimikrobne terapije i rano zbrinjavanje u jedinici intenzivnog lečenja mogu značajno uticati na rizik od sepse i organske disfunkcije. U tom smislu, ispitivani polimorfizmi se mogu posmatrati kao potencijalni modifikatori rizika unutar složenog kliničkog okvira, a ne kao determinante ishoda.

Ograničenja studije uključuju veličinu uzorka i relativno mali broj pojedinačnih ishoda, što može umanjiti snagu za detekciju umerenih genetičkih efekata i uticati na stabilnost multivarijantnih modela, posebno kada se istovremeno uključuje veći broj kliničkih kovarijata. Dodatno, odstupanje ACE I/D od HWE u smislu manjka heterozigota, kao i same karakteristike insercija/delecija varijante, zahtevaju oprez u tumačenju i mogu otežati direktno poređenje sa studijama koje su koristile drugačije uzorkovanje ili pristupe genotipizaciji.

Primarno ograničenje predstavlja izostanak funkcionalne potvrde uočenih genskih asocijacija. Iako se nalazi mogu razmatrati u okviru promena endotelne reaktivnosti, NO signalizacije i inflamatorno posredovane disfunkcije mikrocirkulacije, bez direktnih merenja

ovakva tumačenja ostaju na nivou pretpostavke. U tom smislu, dodatnu vrednost bi imala merenja nitrita i nitrata kao posrednih pokazatelja bioraspoloživosti NO, procena aktivnosti ili ekspresije eNOS i iNOS, kao i određivanje markera endotelne aktivacije i oštećenja, kao i komponenti RAAS signalnog puta.

Takođe, analiza haplotipova je sprovedena unutar *NOS3*, dok kombinacije varijanti između različitih gena uključenih u regulaciju vaskularnog tonusa i inflamatornog odgovora nisu ispitivane (npr. istovremeni efekat varijanti u *NOS3*, *NOS2* i *ACE*), što bi u budućim studijama moglo doprineti potpunijem sagledavanju doprinosa ovih puteva ishodima. Kako je studija sprovedena u jednom centru, nalazi mogu odražavati specifičnosti populacije i kliničke prakse u našem centru, zbog čega je njihova potvrda u većim, nezavisnim i multicentričnim kohortama posebno važna.

Uprkos navedenim ograničenjima, uočena povezanost *NOS3* c.-786T>C sa MODS i MOF u kombinaciji sa rezultatima analize haplotipova može predstavljati osnovu za dalja istraživanja u većim kohortama, uz standardizovane definicije ishoda i povezivanje genetičkih podataka sa funkcionalnim analizama, kao i sa podacima dobijenim u transkriptomskim i proteomskim ispitivanjima, uz razmatranje interakcija genskih varijanti sa kliničkim i mikrobiološkim faktorima.

U celini, naši rezultati ukazuju da interindividualna varijabilnost u regulaciji endotelne funkcije i NO signalizacije može doprineti tome da se rizik od multiorganskih komplikacija razlikuje među bolesnicima sa sekundarnim peritonitisom, uz potrebu za potvrdom u većim kohortama i dodatnim razjašnjavanjem mehanizama koji povezuju naše ispitivane varijante sa endotelnom disfunkcijom i poremećajem mikrocirkulacije u uslovima sistemske inflamacije.

6. ZAKLJUČCI

U skladu sa postavljenim ciljevima studije, a na osnovu dobijenih rezultata, možemo doneti sledeće zaključke:

1. Učestalosti genotipova i alela polimorfizama *NOS2* (rs2297518) i *NOS3* (rs61722009, rs1799983, rs2070744) kod pacijenta sa sekundarnim peritonitisom su u HWE i u saglasnosti sa prijavljenim učestalostima za druge evropske populacije. Izuzetak je predstavljao *ACE* I/D (rs4646994), za koji je u našoj populaciji uočeno odstupanje od HWE, dok u referentnim bazama izostaju populacioni podaci o frekvencijama alela.
2. Analizom povezanosti ispitivanih polimorfnih genskih varijanti sa razvojem teških komplikacija kod hirurških pacijenata sa sekundarnim peritonitisom, utvrđeno je da:
 - 2.2. *NOS2* c.1823C>T (rs2297518) u univariјantnoj analizi pokazao je statistički značajnu povezanost sa pojavom ARDS (genotip GG češći u grupi sa ARDS; $p=0,046$) i sa pojavom MODS (genotip GG češći u grupi sa MODS; $p=0,009$); međutim, navedene asocijacije nisu potvrđene u multivariјantnom modelu nakon prilagođavanja za pol, uzrast, izvor peritonitisa i APACHE II (ARDS: $p=0,211$; MODS: $p=0,123$). Za ostale analizirane teške komplikacije nije utvrđena statistički značajna povezanost ($p>0,05$).
 - 2.3. *NOS3* c.-786T>C (rs2070744) ima najizraženiju i najkonzistentniju povezanost sa multiorganskim komplikacijama. U univariјantnoj analizi TT genotip je bio povezan sa većom učestalošću MODS i MOF, a u multivariјantnom modelu TT genotip je ostao nezavisan prediktor MODS ($p=0,047$; OR=3,67; 95% CI 1,02–13,19) i MOF ($p=0,006$; OR=4,86; 95% CI 1,56–15,13), pri čemu je nakon FDR korekcije zadržana statistička značajnost za MOF.
 - 2.4. *NOS3* VNTR 4a/4b (rs61722009) nije pokazao statistički značajnu povezanost sa razvojem teških komplikacija (ARDS, MODS, MOF, sepsom) u okviru analiziranih genotipskih modela ($p>0,05$).
 - 2.5. *NOS3* c.894G>T (rs1799983) nije pokazao statistički značajnu povezanost sa razvojem teških komplikacija (ARDS, MODS, MOF, sepsom) u okviru analiziranih genotipskih modela ($p>0,05$).
 - 2.6. *ACE* I/D (rs4646994) nije pokazao statistički značajnu povezanost sa razvojem teških komplikacija (ARDS, MODS, MOF, sepsom) u okviru analiziranih genotipskih modela ($p>0,05$).
 - 2.7. Haplotipovi *NOS3* gena (rs2070744/rs61722009/rs1799983) pokazali su statistički značajnu povezanost sa teškim komplikacijama: haplotip T4bG bio je značajno češći kod pacijenata sa MODS (0,64 vs 0,48; $p=0,026$), MOF (0,61

vs 0,48; $p=0,048$) i sepsom (0,70 vs 0,49; $p=0,018$), u odnosu na pacijente koji nisu imali navedene komplikacije, dok ostali identifikovani haplotipovi nisu pokazali statistički značajne asocijacije ($p>0,05$).

