

**VALSTYBINIS MOKSLINIŲ TYRIMŲ INSTITUTAS
INOVATYVIOS MEDICINOS CENTRAS**

Vincas Urbonas

**VAIKŲ, SERGANČIŲ NAVIKINĖMIS LIGOMIS, BAKTERIEMIJOS BEI
SEPSIO BIOŽYMENYS FEBRILINĖS NEUTROPENIJOS EPIZODO
METU**

Daktaro disertacija

Biomedicinos mokslai, medicina (06B)

Imunologija, serologija, transplantacija (B500)

Vilnius

2013

Disertacija parengta 2008 – 2012 metais Valstybiniame mokslinių tyrimų institute Inovatyvios medicinos centre.

Darbo vadovė:

Dr. Audronė Eidukaitė (biomedicinos mokslai, medicina - 06B, imunologija, serologija, transplantacija - B500).

TURINYS

1. ĮVADAS	9
2. DARBO TIKSLAS IR UŽDAVINIAI	11
2.1. Darbo aktualumas ir mokslinis naujumas	11
2.2. Ginamieji teiginiai	12
3. LITERATŪROS APŽVALGA	13
3.1. Chemoterapijos poveikio organizmui ypatumai	13
3.1.1. Neutrofilų kiekio sumažėjimas (neutropenija)	13
3.1.2. Natūralių organizmo apsauginių barjerų pažeidimas	14
3.1.3. Pacientų su febriline neutropenija standartinis gydymas	14
3.1.4. Rezistentiškumas antibiotikams	16
3.2. Įgimto imuninio atsako ypatumai į bakterinės kilmės infekciją	16
3.2.1. Struktūrą atpažįstantys receptoriai	17
3.2.1.1. Toll receptorių šeima	17
3.2.1.2. NOD receptorių šeima	19
3.2.2. Neutrofilai	20
3.2.3. Citokinai, citokinų receptoriai, ūmios fazės baltymai, procalcitoninas	21
3.2.3.1. Navikų nekrozės faktorius α	23
3.2.3.2. Interleukinas 6	24
3.2.3.3. Interleukinas 8	25
3.2.3.4. Interleukinas 10	25
3.2.3.5. Tirpus interleukino 2 receptorių	26
3.2.3.6. C reaktyvus baltymas	27
3.2.3.7. Procalcitoninas	28
3.2.4. Žmogaus leukocitų antigenas G	29

3.3. Įgimto imuninio atsako ypatumai tarp pacientų su febriline neutropenija	30
3.4. Biožymenys	31
3.5. Citokinių, jų tirpių receptorių bei kitų įgimtame imuniniame atsake dalyvaujančių biomolekulių pokyčiai tarp pacientų su febriline neutropenija	33
3.6. Sepsis	37
3.7. Imunocheminė analizė, jos taikymas tirtų biožymenų nustatymui	41
4. PACIENTAI, TYRIMO MEDŽIAGA IR METODAI	42
4.1. Pacientų atranka, pradinis įvertinimas bei gydymas	43
4.2. Tiriamųjų grupių apibūdinimas	43
4.3. Kraujo mėginių, skirtų biožymenų vertinimui, paėmimas ir laikymas	44
4.4. Biožymenų nustatymas	44
4.4.1. CRB nustatymas turbidimetrijos metodu	44
4.4.2. sHLA-G nustatymas imunofermentinės analizės (ELISA) metodu	45
4.4.3. Interleukinių bei tirpių receptorių nustatymas chemiliuminescentinės heterogeninės imunoanalizės metodu	46
4.4.3.1 sIL-2R nustatymas	46
4.4.3.2 IL-6 nustatymas	48
4.4.3.3 IL-8 nustatymas	48
4.4.3.4 IL-10 nustatymas	49
4.4.4. PCT nustatymas fluorescentinės heterogeninės imunoanalizės metodu	49
4.5. Kraujo pasėlių paėmimas ir vertinimas	50
4.6. Rezultatų vertinime naudoti statistiniai metodai	52

5. REZULTATAI	54
5.1. Demografiniai duomenys, tiriamųjų grupių ypatybės	54
5.2. Bakteriemijos ir sepsio grupės ypatybės mikrobiologiniu požiūriu	55
5.3. Pacientų, priklausančių skirtingoms tiriamoms grupėms, biožymenų tikslumas febrilinės neutropenijos epizodų metu	56
5.4. Tiriamose grupėse vertintų biožymenų kiekybinių reikšmių palyginimas pirmą - antrą febrilinės neutropenijos epizodo dienomis	72
5.5. Bakteriemijos ir sepsio grupės biožymenų pokyčiai pirmą-trečią febrilinės neutropenijos epizodo dienomis	75
5.6. Bakteremijos ir sepsio sąsajos su tirtų biožymenų skaitinėmis vertėmis	79
6. REZULTATŲ APTARIMAS	82
7. IŠVADOS	89
8. LITERATŪROS SĄRAŠAS	91
9. PUBLIKACIJŲ DISERTACIJOS TEMA SĄRAŠAS, PRANEŠIMAI KONFERENCIJOSE, TEZĖS	114
10. PADĖKA	115

SANTRUMPOS

Ag – antigenas

Ak - antikūnas

AP-1 – baltymo aktyvatorius 1 (angl. *activator protein 1*)

AUC – plotas po ROC kreive (angl. *area under the ROC curve*)

BS – bakteriemijos ir sepsio grupė

CAP – JAV patologų draugija (angl. *College of American Pathologists*)

CD – diferenciacijos grupė (angl. *cluster of differentiation*)

CI – pasikliautinumo intervalas (angl. *confidence interval*)

CRB – C reaktyvus baltymas

Dgn – diagnostinis

dsRNR– dvispiralė ribonukleininė rūgštis (angl. *dsRNA*)

ELISA – imunofermentinė analizė (angl. *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*)

ERK – ekstraląstelinį signalą reguliuojanti kinazė (angl. *extracellular-signal-regulated kinase*)

G-CSF – granulocitų kolonijas stimuliuojantis veiksnys (angl. *granulocyte colony stimulating factor*)

Ig – imunoglobulinas

IL-1R – interleukino 1 receptorius

IL-2R – interleukino 2 receptorius

IL-6 – interleukinas 6

IL-8 (CXCL8) – interleukinas 8

IL-10 – interleukinas 10

iRNR – informacinė ribonukleininė rūgštis

FN - febrilinė neutropenija

HLA – žmogaus leukocitų antigenas (angl. *human leukocyte antigen*)

JAK – Janus baltymo kinazė (angl. *Janus protein kinase*)

KC – kaulų čiulpai

kDa - kilodaltonas

LPS – lipopolisacharidas

MAPK - mitogeno aktyvuoto baltymo kinazė (angl. *mitogen activated protein kinase*)