3. Analizom povezanosti ispitivanih polimorfnih genskih varijanti sa ishodom kod hirurških pacijenata sa sekundarnim peritonitisom, utvrđeno je da:

- 3.1. U odnosu na intrahospitalni mortalitet, nije uočena statistički značajna asocijacija ni za jedan od pojedinačno analiziranih polimorfizama (*NOS2* rs2297518; *NOS3* rs61722009, rs1799983, rs2070744; *ACE* rs4646994), niti za analizirane haplotipove *NOS3* gena (rs2070744/rs61722009/rs1799983) ($p>0,05$).

7. LITERATURA

1. Nguyen TC, Torres M. Peritonitis. In: Emergency Management of Infectious Diseases. Cambridge University Press; 2018. p. 162–8.
2. Ross JT, Matthay MA, Harris HW. Secondary peritonitis: Principles of diagnosis and intervention. *BMJ*. 2018;361.
3. Akcakaya A. Peritonitis-an Overview. *Bezmialem Sci*. 2023;11(3):242–6.
4. Ross JT, Matthay MA, Harris HW. Secondary peritonitis: principles of diagnosis and intervention. *BMJ*. 2018 Jun 18;361(SUPPL. 5):k1407.
5. Sartelli M, Coccolini F, Kluger Y, Agastra E, Abu-Zidan FM, Abbas AES, et al. WSES/GAIS/SIS-E/WSIS/AAST global clinical pathways for patients with intra-abdominal infections. *World J Emerg Surg*. 2021;16(1):1–48.
6. Bass GA, Dzierba AL, Taylor B, Lane-Fall M, Kaplan LJ. Tertiary peritonitis: considerations for complex team-based care. *Eur J Trauma Emerg Surg*. 2022;48(2):811–25.
7. Diaconescu B, Uranues S, Fingerhut A, Vartic M, Zago M, Kurihara H, et al. The Bucharest ESTES consensus statement on peritonitis. *Eur J Trauma Emerg Surg*. 2020;46(5):1005–23.
8. Long B, Gottlieb M. Emergency medicine updates: Spontaneous bacterial peritonitis. *Am J Emerg Med*. 2023;70:84–9.
9. Szeto CC, Li PKT. Peritoneal dialysis-associated peritonitis. *Clin J Am Soc Nephrol*. 2019;14(7):1100–5.
10. Nathens AB, Rotstein OD, Marshall JC. Tertiary peritonitis: Clinical features of a complex nosocomial infection. *World J Surg*. 1998;22(2):158–63.
11. Doklešić SK, Bajec DD, Djukić R V., Bumbaširević V, Detanac AD, Detanac SD, et al. Secondary peritonitis - evaluation of 204 cases and literature review. *J Med Life*. 2014;7(2):132–8.
12. Seguin P, Laviolle B, Chanavaz C, Donnio PY, Gautier-Lerestif AL, Campion JP, et al. Factors associated with multidrug-resistant bacteria in secondary peritonitis: Impact on antibiotic therapy. *Clin Microbiol Infect*. 2006;12(10):980–5.
13. Clements TW, Tolonen M, Ball CG, Kirkpatrick AW. Secondary Peritonitis and Intra-Abdominal Sepsis: An Increasingly Global Disease in Search of Better Systemic Therapies. *Scand J Surg*. 2021;110(2):139–49.
14. Hecker A, Uhle F, Schwandner T, Padberg W, Weigand MA. Diagnostics, therapy and outcome prediction in abdominal sepsis: Current standards and future perspectives. *Langenbeck's Arch Surg*. 2014;399(1):11–22.
15. Mačiulienė A, Maleckas A, Kriščiukaitis A, Mačiulis V, Vencius J, Macas A. Predictors of 30-day in-hospital mortality in patients undergoing urgent abdominal surgery due to acute peritonitis complicated with sepsis. *Med Sci Monit*. 2019;25:6331–40.
16. Hynninen M, Wennervirta J, Leppäniemi A, Pettilä V. Organ dysfunction and long term outcome in secondary peritonitis. *Langenbeck's Arch Surg*. 2008;393(1):81–6.
17. Salamone G. Mannheim Peritonitis Index (MPI) and elderly population: prognostic evaluation in acute secondary peritonitis. *G di Chir - J Surg*. 2016;27(6):243.
18. Doklešić K, Maksimović N, Jovanović B, Velicković J, Bumbaširević V. Gene polymorphisms in surgical patients with diffuse secondary peritonitis - genetic predisposition for sepsis. *Acta Chir Iugosl*. 2016;63(2):35–40.