MAS – minkštųjų audinių sarkoma

MODS – dauginis organų pažeidimo sindromas (angl. *multiple organ dysfunction syndrome*)

mTOR – rapamicino žinduolinis objektas (angl. *mammalian target of rapamycin*)

NF-κB – branduolio faktorius κB (angl. *nuclear factor-κB*)

NKK – neaiškios kilmės karščiavimo grupė

NLR – NOD receptoriai (angl. *NOD-like receptor*)

NNV – neigiama nusakomoji vertė (angl. *negative predictive value - NPV*)

Optim - optimalus

PAMP – su patogenu susijusi molekulinė struktūra (angl. *pathogen-associated molecular pattern*)

PGE-2 – prostaglandinas E2

PI3K – fosfatidilinozitol-3-kinazė (angl. *phosphatidylinositol-3-kinase*)

PCT – prokalcitoninas

PRR – struktūrą atpažįstantis receptorius (angl. *pattern recognition receptor*)

ROC – statistinis metodas (angl. *Receiver Operating Characteristics*)

RPM – apsisukimai per minutę (angl. *revolutions per minute*)

sCD14 – tirpus CD14 (angl. *soluble CD14*)

SF – šarminė fosfatazė

sHLA-G – tirpus žmogaus leukocitų antigenas G (angl. *soluble human leukocyte antigen G*)

sIL-2R – tirpus interleukino 2 receptorius (angl. *soluble interleukin 2 receptor*)

STAT – transkripcijos aktyvatorius bei signalo perdavėjas (angl. *signal transducer and activator of transcription*)

TGF - transformuojantis augimo faktorius (angl. *transforming growth factor*)

T_H - T padėjėjas (angl. *T helper*)

TLR – Toll receptoriai (angl. *Toll-like receptor*)

TNV – teigiama nusakomoji vertė (angl. *positive predictive value - PPV*)

TNF- α – navikų nekrozės faktorius α (angl. *tumor necrosis factor α*)

TTP – tristetraprolinas

vsRNR - vienspiralė ribonukleininė rūgštis (angl. *ssRNA*)

UML – ūmi mieloblastinė leukemija

ULL – ūmi limfoblastinė leukemija

1. ĮVADAS

Pasaulyje kiekvienais metais 1–17 metų vaikų tarpe diagnozuojama apie 160 tūkstančių naujų susirgimų vėžinėmis ligomis. Kasmet nuo onkologinių ligų miršta apie 90 tūkstančių vaikų (PSO metodinė medžiaga. Navikiniai susirgimai vaikų tarpe, 2010). Lietuvos vėžio registro duomenimis, 2009 metais sergamumas tarp 1-19 metų vaikų bei paauglių buvo 148 atvejai (Lietuvos vėžio registras, 2009) ir tai yra viena iš pagrindinių mirties priežasčių 1–17 metų amžiaus grupėje (Higienos institutas, Sveikatos informacijos centras. Mirties priežastys, 2011).

Pastaraisiais metais taikant pažangius bei modernius gydymo metodus ženkliai padidėjo onkologinėmis ligomis sergančių vaikų išgyvenamumas, kuris šiuo metu siekia apie 75% (Pritchard-Jones et al., 2006). Šie vaikai dažniausiai miršta dėl pagrindinės savo ligos, t.y. onkologinio proceso organizme, tačiau apie 16% mirties atvejų sudaro taikomo intensyvaus gydymo komplikacijos (Freycon et al., 2008). Viena iš pagrindinių taikomos intensyvios chemoterapijos komplikacijų yra organizmo imuninės sistemos slopinimas ir su tuo susijusi neutropenija, kuri savo ruožtu sąlygoja padidėjusią riziką susirgti bakterinės kilmės infekcinėmis ligomis (Finberg et al., 1999; Ammann et al., 2012). Onkologinėmis ligomis sergančių vaikų tarpe, karščiavimas bei neutropenija yra dažniausi ir neretai vieninteliai gresiančios bakterinės infekcijos požymiai gydymui taikomos intensyvios chemoterapijos fone (Hann et al., 1997). Kadangi bakterinio pobūdžio susirgimas šių ligonių tarpe gali komplikuotis sepsiu bei sepsiniu šoku, visiems be išimties pacientams, kuriems nustatomas karščiavimas bei ženklus neutrofilų kiekio sumažėjimas kraujyje, taikomas intensyvus gydymas intraveniniais plataus spektro antibiotikais ir šie pacientai yra guldomi į ligoninę intensyviai sekimui (Orudjev et al., 2002). Ši gydymo taktika, taikoma febrilinės neutropenijos (FN) metu, ženkliai

sumažino mirtingumą, susijusį su infekcinio pobūdžio komplikacijomis. Tačiau net 70–89% pacientų su FN infekcijos sukėlėjai taikant mikrobiologinius metodus nenustatomi (Hodgson-Viden et al., 2005; Santolaya et al., 1997). Tai rodo, kad didžioji dalis vaikų su FN galėtų būti priskiriama žemos bakterinės kilmės komplikacijų rizikos grupei, kuriai būtų taikoma alternatyvūs gydymo metodai bei ambulatorinė priežiūra, tuo būdu išvengiant stacionarinės priežiūros ir su tuo susijusios gyvenimo kokybės blogėjimo, intraveninių antibiotikų vartojimo bei rezistentiškos mikrofloros išsivystymo, pavojaus užsikrėsti antibiotikams atsparia hospitaline infekcija bei išlaidų, susijusių su gydymu bei vaikų priežiūrai skirtu tėvų nedarbingumu (Te Poele et al., 2009). Mažesnei daliai vaikų su komplikuota (bakteriemija, sepsis) FN eiga turėtų būti taikomas agresyvus aukščiau paminėtas gydymas antibiotikais bei stacionarinė priežiūra (aukštos bakterinės kilmės komplikacijų rizikos grupė) (Mian et al., 2012).

Todėl labai svarbu kasdienėje klinikinėje praktikoje turėti jautrius bei specifinius diagnostinius, atrankinius bei riziką vertinančius biožymenis, kurių pagalba būtų galima vaikus su FN priskirti žemai ar aukštai bakterinės kilmės komplikacijų rizikos grupei bei anksti diagnozuoti beprasidedantį infekcinį procesą (Hatzistilianou et al., 2010), tuo būdu išvengiant nereikalingo plataus spektro intraveninių antibiotikų vartojimo, stacionarinės priežiūros, gyvenimo kokybės blogėjimo bei papildomų išlaidų.

Šio darbo tikslas buvo įvertinti ūmaus bakterinio uždegimo bei sepsio patogenezėje dalyvaujančių citokinių, citokinių receptorių, ūmios fazės baltymų bei kitų imuninio atsako komponentų tinkamumą bakterinio proceso ankstyvai diagnostikai tarp pacientų su FN, šių biožymenų tinkamumą ir pritaikomumą kasdienėje klinikinėje praktikoje.

2. DARBO TIKSLAS IR UŽDAVINIAI

Darbo tikslas – kompleksiškai ištirti ir įvertinti bakterijų sąlygojamo infekcinio proceso bei įgimto imuninio atsako į bakterinės kilmės ūmų uždegimą sąlygojamus biomolekulių pokyčius, vaidmenį patogenezėje bei šių biožymenų tinkamumą sepsio ir bakteriemijos vertinimui FN epizodo metu.

Darbo uždaviniai:

- 1) nustatyti ūmaus bakterinio uždegimo patogenezėje dalyvaujančių citokinų bei citokinų receptorių, t.y. interleukino 6 (IL-6), interleukino 8 (IL-8), interleukino 10 (IL-10) ir tirpaus interleukino 2 receptoriaus (sIL-2R) koncentracijas kraujo serume ir įvertinti jų tinkamumą sepsio bei bakteriemijos diagnostiniams, atrankiniams bei monitoravimo tyrimams FN epizodo metu;
- 2) nustatyti kitų biomolekulių, t.y. C reaktyvaus baltymo (CRP), prokalcionino (PCT) ir tirpaus žmogaus leukocitų antigeno G (sHLA-G), dalyvaujančių ūmiame uždegiminio pobūdžio atsake, koncentracijas kraujo serume ir įvertinti jų tinkamumą sepsio/bakteriemijos diagnostiniams, atrankiniams bei monitoravimo tyrimams FN epizodo metu.

2.1. Darbo aktualumas ir mokslinis naujumas

Kaip jau buvo minėta, chemoterapijos indukuota neutropenija vaikams, sergantiems onkohematologinėmis ligomis, yra vienas iš pagrindinių bakterinės infekcijos rizikos veiksnių. Laiku nediagnozuota bakterinė infekcija tarp onkologinėmis ligomis sergančių vaikų su intensyvaus gydymo indukuota neutropenija, gali baigtis paciento mirtimi. Deja, iki šiol nėra visuotinai pripažintų rekomendacijų kaip taikant laboratorinius bei kitus tyrimo metodus įvertinti bakterinės infekcijos tikimybę vaikams, sergantiems onkohematologinėmis ligomis

ir atvykusiems į ligoninę FN epizodo metu. Todėl yra labai svarbu turėti kasdieninėje klinikinėje praktikoje patikimus biožymenis, kurių pagalba būtų galima tiksliai įvertinti paciento būklę bei patvirtinti ar atmesti bakterinę infekciją FN epizodo metu bei skirti tinkamą gydymą.

Lietuvoje ankstyvų bakterinės infekcijos biožymenų paieškos bei tyrimai vaikams, sergantiems onkohematologinėmis ligomis, vykdomi nebuvo. Užsienyje buvo tyrinėjami įvairių citokinų ar kitų biožymenų pokyčiai kraujo serume kraujo vėžiu ar solidiniais navikais sergantiems vaikams FN metu, tačiau kompleksiskai ir metodiškai ūmaus bakterinio uždegimo patogenezėje dalyvaujantys citokinai bei kitos bioaktyvios molekulės tyrinėtos nebuvo. Šiame tyrime kraujo vėžiu ar solidiniais navikais sergantiems vaikams buvo nustatytos septynių potencialių biožymenų (IL-6, IL-8, IL-10, sIL-2R, CRB, PCT, sHLA-G), dalyvaujančių ūmaus bakterinio uždegimo patogenezėje, koncentracijos kraujo serume ir metodiškai įvertintas šių biožymenų tinkamumas bakteriemijos ir sepsio vertinimui.

2.2. Ginamieji teiginiai

Pateikiami šie ginamieji teiginiai:

- 1) Tiriamieji citokinai, citokinų receptoriai dalyvauja ūmaus bakterinio uždegimo patogenezėje ir gali būti naudojami kaip diagnostinė priemonė vertinant bakteriemiją ir sepsį;
- 2) CRB, PCT ir sHLA-G koncentracijų pokyčiai kraujo serume gali būti naudojami kaip diagnostiniai biožymenys vertinant ūmų bakterinį uždegimą.

3. LITERATŪROS APŽVALGA

3.1. Chemoterapijos poveikio organizmui ypatumai

3.1.1. Neutrofilų kiekio sumažėjimas (neutropenija)

Onkologinėmis ligomis sergančių vaikų gydymui taikomos chemoterapijos indukuotas neutrofilų kiekio sumažėjimas yra vienas iš svarbiausių bei kliniškai reikšmingiausių pašalinių poveikių. 1966 m. Bodey su kolegomis pateikė skaičiavimus, kuriuose aprašė neutrofilų kiekio pokyčių sąsajas su bakterinės infekcijos rizika (Bodey et al., 1966). Pacientams su FN, kurių kraujyje randama mažiau kaip 1000 neutrofilų/mm³, bakterinės kilmės komplikacijų rizika padidėja nuo 38% iki 63%, o pacientams, kurių neutrofilų kiekis yra mažesnis kaip 100 neutrofilų/mm³, ši rizika siekia 100% (Bodey et al., 1966). Šiuo metu visuotinai priimta, kad kliniškai reikšmingas neutrofilų skaičiaus sumažėjimas onkologinių pacientų tarpe yra tada, kai neutrofilų kiekis yra $< 0,5 \times 10^9/l$ ar leukocitų kiekis yra $< 1,0 \times 10^9/l$ (Te Poele et al., 2009). Granulocitų kiekio sumažėjimas kraujyje siejamas su taikomos chemoterapijos toksiniu poveikiu kaulų čiulpams. Neutropenija aptinkama 51% pacientų, gydomų nuo įvairių kraujo bei solidinių navikų (Bley et al., 1996). Neutropenijos trukmę bei intensyvumą įtakoja chemoterapijai naudojami medikamentai, jų deriniai bei navikinės ligos pobūdis. Gydant limfomas, neutropenijos trukmės mediana buvo 3–5 dienos, kai tuo tarpu pacientų, sergančių ūmia mieloleukemija, neutropeninių epizodų mediana siekė 23–27 dienas (Maher et al., 1994; Vellenga et al., 1996). Feld ir kolegos nustatė, kad onkologiniams pacientams, kurie yra gydomi vinkristinu, prednizolonu bei ciklofosfamidu neutropenijos dažnis yra 12%; ciklofosfamidą pakeitus doksorubicinu neutropenijos dažnis padidėja iki 27% ir galiausiai šis

dažnis išauga iki 46%, kai pacientai gydomi ciklofosfamido, vinkristino, prednizolono bei doksorubicino deriniu (Feld et al., 1977).