19. Pierrakos C, Vincent JL. Sepsis biomarkers: A review. *Crit Care*. 2010;14(1):1–18.
20. Singer M, Deutschman CS, Seymour C, Shankar-Hari M, Annane D, Bauer M, et al. The third international consensus definitions for sepsis and septic shock (sepsis-3). *JAMA - J Am Med Assoc*. 2016;315(8):801–10.
21. Matthay MA, Zemans RL, Zimmerman GA, Arabi YM, Beitler JR, Mercat A, et al. Acute respiratory distress syndrome. *Nat Rev Dis Prim*. 2019;5(1):18.
22. Poston JT, Koyner JL. Sepsis associated acute kidney injury. *BMJ*. 2019;364:1–17.
23. Woznica EA, Inglot M, Woznica RK, Lysenko L. Liver dysfunction in sepsis. *Adv Clin Exp Med*. 2018;27(4):547–51.
24. Iba T, Levy JH, Warkentin TE, Thachil J, van der Poll T, Levi M. Diagnosis and management of sepsis-induced coagulopathy and disseminated intravascular coagulation. *J Thromb Haemost*. 2019;17(11):1989–94.
25. Sartelli M, Chichom-Mefire A, Labricciosa FM, Hardcastle T, Abu-Zidan FM, Adesunkanmi AK, et al. The management of intra-abdominal infections from a global perspective: 2017 WSES guidelines for management of intra-abdominal infections. *World J Emerg Surg*. 2017;12(1):29.
26. Friedrich AKU, Cahan M. Intraabdominal infections in the intensive care unit. *J Intensive Care Med*. 2014;29(5):247–54.
27. Hecker A, Reichert M, Reuß CJ, Schmoch T, Riedel JG, Schneck E, et al. Intra-abdominal sepsis: new definitions and current clinical standards. *Langenbeck's Arch Surg*. 2019;404(3):257–71.
28. Scerbo MH, Kaplan HB, Dua A, Litwin DB, Ambrose CG, Moore LJ, et al. Beyond Blood Culture and Gram Stain Analysis: A Review of Molecular Techniques for the Early Detection of Bacteremia in Surgical Patients. *Surg Infect (Larchmt)*. 2016;17(3):294–302.
29. Martin-Loeches I, Timsit JF, Leone M, de Waele J, Sartelli M, Kerrigan S, et al. Clinical controversies in abdominal sepsis. Insights for critical care settings. *J Crit Care*. 2019;53:53–8.
30. Kim WY, Hong SB. Sepsis and acute respiratory distress syndrome: Recent update. *Tuberc Respir Dis (Seoul)*. 2016;79(2):53–7.
31. Raia L, Zafrani L. Endothelial Activation and Microcirculatory Disorders in Sepsis. *Front Med*. 2022;9:907992.
32. Evans L, Rhodes A, Alhazzani W, Antonelli M, Coopersmith CM, French C, et al. Surviving sepsis campaign: international guidelines for management of sepsis and septic shock 2021. *Intensive Care Med*. 2021;47(11):1181–247.
33. Singer P, Blaser AR, Berger MM, Alhazzani W, Calder PC, Casaer MP, et al. ESPEN guideline on clinical nutrition in the intensive care unit. *Clin Nutr*. 2019;38(1):48–79.
34. Luţenco V, Beznea A, Mihailov R, Țocu G, Luţenco V, Mihailov OM, et al. Literature Review of Prognostic Factors in Secondary Generalized Peritonitis. *Life*. 2025;15(6):880.
35. Leppäniemi A, Kimball EJ, De Laet I, Malbrain MLNG, Balogh ZJ, De Waele JJ. Management of abdominal sepsis-a paradigm shift? *Anaesthesiol Intensive Ther*. 2015;47(4):400–8.
36. De Waele J, Lipman J, Sakr Y, Marshall JC, Vanhems P, Barrera Groba C, et al. Abdominal infections in the intensive care unit: characteristics, treatment and determinants of outcome. *BMC Infect Dis*. 2014;14(1):420.

37. GBD 2021 Global Sepsis Collaborators. Global, regional, and national sepsis incidence and mortality, 1990-2021: a systematic analysis. *Lancet Glob Heal*. 2025 Dec;13(12):e2013–26.
38. Global report on the epidemiology and burden of sepsis: current evidence, identifying gaps and future directions. Geneva: World Health Organization. 2020.
39. La Via L, Sangiorgio G, Stefani S, Marino A, Nunnari G, Cocuzza S, et al. The Global Burden of Sepsis and Septic Shock. *Epidemiologia*. 2024;5(3):456–78.
40. Ince C, Mayeux PR, Nguyen T, Gomez H, Kellum JA, Ospina-Tascón GA, et al. The endothelium in sepsis. *Shock*. 2016;45(3):259–70.
41. Ranieri VM, Rubenfeld GD, Thompson BT, Ferguson ND, Caldwell E, Fan E, et al. Acute respiratory distress syndrome: The Berlin definition. *Jama*. 2012;307(23):2526–33.
42. Bos LDJ, Ware LB. Acute respiratory distress syndrome: causes, pathophysiology, and phenotypes. *Lancet*. 2022;400(10358):1145–56.
43. Ziaka M, Exadaktylos A. Acute Respiratory Distress Syndrome: Pathophysiological Insights, Subphenotypes, and Clinical Implications-A Comprehensive Review. *J Clin Med*. 2025 Jul 22;14(15):5184.
44. Vassiliou AG, Kotanidou A, Dimopoulou I, Orfanos SE. Endothelial damage in acute respiratory distress syndrome. *Int J Mol Sci*. 2020;21(22):8793.
45. Cusack R, Bos LD, Pova P, Martin-Loeches I. Endothelial dysfunction triggers acute respiratory distress syndrome in patients with sepsis: a narrative review. *Front Med*. 2023;10:1203827.
46. Bardají-Carrillo M, Martín-Fernández M, López-Herrero R, Priede-Vimbela JM, Heredia-Rodríguez M, Gómez-Sánchez E, et al. Post-operative sepsis-induced acute respiratory distress syndrome: risk factors for a life-threatening complication. *Front Med*. 2024;11:1338542.
47. Uchino S, Kellum JA, Bellomo R, Doig GS, Morimatsu H, Morgera S, et al. Acute renal failure in critically ill patients: a multinational, multicenter study. *JAMA*. 2005;294(7):813–8.
48. Peerapornratana S, Manrique-Caballero CL, Gómez H, Kellum JA. Acute kidney injury from sepsis: current concepts, epidemiology, pathophysiology, prevention and treatment. *Kidney Int*. 2019;96(5):1083–99.
49. Zarbock A, Nadim MK, Pickkers P, Gomez H, Bell S, Joannidis M, et al. Sepsis-associated acute kidney injury: consensus report of the 28th Acute Disease Quality Initiative workgroup. *Nat Rev Nephrol*. 2023;19(6):401–17.
50. Strnad P, Tacke F, Koch A, Trautwein C. Liver-guardian, modifier and target of sepsis. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*. 2017;14(1):55–66.
51. Kluge M, Tacke F. Liver impairment in critical illness and sepsis: the dawn of new biomarkers? *Ann Transl Med*. 2019;7(S8):S258–S258.
52. Levi M, ten Cate H. Disseminated Intravascular Coagulation. *N Engl J Med*. 1999 Aug 19;341(8):586–92.
53. Iba T, Connors JM, Nagaoka I, Levy JH. Recent advances in the research and management of sepsis-associated DIC. *Int J Hematol*. 2021;113(1):24–33.
54. Galli E, Maggio E, Pomero F. Venous Thromboembolism in Sepsis: From Bench to Bedside. *Biomedicines*. 2022;10(7):1–20.
55. Wasyluk W, Zwolak A. Metabolic alterations in sepsis. *J Clin Med*. 2021;10(11):1–18.
56. Lee JW. Fluid and electrolyte disturbances in critically ill patients. *Electrolyte Blood*