3.1.2. Natūralių organizmo apsauginių barjerų pažeidimas

Gydymui taikoma chemoterapija toksiškai veikia ne tik į navikines ląsteles, bet ir į daugelį kitų organizmą sudarančių ląstelių ir ypač į tas, kurios pasižymi intensyviu dauginimusi bei santykinai trumpu gyvavimu, t.y. kaulų čiulpų, plaukų, lytinių liaukų, odos bei gleivinių epitelinių ląstelių (Nijhuis et al., 2002). Daugumą bakterinės kilmės komplikacijų pacientams su FN sukelia nepatogeniniai ar sąlyginai patogeniniai mikroorganizmai, kurie dėl taikomo gydymo pažeistų natūralių organizmo apsauginių barjerų (gleivinių) patenka į organizmą ir sukelia uždegiminį procesą, kuris negydomas gali baigtis paciento mirtimi (Nijhuis et al., 2002).

3.1.3. Pacientų su febriline neutropenija standartinis gydymas

Aukšta temperatūra vadiname tokią kūno temperatūrą kai vienkartinio matavimo metu temperatūra būna $> 38,5^{\circ}\text{C}$ ar matuojant kartotinai temperatūra būna $> 38,0^{\circ}\text{C}$ (Klassen et al., 2000). Aukšta temperatūra gali būti vienas iš pirmųjų ir dažnai vienintelis bakterinės infekcijos požymis, ypač vaikų tarpe (Miedema et al., 2011). Kiti klasikiniai uždegiminio proceso požymiai tokie kaip patinimas (lot. *tumor*), paraudimas (lot. *rubor*), skausmas (lot. *dolor*), šiluma (lot. *calor*) bei funkcijos sutrikimas (lot. *functio laesa*) dažniausiai pacientams su FN nėra išreikšti dėl pakitusio uždegiminio atsako chemoterapijos fone (Sickles et al., 1975). Todėl pacientams, kurie gydymo metu ėmė karščiuoti, turi būti skiriamas ypatingas dėmesys. 1971 metais Schimpff pasiūlė empirinį plataus spektro antibiotikų vartojimą

pacientams su FN (Schimpff et al., 1971), dėl to ženkliai sumažėjo mirčių skaičius nuo infekcinio pobūdžio komplikacijų, kuris 1970 metais siekė 60-70%, kai tuo tarpu dabar mirtingumas siekia 0,4–1% (Klassen et al., 2000). Šiuo metu pacientams su FN empiriškai skiriami plataus veikimo spektro intraveniniai antibiotikai bei pacientas yra guldomas į ligoninę intensyviai sekimui (Te Poele et al., 2009; Dubos et al., 2012). Iš ligoninės pacientai dažniausiai yra išleidžiami kai nustoja karščiuoti (minimalus periodas be karščiavimo turi siekti bent 24 valandas) ir absoliutus neutrofilų kiekis tampa didesnis kaip $0,5 \times 10^9/l$ (Mullen et al., 1990; Santolaya et al., 1997). Tačiau net 70-89% pacientų su FN infekcijos sukėlėjai mikrobiologiškai neidentifikuojami ir karščiavimo priežastimi būna uždegiminis procesas, kurį sukelia ne bakterijos, bet virusai, gleivinių pažeidimas, chemoterapiniai preparatai ar pats navikinis procesas (Te Poele et al., 2009; Hodgson-Viden et al., 2005; Crokaert et al., 2000). Todėl šios grupės pacientams, kurie karščiuoja ne dėl bakterinės kilmės infekcijos, standartinis gydymas intraveniniais plataus spektro antibiotikais nėra racionalus bei gali sukelti neigiamas pasekmes, tokias kaip rezistentiškos mikrofloros išsivystymą, be to, ženkliai padidėja tikimybė užsikrėsti antibiotikams atsparia hospitaline infekcija, sutrikdomas paciento bei jo artimųjų įprastas gyvenimo ritmas. Be to, pacientai su FN sudaro pakankamai heterogeninę populiaciją, kurios imlumas bakterinei infekcijai yra nevienodas (Talcott et al., 1988; Crokaert et al., 2000). Šiuo metu visuotinai priimto sutarimo kaip įvertinti bakterinės kilmės infekcijos riziką onkologinėmis ligomis sergantiems vaikams FN epizodo metu nėra (Philips et al., 2012), todėl tinkamų laboratorinių biožymenų turėjimas bei jų taikymas kasdienėje klinikinėje praktikoje būtų labai svarbus žingsnis į priekį diagnozuojant FN priežastis, gydant šio sindromo komplikacijas bei išvengiant neracionalaus antibiotikų vartojimo.

3.1.4. Rezistentiškumas antibiotikams

Šiuo metu pacientams su FN taikomas standartinis gydymas plataus spektro antibiotikais ženkliai sumažino mirtingumą nuo infekcinių komplikacijų, tačiau ši paplitusi gydymo taktika turi ir nepageidaujamų reiškinių. 1989 metais Oppenheim su kolegomis aprašė koaguliazei neigiamos stafilokokinės infekcijos protrūkį leukemija sergantiems pacientams, kurie buvo rezistentiški gydymui ciprofloksacinu (Oppenheim et al., 1989). Buvo aprašytas ir enterokokų atsparumas gydymui vankomicinu tarp pacientų su FN (Edmond et al., 1995). Nucci su kolegomis nustatė, kad net 13,8% iš daugiau kaip trijų šimtų onkologinių pacientų su FN, kuriems buvo taikyta standartinė gydymas antibiotikais, komplikavosi superinfekcija, kurią sukėlė gram-neigiamos bakterijos bei grybelinė infekcija ir tai tiesiogiai koreliavo su aukštu mirtingumu (Nucci et al., 1997).

3.2. Įgimto imuninio atsako ypatumai į bakterinės kilmės infekciją

Infekcinio proceso išsivystymą organizme sąlygoja kompleksinė mikroorganizmų bei individo sąveika. Infekcinio proceso metu mikroorganizmai patenka į organizmą, kolonizuoja tam tikrus organizmo audinius ir sukelia struktūrinį pažeidimą ar sutrikdo kolonizuotų audinių funkciją. Padidėjusį imlumą bei riziką bakterinės kilmės infekcijoms tarp navikinėmis ligomis sergančių vaikų su FN apsprendžia tiek pats navikinis procesas, tiek gydymui skiriama chemoterapija, kuri sukelia imuninio pobūdžio ląstelių nepakankamumą (Neth et al., 2005; Lehrnbecker et al., 2008).