- Press. 2010;8(2):72–81.
57. Gribovskaja-Rupp I, Melton GB. Enterocutaneous Fistula: Proven Strategies and Updates. *Clin Colon Rectal Surg.* 2016;29(2):130–7.
 58. Venara A, Neunlist M, Slim K, Barbieux J, Colas PA, Hamy A, et al. Postoperative ileus: Pathophysiology, incidence, and prevention. *J Visc Surg.* 2016;153(6):439–46.
 59. Montravers P, Martin-Loeches I. Source control and intra-abdominal infections: Still many questions and only limited answers. *J Crit Care.* 2019 Aug 1;52:265–6.
 60. Montanarella M, Gonzalez Baerga CI, Menendez Santos MJ, Elsherif S, Boldig K, Kumar S, et al. Retroperitoneal anatomy with the aid of pathologic fluid: An imaging pictorial review. *J Clin Imaging Sci.* 2023;13(1):1–9.
 61. Taha M, Abouelsadat MK, Elfakharany M, Ibrahim A, Abufouda AM, Barai N, et al. Postoperative Intra-abdominal Abscess Following General Surgery: A Systematic Review of Risk Factors, Prevention, and the Role of Laparotomy. *Cureus.* 2025;17(8).
 62. Ellis CT, Maykel JA. Defining Anastomotic Leak and the Clinical Relevance of Leaks. *Clin Colon Rectal Surg.* 2021;34(6):359–65.
 63. Hedrick TL, Kane W. Management of Acute Anastomotic Leaks. *Clin Colon Rectal Surg.* 2021;34(6):400–5.
 64. Alverdy JC, Schardey HM. Anastomotic Leak: Toward an Understanding of Its Root Causes. *J Gastrointest Surg.* 2021;25(11):2966–75.
 65. Dumas RP, Moore SA, Sims CA. Clinics in Surgery Enterocutaneous Fistula : Evidence-based Management. *Clin Surg.* 2017;2:1–5.
 66. Vather R, Trivedi S, Bissett I. Defining Postoperative Ileus: Results of a Systematic Review and Global Survey. *J Gastrointest Surg.* 2013;17(5):962–72.
 67. Cyr AR, Huckaby L V., Shiva SS, Zuckerbraun BS. Nitric Oxide and Endothelial Dysfunction. *Crit Care Clin.* 2020;36(2):307–21.
 68. Endemann DH, Schiffrin EL. Endothelial dysfunction. *J Am Soc Nephrol.* 2004;15(8):1983–92.
 69. Agapitov A V., Haynes WG. Role of endothelin in cardiovascular disease. *JRAAS - J Renin-Angiotensin-Aldosterone Syst.* 2002;3(1):1–15.
 70. Singh J, Lee Y, Kellum JA. A new perspective on NO pathway in sepsis and ADMA lowering as a potential therapeutic approach. *Crit Care.* 2022;26(1):1–8.
 71. Vieira NF, Barbosa TP, Cárnio EC. Performance of nitric oxide in sepsis: a scoping review. *ACTA Paul Enferm.* 2024;37:1–7.
 72. Fernandes D, Assreuy J. Nitric oxide and vascular reactivity in sepsis. *Shock.* 2008;30(7):10–3.
 73. Förstermann U, Sessa WC. Nitric oxide synthases: Regulation and function. *Eur Heart J.* 2012;33(7):829–37.
 74. Spiller F, Oliveira Formiga R, Fernandes da Silva Coimbra J, Alves-Filho JC, Cunha TM, Cunha FQ. Targeting nitric oxide as a key modulator of sepsis, arthritis and pain. *Nitric Oxide - Biol Chem.* 2019;89:32–40.
 75. Tsantes A, Tsangaris I, Kopterides P, Nikolopoulos G, Kalamara E, Antonakos G, et al. Angiotensin converting enzyme (ACE) insertion/deletion (I/D) polymorphism and circulating ACE levels are not associated with outcome in critically ill septic patients. *Clin Chem Lab Med.* 2012;50(2):293–9.
 76. Bernstein KE, Ong FS, Blackwell WLB, Shah KH, Giani JF, Gonzalez-Villalobos RA, et al. A modern understanding of the traditional and nontraditional biological functions of

- angiotensin-converting enzyme. *Pharmacol Rev.* 2013;65(1):1–46.
77. Leligdowicz A, Richard-Greenblatt M, Wright J, Crowley VM, Kain KC. Endothelial Activation: The Ang/Tie Axis in Sepsis. *Front Immunol.* 2018;9:838.
 78. Tang F, Zhao XL, Xu LY, Zhang JN, Ao H, Peng C. Endothelial dysfunction: Pathophysiology and therapeutic targets for sepsis-induced multiple organ dysfunction syndrome. *Biomed Pharmacother.* 2024;178:117180.
 79. Hou X, Zhang P, Nie W, Tang S, Wang J, Zhang Q, et al. Association between angiotensin-converting enzyme I/D polymorphism and sepsis: A meta-analysis. *JRAAS - J Renin-Angiotensin-Aldosterone Syst.* 2015;16(2):415–21.
 80. Wang Z, Feng K, Yue M, Lu X, Zheng Q, Zhang H, et al. A non-synonymous SNP in the NOS2 associated with septic shock in patients with sepsis in Chinese populations. *Hum Genet.* 2013;132(3):337–46.
 81. Martin G, Asensi V, Montes AH, Collazos J, Alvarez V, Pérez-Is L, et al. Endothelial (NOS3 E298D) and inducible (NOS2 exon 22) nitric oxide synthase polymorphisms, as well as plasma NOx, influence sepsis development. *Nitric Oxide - Biol Chem.* 2014;42:79–86.
 82. Font MD, Thyagarajan B, Khanna AK. Sepsis and Septic Shock – Basics of diagnosis, pathophysiology and clinical decision making. *Med Clin North Am.* 2020;104(4):573–85.
 83. Giamarellos-Bourboulis EJ, Aschenbrenner AC, Bauer M, Bock C, Calandra T, Gat-Viks I, et al. The pathophysiology of sepsis and precision-medicine-based immunotherapy. *Nat Immunol.* 2024;25(1):19–28.
 84. Papathanassoglou EDE, Giannakopoulou MD, Bozas E. Genomic variations and susceptibility to sepsis. *AACN Adv Crit Care.* 2006;17(4):394–422.
 85. Namath A, Patterson AJ. Genetic Polymorphisms in Sepsis. *Crit Care Nurs Clin North Am.* 2011;23(1):181–202.
 86. Paludo FJ de O, Picanço JB, Fallavena PRV, Fraga L da R, Graebin P, Nóbrega O de T, et al. Higher frequency of septic shock in septic patients with the 47C allele (rs4880) of the SOD2 gene. *Gene.* 2013;517(1):106–11.
 87. Majolo F, Oliveira Paludo FJ de, Ponzoni A, Graebin P, Dias FS, Alho CS. Effect of 593C>T GPx1 SNP alone and in synergy with 47C>T SOD2 SNP on the outcome of critically ill patients. *Cytokine.* 2015;71(2):312–7.
 88. Bresciani G, da Cruz IBM, González-Gallego J. Manganese superoxide dismutase and oxidative stress modulation. *Adv Clin Chem.* 2015;68:87–130.
 89. Alberts B, Johnson A, Lewis J, Morgan D, Raff M, Keith R, et al. *Molecular Biology of The Cell.* 6th ed. New York: Garland Science. 2015.
 90. Karki R, Pandya D, Elston RC, Ferlini C. Defining “mutation” and “polymorphism” in the era of personal genomics. *BMC Med Genomics.* 2015;8(1):1–7.
 91. Syvänen A. Accessing genetic variation: genotyping single nucleotide polymorphisms. *Nat Rev Genet.* 2001;2(12):930–42.
 92. Srinivasan S, Clements JA, Batra J. Single nucleotide polymorphisms in clinics: Fantasy or reality for cancer? *Crit Rev Clin Lab Sci.* 2016;53(1):29–39.
 93. Novakovic I, Bunjevacki V, Cvjeticanin S, Stojkovic O, Ristanovic M, Damnjanovic T, et al. *Humana genetika.* Novakovic I, Jekić B, editors. Beograd: Medicinski fakultet Univerziteta u Beogradu, CIBID; 2024.
 94. Qidwai T, Jamal F. Inducible nitric oxide synthase (iNOS) gene polymorphism and