3.2.1. Struktūrą atpažįstantys receptoriai

Ilgą laiką buvo manoma, kad įgimta imuninė sistema atpažįsta mikroorganizmus nespecifiškai. Ir tik prieš dešimtmetį buvo įrodyta, kad įgimta imuninė sistema atpažįsta infekcinių ligų sukėlėjus specifiniais receptoriais, kurie yra ekspresuojami ląstelėje ar sekretuojami. Šie receptoriai buvo pavadinti struktūras atpažįstančiais receptoriais (angl. *pattern recognition receptors* - PRRs), o patogenų struktūriniai elementai, kuriuos šie receptoriai atpažįsta vadinami su patogenu susijusiomis molekulinėmis struktūromis (angl. *pathogen associated molecular patterns* – PAMPs) (Akira et al., 2001; Janeway et al., 2002; Medzhitov, 2007; Medzhitov, 2010; Kawai et al., 2010). PRR ypatybė yra ta, kad šie receptoriai atpažįsta PAMP, kurie savo ruožtu yra unikalūs ir pasižymi trimis pagrindinėmis savybėmis, tokiomis kaip struktūriniu nekintamumu, unikalumu (būdinga tik mikroorganizmams, bet ne žmonėms) ir nepakeičiamumu (vaidina svarbų vaidmenį mikroorganizmų fiziologiniuose procesuose) (Janeway et al., 1989; Medzhitov et al., 2007). Įgimta imuninė sistema naudoja PRR mikroorganizmų detekcijai, sąveikaudama su PAMP (Medzhitov et al., 2007). Struktūriškai PRR skiriami į ląstelėje ekspresuojamus (angl. *Toll like receptors* - TLRs, *NOD like receptors* - NLRs) ir tirpius (fikolinus, pentraksinus, kolektinus) (Kawai et al., 2010). Labai svarbu yra tai, kad PRR yra ekspresuojami tiek imuninės kilmės, tiek kitų neimuninės kilmės ląstelių (epitelinių, endotelinių, fibroblastų) (Kawai et al., 2010). Bakterijoms patekus į organizmą, jos yra atpažįstamos PRR ir dėl to yra indukuojamas uždegiminis atsakas, kuris yra nukreiptas į infekcijos eliminavimą (Medzhitov, 2008; Medzhitov, 2010).

3.2.1.1. Toll receptorių šeima

Vieną iš pagrindinių vaidmenų įgimtame imuniniame atsake prieš bakterinės kilmės infekciją vaidina Toll receptoriai. Šiuo metu yra indentifikuota vienuolika Toll receptorių, kurie žymimi skaičiais TLR1 - TLR11. Net aštuoni iš vienuolikos TLR dalyvauja skirtingų bakterinių struktūrinių elementų atpažinime (Takeuchi et al., 2010; Hoebe et al., 2004; Hajishengallis et al., 2010). Toll receptoriai yra transmembraniniai glikoproteinai, kuriuos sudaro ekstraląstelinė dalis, kuriuoje gausu leucino bei intraląstelinė dalis, kuri yra atsakinga už signalo perdavimą ląstelės viduje (Kawai et al., 2010). Šiuos receptorius galima skirti į dvi grupes. Vieną grupę sudaro TLR1, TLR2, TLR4, TLR5, TLR6 receptoriai, kurie yra ekspresuojami ląstelės paviršiuje ir dalyvauja lipidų, lipoproteinų bei baltymų atpažinime. Kitą grupę sudaro TLR3, TLR8, TLR9, kurie yra ekspresuojami tik ląstelės viduje t.y. endoplazminiame retikuliume, endosomose, lizosomose bei endolizosomose ir dalyvauja bakterijų nukleino rūgščių atpažinime (Takeuchi et al., 2010; Kawai et al., 2010). TLR4 sąveikauja su mikroorganizmų lipopolisacharidais (LPS), kurie yra gram-neigiamų bakterijų išorinės membranos struktūrinis elementas, galintys sukelti sepsinį šoką (Kawai et al., 2010; Akira et al., 2006; Schroder et al., 2005). Endotelio ląstelės kaip ir monocitai savo paviršiuje ekspresuoja TLR4 bei TLR2. Atlikti *in vitro* tyrimai parodė, kad LPS skatina endotelio ląsteles produkuoti IL-6, IL-8 per sąveiką su TLR4 bei TLR2 (Faure et al., 2000; Hippenstiel et al., 2000).

TLR sąveikaujant su PAMP, kaskadiniu principu aktyvuojama visa eilė intraląstelinių baltymų bei transkripcijos faktorių (pagalbiniai baltymai → proteinkinazės → transkripcijos faktoriai), todėl aktyvuojami nuo TLR veiklos priklausantys genai, atsakingi už uždegimą skatinančių citokinų (TNF- α , IL-6, IL-8) ekspresiją, kurie savo ruožtu indukuoja organizmo uždegiminę reakciją kaip atsaką į tam tikrą sukėlėją (Medzhitov et al., 2007; Kawai et al., 2010; Akashi-Takamura et al.,

2008; ; Park et al., 2009; Jin et al., 2007; Kang et al., 2009; Uematsu et al., 2008; Mancuso et al., 2009; Haas et al., 2008).

Toll receptorių kaskadinės aktyvacijos išdavoje aktyvuoti transkripcijos faktoriai (NF- κ B, AP-1) translokuojasi į ląstelės branduolį ir dalyvauja genų - taikinių transkripcijos procesuose. Šie genai yra atsakingi už uždegimą skatinančių citokinų bei antimikrobinėmis savybėmis pasižyminčių baltymų sintezę (Takeuchi et al., 2010; Xia et al., 2009; Bhoj et al., 2009; Palsson-McDermott et al., 2009; Ermolaeva et al., 2008; Tseng et al., 2009). NF- κ B indukuoja ne tik uždegimą skatinančių citokinų transkripciją, bet ir transkripciją baltymų, kurie tiesiogiai dalyvauja šio proceso reguliacijoje (Takeuchi et al., 2010; Gilchrist et al., 2006; Yamamoto et al., 2004; Matsushita et al., 2009).

Toll receptorių aktyvacijos išdavoje indukuojama ne tik baltymus koduojančių iRNR, bet ir baltymų nekoduojančių – mikroRNR – ekspresija (Guttman et al., 2009; Taganov et al., 2006). Keletas iš šių mikroRNR (miR-155, miR-21) dalyvauja įgimto imuninio atsako reguliacijoje, slopindamos ar aktyvuodamos šį procesą (Faraoni et al., 2009; Sheedy et al., 2009).

3.2.1.2. NOD receptorių šeima

Šie receptoriai lokalizuojasi ląstelių citoplazmoje ir dalyvauja bakterijų bei virusų struktūrinių elementų atpažinime. NLR receptorių šeimą sudaro daugiau kaip dvidešimt intraląstelių baltymų, kurie pasižymi skirtingomis funkcijomis (Fritz et al., 2006; Inohara et al., 2005; Meylan et al., 2006). Receptorius sudaro centrinis nukleotidą prijungiantis domenai bei C-terminalinė sritis, kurioje gausu amino rūgšties leucino (Fritz et al., 2006; Inohara et al., 2005; Meylan et al., 2006). Šiai grupei priklausančios receptoriai NOD1 ir NOD2 sąveikaudami su bakterijų struktūriniais elementais (peptidoglikanais, D-gliutamil-mezodiaminopimeline rūgštimi bei muramildipeptidais),

indukuoja uždegiminių citokinų genų transkripciją kaskadinės baltymų aktyvacijos principu per transkripcijos faktorių NF- κ B bei mitogeno aktyvuoto baltymo kinazės (MAPK) (Fritz et al., 2006; Inohara et al., 2005; Meylan et al., 2006; Takeuchi et al., 2010; Underhill et al., 2007; Eckmann et al., 2005).). Svarbu pažymėti ir tai, kad NOD receptoriai kaip ir TLR, randami ne tik imuninės kilmės, bet ir kitose organizmo ląstelėse (Kobayashi et al., 2005).

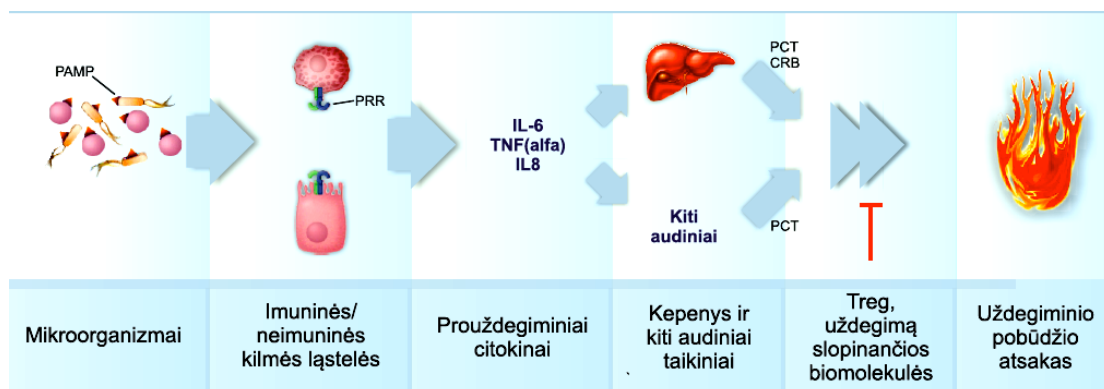
3.2.2. Neutrofilai

Neutrofilai – tai grūdėtųjų leukocitų - granuliocitų potipis, išsivystantis iš mieloidinių pirmtakų. Šios ląstelės yra vienos iš pagrindinių ūmaus uždegiminio atsako ląstelių komponentų ir yra svarbiausia ląstelinės apsaugos dalis bakterinės infekcijos pradžioje (Phillipson et al., 2011; Sadik et al., 2011). Eksperimentiniai duomenys rodo, kad neutrofilų migracija bei kaupimasis uždegiminiame židinyje yra labai svarbus veiksnys, užtikrinantis bakterinės infekcijos eliminaciją (Dotta et al., 2011). Neutrofilai produkuojami kaulų čiulpuose. Šį procesą skatina granuliocitų kolonijų stimuliuojantis veiksnys (G-CSF), kurio gamybą indukuoja T ląstelių išskiriamas interleukinas 17A (IL-17A) (Lieschke et al., 1994; Ley et al., 2006). Savo ruožtu IL-17A produkciją skatina interleukinas 23 (IL-23), kurį sintetina aktyvuoti audinių makrofagai bei dendritinės ląstelės (Stark et al., 2005; Ley et al., 2006). Neutrofilai, chemotaksinių medžiagų poveikyje (komplemento komponento C5a, CXCL8), migruoja iš kraujotakos į uždegimo židinį, kuriame PAMP bei neutrofilų paviršiuje ekspresuojamų receptorių (PRR, Fc, komplemento) sąveikos metu aktyvuojasi ir dalyvauja bakterinių sukėlėjų eliminacijos procese, fagocituojant juos ir ardant fagosomose bei išskiriant bioaktyvius bakterijas ardančius baltymus (katepsinus, defensinus, laktoferinus) į supančią aplinką (Castellheim et al., 2009; Borregaard, 2010; Hager et al., 2010).

Neutrofilai aktyviai dalyvauja ir įgyto imuninio atsako reguliavime. Infekcinio proceso pradžioje šios ląstelės gamina γ -interferoną, kuris skaitina T_H ląstelių vystymąsi. Be to, šių ląstelių produkuojamas B ląsteles aktyvuojantis veiksnys skatina B ląsteles gaminti antikūnus (Kolaczowska et al., 2013).

3.2.3. Citokinai, citokinų receptoriai, ūmios fazės baltymai, procalcitoninas

Tipišką ūmų uždegiminį atsaką sudaro keturi pagrindiniai komponentai: 1) uždegimo sukėlėjai, 2) sensoriai, kurių pagalba uždegimo sukėlėjai yra nustatomi, 3) uždegimo mediatoriai, indukuojami sensorių pagalba ir 4) audiniai-taikiniai, kuriuos veikia uždegimo mediatoriai (Medzhitov 2007).



1 pav. Ūmaus bakterinio uždegiminio atsako patogenezė (V. Urbonas, 2012)

Ūmų bakterinį uždegimą organizme indukuoja mikroorganizmų (bakterijų) paviršiuje ekspresuojami PAMP, kurie sąveikaudami su PRR, esančiais imuninės (neutrofilų, makrofagų, dendritinių ląstelių) bei neimuninės kilmės ląstelių paviršiuje, sukelia uždegiminių citokinų (TNF- α , IL-6, IL-8) sintezę. Šie citokinai, sąveikaudami su audiniais-taikiniais (hepatocitais, kraujagyslių endotelio ląstelėmis bei tiesioginiai imuniniame atsake dalyvaujančiomis ląstelėmis) sukelia uždegiminio pobūdžio atsaką (CRB, PCT sintezę, kraujagyslių vazodiliataciją, neutrofilų chemotaksį, plazmos eksudaciją į uždegimo židinį, kitų įgimtos bei įgytos imuninės sistemos ląstelių aktyvaciją). Uždegiminio proceso kontrolėje dalyvauja priešuždegiminės bioaktyvios molekulės (IL-10) bei įvairios T_{reg} (reguliacinių) ląstelių subpopuliacijos (\perp - slopinimas).