- disease prevalence. *Scand J Immunol.* 2010;72(5):375–87.
95. Martín MC, Martinez A, Mendoza JL, Taxonera C, Díaz-Rubio M, Fernández-Arquero M, et al. Influence of the inducible nitric oxide synthase gene (NOS2A) on inflammatory bowel disease susceptibility. *Immunogenetics.* 2007;59(11):833–7.
 96. Dhangadamajhi G, Mohapatra BN, Kar SK, Ranjit MR. The CCTTT pentanucleotide microsatellite in iNOS promoter influences the clinical outcome in *P. falciparum* infection. *Parasitol Res.* 2009;104(6):1315–20.
 97. Dhillon SS, Mastropaolo LA, Murchie R, Griffiths C, Thöni C, Elkadri A, et al. Higher activity of the inducible nitric oxide synthase contributes to very early onset inflammatory bowel disease. *Clin Transl Gastroenterol.* 2014;5(1):e46.
 98. Oliveira-Paula GH, Lacchini R, Tanus-Santos JE. Endothelial nitric oxide synthase: From biochemistry and gene structure to clinical implications of NOS3 polymorphisms. *Gene.* 2016;575(2):584–99.
 99. Melake A, Brhanie N. Angiotensin-converting enzyme gene insertion/deletion polymorphism and risk of ischemic stroke complication among patients with hypertension in the Ethiopian population. *Front Neurol.* 2023;14:1093993.
 100. Prasad A, Narayanan S, Husain S, Padder F, Waclawiw M, Epstein N, et al. Insertion-Deletion Polymorphism of the ACE Gene Modulates Reversibility of Endothelial Dysfunction With ACE Inhibition. *Circulation.* 2000;102(1):35–41.
 101. Rigat B, Hubert C, Alhenc-Gelas F, Cambien F, Corvol P, Soubrier F. An insertion/deletion polymorphism in the angiotensin I-converting enzyme gene accounting for half the variance of serum enzyme levels. *J Clin Invest.* 1990;86(4):1343–6.
 102. Biller H, Zissel G, Rupprecht B, Nauck M, Busse Grawitz A, Müller-Quernheim J. Genotype-corrected reference values for serum angiotensin-converting enzyme. *Eur Respir J.* 2006;28(6):1085–90.
 103. Villar J, Flores C, Pérez-Méndez L, Maca-Meyer N, Espinosa E, Blanco J, et al. Angiotensin-converting enzyme insertion/deletion polymorphism is not associated with susceptibility and outcome in sepsis and acute respiratory distress syndrome. *Intensive Care Med.* 2008;34(3):488–95.
 104. Koperna T. Risk Stratification in Emergency Surgical Patients. *Arch Surg.* 2001;136(1):55.
 105. Dindo D, Demartines N, Clavien PA. Classification of surgical complications: A new proposal with evaluation in a cohort of 6336 patients and results of a survey. *Ann Surg.* 2004;240(2):205–13.
 106. Bone RC, Balk RA, Cerra FB, Dellinger RP, Fein AM, Knaus WA, et al. Definitions for sepsis and organ failure and guidelines for the use of innovative therapies in sepsis. The ACCP/SCCM Consensus Conference Committee. American College of Chest Physicians/Society of Critical Care Medicine. *Chest.* 1992;101(6):1644–55.
 107. Marshall JC, Cook DJ, Christou N V, Bernard GR, Sprung CL, Sibbald WJ. Multiple organ dysfunction score: a reliable descriptor of a complex clinical outcome. *Crit Care Med.* 1995;23(10):1638–52.
 108. Levy MM, Fink MP, Marshall JC, Abraham E, Angus D, Cook D, et al. 2001 SCCM/ESICM/ACCP/ATS/SIS International Sepsis Definitions Conference. *Intensive Care Med.* 2003;29(4):530–8.
 109. Miller SA, Dykes DD, Polesky HF. A simple salting out procedure for extracting DNA

- from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res.* 1988;16(3):1215.
110. Khehra N, Padda IS ZM. Polymerase Chain Reaction (PCR). In: StatPearls. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2025.
 111. Green MR, Sambrook J. Polymerase chain reaction. *Cold Spring Harb Protoc.* 2019;2019(6):436–56.
 112. Lorenz TC. Polymerase chain reaction: Basic protocol plus troubleshooting and optimization strategies. *J Vis Exp.* 2012;(63):1–15.
 113. Pourzand C, Cerutti P. Genotypic mutation analysis by RFLP/PCR. *Mutat Res - Fundam Mol Mech Mutagen.* 1993;288(1):113–21.
 114. Hashim HO, Al-Shuhaib MBS. Exploring the potential and limitations of PCR-RFLP and PCR-SSCP for SNP detection: A review. *J Appl Biotechnol Reports.* 2019;6(4):137–44.
 115. AppliedBiosystems. Allelic Discrimination Getting Started Guide for 7300/7500/7500 Fast Systems. Lab Protoc. 2010;
 116. Livak KJ. Allelic discrimination using fluorogenic probes and the 5' nuclease assay. *Genet Anal - Biomol Eng.* 1999;14(5–6):143–9.
 117. Applied Biosystems. TaqMan® SNP Genotyping Assays User Guide. ThermoFisher Sci. 2017;1–72.
 118. Carbocation Corporation. False Discovery Rate Online Calculator [Internet]. 2016 [cited 2025 Oct 16]. Available from: <https://tools.carbocation.com/FDR>
 119. Barrett JC, Fry B, Maller J, Daly MJ. Haploview: Analysis and visualization of LD and haplotype maps. *Bioinformatics.* 2005;21(2):263–5.
 120. Sayers EW, Beck J, Bolton EE, Brister JR, Chan J, Comeau DC, et al. Database resources of the National Center for Biotechnology Information. *Nucleic Acids Res.* 2024;52(D1):D33–43.
 121. Van Der Poll T, Van De Veerdonk FL, Scicluna BP, Netea MG. The immunopathology of sepsis and potential therapeutic targets. *Nat Rev Immunol.* 2017;17(7):407–20.
 122. Brugts JJ, Den Uil CA. ACE insertion/deletion polymorphism in sepsis and acute respiratory distress syndrome. *Intensive Care Med.* 2008;34(9):1733.
 123. Deng X, Zhang S, Jin K, Li L, Gu W, Liu M, et al. Angiotensin-converting enzyme I/D polymorphism and acute respiratory distress syndrome. *JRAAS - J Renin-Angiotensin-Aldosterone Syst.* 2015;16(4):780–6.
 124. Villar J, Maca-Meyer N, Pérez-Méndez L, Flores C. Bench-to-bedside review: Understanding genetic predisposition to sepsis. *Crit Care.* 2004;8(3):180–9.
 125. Yende S, Kammerer CM, Angus DC. Bench-to-bedside review: Genetics and proteomics: Deciphering gene association studies in critical illness. *Crit Care.* 2006;10(4):1–7.
 126. Cox EGM, Zhang W, van der Voort PHJ, Lunter G, Keus F, Snieder H. Genetic association studies in critically ill patients: protocol for a systematic review. *Syst Rev.* 2023;12(1):1–5.
 127. Aird WC. The role of the endothelium in severe sepsis and multiple organ dysfunction syndrome. *Blood.* 2003;101(10):3765–77.
 128. Van De Sandt AM, Windler R, Gödecke A, Ohlig J, Zander S, Reinartz M, et al. Endothelial NOS (NOS3) impairs myocardial function in developing sepsis. *Basic Res Cardiol.* 2013;108(2):330.
 129. Wang LF, Patel M, Razavi HM, Weicker S, Joseph MG, McCormack DG, et al. Role of inducible Nitric Oxide Synthase in pulmonary microvascular protein leak in murine sepsis. *Am J Respir Crit Care Med.* 2002;165(12):1634–9.

130. Kristof AS, Goldberg P, Laubach V, Hussain SN. Role of inducible nitric oxide synthase in endotoxin-induced acute lung injury. *Am J Respir Crit Care Med*. 1998;158(6):1883–9.
131. Wang Y, Wang K, Fu J. HDAC6 Mediates Macrophage iNOS Expression and Excessive Nitric Oxide Production in the Blood During Endotoxemia. *Front Immunol*. 2020;11:1893.
132. Brovkovich V, Gao XP, Ong E, Brovkovich S, Brennan ML, Su X, et al. Augmented inducible nitric oxide synthase expression and increased NO production reduce sepsis-induced lung injury and mortality in myeloperoxidase-null mice. *Am J Physiol - Lung Cell Mol Physiol*. 2008;295(1):96–103.
133. Takatani Y, Ono K, Suzuki H, Inaba M, Sawada M, Matsuda N. Inducible nitric oxide synthase during the late phase of sepsis is associated with hypothermia and immune cell migration. *Lab Investig*. 2018;98(5):629–39.
134. Gusti AMT, Qusti SY, Bahijri SM, Toraih EA, Bokhari S, Attallah SM, et al. Glutathione S-Transferase (GSTT1 rs17856199) and Nitric Oxide Synthase (NOS2 rs2297518) Genotype Combination as Potential Oxidative Stress-Related Molecular Markers for Type 2 Diabetes Mellitus. *Diabetes Metab Syndr Obes*. 2021;14:1385–403.
135. Nakayama M, Yasue H, Yoshimura M, Shimasaki Y, Kugiyama K, Ogawa H, et al. T-786->C mutation in the 5'-flanking region of the endothelial nitric oxide synthase gene is associated with coronary spasm. *Circulation*. 1999;99(22):2864–70.
136. Leineweber K, Moosmang S, Paulson D. Genetics of NO Deficiency. *Am J Cardiol*. 2017;120(8):S80–8.
137. Zhu Y, Qiu H, Liu J, Wang Y, Lin H, Xu Y, et al. Effect of endothelial nitric oxide synthase gene polymorphisms upon disease severity and outcome in septic patients. *Zhonghua Yi Xue Za Zhi*. 2010;90(13):906–11.
138. Ma P, Zhu Y, Qiu H, Liu J, Wang Y ZL. Endothelial nitric oxide synthase 894G→T but not -786T→C gene polymorphism is associated with organ dysfunction and increased mortality in patients with severe sepsis. *J Trauma - Inj Infect Crit Care*. 2011;71(4):872–7.
139. Özkan M, Günay N, Sener EF, Karcioğlu Ö, Tahtasakal R, Dal F, et al. Variants in TNF and NOS3 (eNOS) genes associated with sepsis in adult patients. *J Gene Med*. 2021;23(4):1–9.
140. Opal SM, van der Poll T. Endothelial barrier dysfunction in septic shock. *J Intern Med*. 2015;277(3):277–93.
141. Wang J, Dudley D, Wang XL. Haplotype-Specific Effects on Endothelial NO Synthase Promoter Efficiency. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2002;22(5):1–8.
142. Metzger IF, Sertório JTC, Tanus-Santos JE. Modulation of nitric oxide formation by endothelial nitric oxide synthase gene haplotypes. *Free Radic Biol Med*. 2007;43(6):987–92.
143. Tsukada T, Yokoyama K, Arai T, Takemoto F, Hara S, Yamada A, et al. Evidence of association of the eNOS gene polymorphism with plasma NO metabolite levels in humans. *Biochem Biophys Res Commun*. 1998;245(1):190–3.
144. Zhang MX, Zhang C, Shen YH, Wang J, Xiao NL, Zhang Y, et al. Biogenesis of short intronic repeat 27-nucleotide small RNA from endothelial nitric-oxide synthase gene. *J Biol Chem*. 2008;283(21):14685–93.
145. Zhang M-X, Zhang C, Shen YH, Wang J, Li X-N, Chen L, et al. Effect of 27nt small RNA on