Bakterinės kilmės sukėlėjai yra atpažįstami receptorių (TLR, NLR), kuriuos ekspresuoja imuninės bei neimuninės kilmės ląstelės. Ši sąveika indukuoja ląsteles gaminti uždegimo mediatorius (citokinus, ūmios fazės baltymus), kurie savo ruožtu veikia į audinių ląsteles - taikinius, sukeldami uždegimui būdingą organizmo atsaką (kraujagyslių pralaidumo didėjimą, vazodiliataciją, neutrofilų chemotaksio indukciją, skystosios kraujo dalies eksudaciją į infekcijos pažeistus audinius (Medzhitov 2007).

Vieni iš pagrindinių uždegimo mediatorių yra citokinai. Citokinai – tai specializuotos molekulės, kurias sintetina įvairios organizmo ląstelės kaip atsaką į infekcinį procesą (Nijhuis et al., 2002). Citokinams priklauso daugiau kaip 200 polipeptidų. Nors struktūriškai šios molekulės tarpusavyje skiriasi, visoms joms būdinga tai, kad pasižymi pleotropiniu veikimu, dažnai įtakoja kitų citokinų funkciją bei sintezę, poveikis jų gali būti vietinis bei sisteminis, išoriniai signalai reguliuoja citokinų receptorių ekspresiją bei ląstelių atsaką į citokinus, citokinų poveikyje kinta ląstelėse-taikiniuose genų ekspresija, dėl to ląstelė įgyja naujų funkcijų bei savybių (Charo et al., 2006; O’Shea et al., 2008). Vieni iš pagrindinių citokinų, dalyvaujančių natūralaus imuniteto procesų reguliacijoje, t.y. uždegiminio proceso indukcijoje bei slopinime yra uždegiminiai citokinai TNF- α , IL-6, IL-8 bei uždegimą slopinantis citokinas IL-10 (O’Shea et al., 2008; Nijhuis et al., 2002). Aktyvuojančio signalo generavimui, citokinai jungiasi prie atitinkamų citokinų receptorių, kuriuos sudaro vienas ar keli transmembraniniai baltymai, atsakingi už atitinkamo citokino prijungimą bei citoplazminė receptoriaus dalis, kuri dalyvauja tolimesniame aktyvuojančio signalo perdavime (O’Shea et al., 2008). Daugumos uždegiminių citokinų aktyvuojančio signalo perdavimas vyksta dalyvaujant Janus baltymo kinazių (JAK) šeimai priklausančioms tirozinkinazėms bei transkripcijos faktoriams, priklausantiems STAT šeimai (angl. *signal transducer and*

activator of transcription) (Schindler et al., 2007; Murray et al., 2007; O'Shea et al., 2002; O'Shea et al., 2013).

3.2.3.1. Navikų nekrozės faktorius α

Navikų nekrozės faktorius α (TNF- α) - tai 17 kDa polipeptidas, kuris yra vienas iš pagrindinių ūmaus uždegimo mediatorių bei pasižymi įvairiomis biologinėmis savybėmis (Foster et al., 2012). Kitaip nei daugumos uždegiminių citokinų, TNF- α poveikis indukuojamas per specifinius TNF receptorius, dalyvaujant specifiniams pagalbiniais baltymams bei kinazėms, dėl to aktyvinami transkripcijos faktoriai (AP-1, NF- κ B), tuo būdu indukuojant baltymų, apsprendžiančių šio citokino biologinį atsaką, gamybą. Pagrindinis TNF- α šaltinis yra aktyvuoti mononukleariniai fagocitai. Svarbiausia šio citokino fiziologinė funkcija yra telkti neutrofilus bei monocitus infekcijos židinio vietoje (indukuojant adhezijos molekulių ekspresiją endotelio ląstelių paviršiuje, stimuliuojant šias ląsteles gaminti chemokinus) bei aktyvuoti šias įgimto imuniteto ląsteles kovai prieš infekcijos sukėlėjus (Foster et al., 2012). TNF- α pasižymi ir sisteminiu poveikiu. Patekęs į kraujotaką, šis citokinas veikia į pagumburį indukuodamas karščiavimą. Ilgalaike bei pastovi TNF- α sekrecija slopina apetitą bei inhibuoja fermentą lipoproteinlipazę, dėl ko vystoti organizmo išsekimas (kacheksija) (Foster et al., 2012).

Keliose studijose (Ishii et al., 1991; Herrmann et al., 1994) TNF- α koncentracijų pokyčiai kraujo serume buvo vertinami navikinėmis ligomis sergantiems pacientams infekcijos metu, kurie buvo suskirstyti į dvi grupes, t.y. pacientus su neutropenija ir be neutropenijos. Pacientų su neutropenija grupėje TNF- α koncentracija kraujo serume buvo ženkliai mažesnė. Kaip potencialus bakterinės infekcijos biožymuo tarp pacientų su FN TNF- α buvo analizuojamas bei vertinamas keliose

studijose, tačiau statistinio patikimumo tarp pacientų su bakterine infekcija ir TNF- α koncentracijos pokyčių gauta nebuvo (Schonbohn et al., 1995; Buyukberber et al., 2009; Soker et al., 2001; Parsa et al., 2007; Ambrahamsson et al., 1997; Hynninen et al., 1995). *Ex vivo* studijų duomenimis, santykinai maža TNF- α koncentracija tarp pacientų su FN gali būti siejama su sumažėjusiu granulocitų kiekiu (de Bont et al., 2000; Denecker et al., 1997; Takamatsu et al., 1993).

3.2.3.2. Interleukinas 6

IL-6 – tai 19–26 kDa polipeptidas, pasižymintis pleotropinėmis savybėmis. Šis uždegiminis citokinas dalyvauja hematopoezėje (skatina neutrofilų gamybą kaulų čiulpuose) bei ūmios fazės baltymų indukcijoje (CRP), onkogenezėje (dalyvaujant STAT1 bei STAT3), taip pat skatina B limfocitų proliferaciją bei diferenciaciją (Tawara et al., 2011; Kimura et al., 2010; Jones et al., 2005; Naugler et al., 2008; Naka et al., 2002; Foster et al., 2012; Lin et al., 2007). Pagrindiniai IL-6 šaltiniai yra endotelio ląstelės, makrofagai, limfocitai (Foster et al., 2012). IL-6 sintezė yra indukuojama nuo NF- κ B priklausomu būdu bei PGE-2 ir TGF- β poveikyje (Tawara et al., 2011). Savo ruožtu IL-6 veikia į ląsteles taikinius per specifinius IL-6 receptorius (Tawara et al., 2011; Jones et al., 2005). IL-6 ir šio receptoriaus sąveikos pasekoje, aktyvinami JAK-STAT transkripcijos faktoriai bei kinazės (MAPK, PI3K), kurios apsprendžia specifinį šiam citokinui būdingą atsaką (Tawara et al., 2011). Svarbu paminėti, kad veikdamas lokaliai bei sistemiškai, IL-6 indukuoja ūmios fazės baltymų sintezę (CRP bei kitų) hepatocituose (Medzhitov 2010), kartu su TGF- β dalyvauja T_H17 aktyvinimo procesuose ir slopina T_{reg} veiklą (Wan et al., 2009).