- endothelial nitric-oxide synthase expression. *Mol Biol Cell*. 2008;19(9):3997–4005.
146. Asensi V, Montes AH, Valle E, Ocaña MG, Astudillo A, Alvarez V, et al. The NOS3 (27-bp repeat, intron 4) polymorphism is associated with susceptibility to osteomyelitis. *Nitric Oxide - Biol Chem*. 2007;16(1):44–53.
 147. Huttunen R, Hurme M, Laine J, Eklund C, Vuento R, Aittoniemi J, et al. Endothelial nitric oxide synthase G894T (GLU298ASP) polymorphism is associated with hypotension in patients with *E. coli* bacteremia but not in bacteremia caused by a gram-positive organism. *Shock*. 2009;31(5):448–53.
 148. Picod A, Garcia B, Van Lier D, Pickkers P, Herpain A, Mebazaa A, et al. Impaired angiotensin II signaling in septic shock. *Ann Intensive Care*. 2024;14(1):89.
 149. Bitker L, Burrell LM. Classic and Nonclassic Renin-Angiotensin Systems in the Critically Ill. *Crit Care Clin*. 2019;35(2):213–27.
 150. National Center for Biotechnology Information (NCBI). dbSNP RefSNP Report: rs1799752 (ACE) [Internet]. [cited 2026 Feb 27]. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp/rs1799752>

Prilog 1. Spisak skraćenica

ACCP/SCCM – *American College of Chest Physicians / Society of Critical Care Medicine*
ACE – angiotenzin-konvertujući enzim
AOB – akutno oštećenje bubrega
APACHE II – *Acute Physiology and Chronic Health Evaluation II*
APS – amonijum-persulfat
ARDS – akutni respiratorni distres sindrom
BH4 – tetrahidrobiopterin
CI – interval poverenja
CLP – cecalna ligatura i punkcija
CRP – C-reaktivni protein
CT – kompjuterizovana tomografija
DAMP – molekuli oslobođeni iz oštećenog tkiva (engl. *Damage-Associated Molecular Patterns*)
DIK – diseminovana intravaskularna koagulacija
DNK – deoksiribonukleinska kiselina
dNTP – dezoksinukleozid-trifosfati
EDTA – etilendiamintetrasirćetna kiselina
EHO – ehosonografija
eNOS – endotelna azot-oksid sintaza
ESBL – beta-laktamaze proširenog spektra (engl. *Extended Spectrum Betalactamas*)
EĆ – endotelne ćelije
FAM – fluorescentna reporter boja FAM
FDR – stopa lažnih otkrića (engl. *False Discovery Rate*)
F prajmer – forward prajmer
GBD – globalno opterećenje bolešću (engl. *Global Burden of Disease*)
GIT – gastrointestinalni trakt
GMĆ – glatke mišićne ćelije
GPx1 – glutation-peroksidaza 1
GSTT1 – glutation S-transferaza T1
HAEC – humane aortne endotelne ćelije (engl. *Human Aortic Endothelial Cells*)
HDAC6 – histon deacetilaza 6
HGVS – nomenklatura *Human Genome Variation Society*
HSP – proteini toplotnog šoka (engl. *Heat Shock Proteins*)
HUVEC – endotelne ćelije humane umbilikalne vene (engl. *Human Umbilical Vein Endothelial Cells*)
HWE – Hardy-Vajnbergova ravnoteža (engl. *Hardy-Weinberg Equilibrium*)
IAI – intraabdominalne infekcije
ICAM-1 – intercelularni adhezioni molekul 1
IFN-γ – interferon gama

IL-1 β – interleukin 1 beta
IL-6 – interleukin 6
INDEL – inserciono-delecione varijante
iNOS – inducibilna azot-oksidi sintaza
IRAK-4 – kinaza 4 povezana sa receptorom za interleukin-1 (engl. *Interleukin-1 Receptor-Associated Kinase 4*)
JIN – jedinica intenzivnog lečenja
KCS – Klinički centar Srbije
LPS – lipopolisaharid
MgCl₂ – magnezijum-hlorid
MODS – sindrom disfunkcije više organa (engl. *Multiple Organ Dysfunction Syndrome*)
MOF – otkazivanje više organa (engl. *Multiple Organ Failure*)
MPI – *Mannheim Peritonitis Index*
MPO – mijeloperoksidaza
MRSA – meticilin-rezistentni *Staphylococcus aureus*
MSCT – multislajsna kompjuterizovana tomografija
NaCl – natrijum-hlorid
NADPH – nikotinamid adenin dinukleotid fosfat, redukovani oblik
NF- κ B – nuklearni faktor kapa B
NO – azot-oksidi
NOS – azot-oksidi sintaza
NOS2 – gen za inducibilnu azot-oksidi sintazu
NOS3 – gen za endotelnu azot-oksidi sintazu
OR – odnos šansi (engl. *Odds Ratio*)
PAGE – elektroforeza na poliakrilamidnom gelu (engl. *PolyAcrylamide Gel Electrophoresis*)
PAI-1 – inhibitor aktivatora plazminogena 1
PAMP – molekularni obrasci tipični za patogene (engl. *Pathogen-Associated Molecular Patterns*)
PCR – reakcije lančane polimerizacije
PCR-RFLP - reakcije lančane polimerizacije-polimorfizmi dužine restrikcionih fragmenata (engl. *Polymerase Chain Reaction-Restriction Fragment Length Polymorphism*)
PD – peritonealna dijaliza
R prajmer – reverse prajmer
RAAS – renin-angiotenzin-aldosteron sistem
RNS – reaktivne azotne vrste (engl. *Reactive Nitrogen Species*)
ROS – reaktivne kiseonične vrste (engl. *Reactive Oxygen Species*)
RTG – radiografija
SBP – spontani bakterijski peritonitis
SDS – natrijum-dodecil-sulfat
SNP – polimorfizmi pojedinačnih nukleotida (engl. *Single Nucleotide Polymorphisms*)

SOD2 – superoksid-dismutaza 2

SOFA – *Sequential Organ Failure Assessment*

TBE – Tris-borat-EDTA

TEMED – N,N,N',N'-tetrametiletildiamin

TLR – *Toll-like* receptor

TNF- α – faktor nekroze tumora alfa

Tris-HCl – tris(hidroksimetil)aminometan-hidrohlorid

VCAM-1 – vaskularni ćelijski adhezioni molekul 1

VEO-IBD – inflamatorna bolest creva sa veoma ranim početkom (engl. *Very Early Onset Inflammatory Bowel Disease*)

VIC – fluorescentna reporter boja VIC

VNTR – polimorfizmi broja uzastopnih ponavaka (engl. *Variable Number of Tandem Repeats*)

VRE – vankomicin-rezistentne enterokoke

WSES – *World Society of Emergency Surgery*

BIOGRAFIJA

Milica (Nebojša) Rašić rođena je 5. maja 1992. godine u Prištini. Završila je prirodno-matematički smer Devete gimnazije „Mihailo Petrović Alas” u Beogradu 2011. godine. Medicinski fakultet Univerziteta u Beogradu upisala je školske 2010/2011. godine, a diplomirala je 14. jula 2017. godine sa prosečnom ocenom 9,17. Obavezni lekarski staž obavila je u Domu zdravlja Novi Beograd u periodu od avgusta 2017. do januara 2018. godine. Stručni ispit položila je u februaru 2018. godine. Doktorske akademske studije na modulu Molekularna medicina na Medicinskom fakultetu Univerziteta u Beogradu upisala je 2017. godine.

Od avgusta 2018. godine zaposlena je na Institutu za humanu genetiku Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu, najpre u zvanju istraživača pripravnika na projektima Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja. U martu 2021. godine izabrana je u zvanje saradnika u nastavi na predmetu Humana genetika. U zvanje asistenta za užu naučnu oblast Humana genetika izabrana je u decembru 2022. godine, a u novembru 2025. godine reizabrana je u isto zvanje.

Aktivno je uključena u naučno-istraživački rad i zdravstvenu delatnost u laboratorijama Instituta za humanu genetiku. Autor je i koautor više radova objavljenih u međunarodnim i nacionalnim časopisima, kao i saopštenja prezentovanih na domaćim i međunarodnim naučnim skupovima. Član je Lekarske komore Srbije, Društva genetičara Srbije i Evropskog društva za humanu genetiku.

Govori engleski jezik, a služi se i nemačkim jezikom.

Udata je za Petra i imaju ćerku Sofiju.

Publikovani radovi koji čine deo doktorske disertacije

Originalni naučni rad:

Rasic M, Maksimovic N, Grk M, Dusanovic Pjevic M, Rasic P, Svircev M, Damnjanovic T, Perovic D, Djuranovic Uklein A, Stojanovski N, Pesic M, Novakovic I, Doklestic Vasiljev K. Association of NOS Gene Polymorphisms with Sepsis-Related Complications in Secondary Peritonitis. Int J Mol Sci 2025; 26(21):10306. doi:10.3390/ijms262110306. **M21 IF4.9**

Mini-pregledni naučni rad:

Rašić M, Maksimović N, Doklešić Vasiljev K. The influence of gene polymorphisms on the susceptibility to sepsis and septic shock in surgical patients with secondary peritonitis. Medicinski podmladak. 2028;79(2). doi:10.5937/mp79-55991.

Изјава о ауторству

Име и презиме аутора: Милица Рашић

Број индекса: 5090/2017

Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом

Испитивање удружености полиморфизама гена регулатора васкуларне хомеостазе са ризиком од развоја тешких компликација и исходом код хируршких пацијената са секундарним перитонитисом

- резултат сопственог истраживачког рада;
- да дисертација у целини ни у деловима није била предложена за стицање друге дипломе према студијским програмима других високошколских установа;
- да су резултати коректно наведени и
- да нисам кршила ауторска права и користила интелектуалну својину других лица.

Потпис аутора

У Београду, 20.3.2026.

Милица Рашић

образац изјаве о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада

Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада

Име и презиме аутора: Милица Рашић

Број индекса: 5090/2017

Студијски програм: Молекуларна медицина

Наслов рада: Испитивање удружености полиморфизама гена регулатора васкуларне хомеостазе са ризиком од развоја тешких компликација и исходом код хируршких пацијената са секундарним перитонитисом

Ментор: проф. др Нела Максимовић, проф. др Кристина Доклестић Васиљев

Изјављујем да је штампана верзија мог докторског рада истоветна електронској верзији коју сам предала ради похрањивања у **Дигиталном репозиторијуму Универзитета у Београду**.

Дозвољавам да се објаве моји лични подаци везани за добијање академског назива доктора наука, као што су име и презиме, година и место рођења и датум одбране рада.

Ови лични подаци могу се објавити на мрежним страницама дигиталне библиотеке, у електронском каталогу и у публикацијама Универзитета у Београду.

У Београду, 20.3.2026.

Потпис аутора

Милица Рашић

Изјава о коришћењу

Овлашћујем Универзитетску библиотеку „Светозар Марковић“ да у Дигитални репозиторијум Универзитета у Београду унесе моју докторску дисертацију под насловом:

Испитивање удружености полиморфизама гена регулатора васкуларне хомеостазе са ризиком од развоја тешких компликација и исходом код хируршких пацијената са секундарним перитонитисом

која је моје ауторско дело.

Дисертацију са свим прилозима предала сам у електронском формату погодном за трајно архивирање.

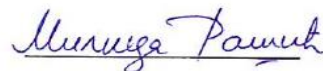
Моју докторску дисертацију похрањену у Дигиталном репозиторијуму Универзитета у Београду и доступну у отвореном приступу могу да користе сви који поштују одредбе садржане у одабраном типу лиценце Креативне заједнице (Creative Commons) за коју сам се одлучио/ла.

1. Ауторство (CC BY)
2. Ауторство – некомерцијално (CC BY-NC)
- ☒ 3. Ауторство – некомерцијално – без прерада (CC BY-NC-ND)
4. Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима (CC BY-NC-SA)
5. Ауторство – без прерада (CC BY-ND)
6. Ауторство – делити под истим условима (CC BY-SA)

(Молимо да заокружите само једну од шест понуђених лиценци. Кратак опис лиценци је саставни део ове изјаве).

У Београду, 20.3.2026.

Потпис аутора



1. **Ауторство.** Дозвољаваје умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце, чак и у комерцијалне сврхе. Ово је најслободнија од свих лиценци.

2. **Ауторство – некомерцијално.** Дозвољаваје умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела.

3. **Ауторство – некомерцијално – без прерада.** Дозвољаваје умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела. У односу на све остале лиценце, овом лиценцом се ограничава највећи обим права коришћења дела.

4. **Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима.** Дозвољаваје умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада.

5. **Ауторство – без прерада.** Дозвољаваје умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела.

6. **Ауторство – делити под истим условима.** Дозвољаваје умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада. Слична је софтверским лиценцама, односно лиценцама отвореног кода.