3.2.3.3. Interleukinas 8

IL-8 (CXCL8) – tai 8–10 kDa uždegiminis citokinas, priklausantis chemokinių pogrupiui. Chemokinams būdinga tai, kad šie citokinai dalyvauja leukocitų migracijos iš kraujo į audinius procesuose. Šis citokiną produkuoja aktyvuotos imuninės (monocitai, makrofagai, T ląstelės) bei neimuninės kilmės (endotelis, epitelis, fibroblastai) ląstelės (Hippenstiel et al., 2000; Mukaida, 2003). IL-8 sintezę skatina uždegiminiai citokinai (IL-1, TNF- α) bei bakterijos ir jų produktai (LPS) veikdami per PRR ir indukuodami transkripcijos faktorių NF- κ B bei AP-1 aktyvaciją (Baggiolini et al., 1997; Oppenheim et al., 1991; Hippenstiel et al., 2000). IL-8 skatina neutrofilų adheziją prie endotelio, migraciją link infekcijos židinio bei neutrofilų degranuliaciją (Oppenheim et al., 1991). Be to, šis citokinas dalyvauja žaizdų gijimo procesuose, angiogenenezėje bei skatina navikų vystymąsi (Zheng et al., 2007).

Van Zee su kolegomis atlikto eksperimento metu beždžionėms buvo suleista *Escherichia coli* bakterijų bei LPS, tokiu būdu indukuojant joms septinę būklę. Vertinant IL-8 koncentraciją šių primatų kraujyje, buvo stebimas IL-8 padidėjimas (Van Zee et al., 1991). Analogiškas IL-8 padidėjimas kraujo serume buvo stebimas ir pacientams su sepsiu (Friedland et al., 1992; Hack et al., 1992).

3.2.3.4. Interleukinas 10

IL-10 – tai 34-40 kDa citokinas, pasižymintis imunosupresinėmis bei priešuždegiminėmis savybėmis (Nathan et al., 2010). IL-10 produkuoja įgimto imuninio atsako ląstelės (makrofagai, dendritinės ląstelės, neutrofilai, NK ląstelės), kurios yra aktyvuojamos ūmaus bakterinio uždegimo metu sąveikaujant mikroorganizmų PAMP su PRR (TLR2, TLR3, TLR4, TLR9) bei įgyto imuninio atsako ląstelės (reguliacinės T ląstelės - Treg) (Saraiva et al., 2010; Pestka et al.,

2004; Belkaid, 2007). Įgimto bei įgyto imuninio atsako ląstelių produkuojamas IL-10, veikdamas per STAT3 bei ERK, inhibuoja uždegiminių citokinų (IL-6, TNF- α) sintezę bei kai kurias aktyvuotų makrofagų funkcijas (slopina IL-12 sintezę bei HLA ekspresiją ląstelės paviršiuje) ir veikdamas antagonistiskai uždegiminiams citokinams (IL-6, IL-8, TNF- α), slopina ūmaus bakterinio uždegiminio proceso plitimą, šio proceso intensyvumą, (Saraiva et al., 2010; Saraiva et al., 2009; Foster et al., 2012; Moore et al., 2001;) tuo būdu ribodamas audinio pažeidimo laipsnį.

3.2.3.5. Tirpus interleukino 2 receptorių

Interleukino 2 receptorių (IL-2R/CD25) pastoviai ekspresuoja Treg ląstelės savo ląstelių paviršiuje ir šių receptorių ekspresija tiesiogiai susijusi su šių ląstelių aktyvumu. IL-2R receptoriai yra ekspresuojami ir neimuninės kilmės ląstelių (endotelio ląstelių, fibroblastų) ir tai siejama su interleukino-2 (IL-2), skatinančio Treg proliferaciją bei diferenciaciją, homeostazės reguliacija (Boyman et al., 2012; Krieg et al., 2010; Taniguchi et al., 1993; Malek, 2008; Granucci et al., 2001). Viena iš pagrindinių šio receptoriaus funkcijų yra afiniteto IL-2 sustiprinimas (Boyman et al., 2012; Taniguchi et al., 1993; Malek, 2008; Granucci et al., 2001). Skiriama keletas IL-2R receptoriaus formų ir viena iš jų yra ląstelės paviršiuje ekspresuojamas ir mažesnės molekulinės masės bei tirpus IL-2R/CD25 (sIL-2R/sCD25), kuris randamas periferiniame kraujyje. Ūmiame uždegiminiame atsake dalyvaujančios aktyvuotos dendritinės bei Treg ląstelės sekretuoja į aplinką sIL-2R ir tai yra siejama su šių ląstelių aktyvacija (Schulz et al., 1998; Lindqvist et al., 2010), kuri stebima ūmaus infekcinio proceso metu. Kaip jau buvo minėta, sIL-2R ekspresija tiesiogiai susijusi su Treg bei kitų imuninės kilmės ląstelių aktyvacija ūmaus bakterinio uždegimo

metu, todėl šio tirpaus receptoriaus koncentracijos pokyčiai kraujo serume atspindi uždegiminio atsako intensyvumą.

3.2.3.6. C reaktyvus baltymas

C reaktyvus baltymas (CRB) – tai ūmios fazės baltymas, kurio pavadinimas kilęs dėl šio baltymo savybės jungtis prie *Streptococcus pneumoniae* paviršiuje esančio C-polisacharido (Black et al., 2004). CRB priklauso plazmoje esančių baltymų pentraksinų grupei ir šis baltymas yra jautrus uždegimo bei audinių pažeidimo žymuo (Pepys et al., 1983; Srinivasan et al., 1996; Hirschfield et al., 2003). CRB dalyvauja imuniniuose procesuose, aktyvuodamas agliutinaciją, komplemento baltymus bei fagocitozę (Black et al., 2004). CRB sintezę hepatocituose indukuoja uždegiminiai citokinai (IL-6, TNF- α) (Gabay et al., 1999). Sveikų žmonių kraujyje CRB koncentracija dažniausiai būna iki 10 mg/l. Bakterinių infekcijų, traumų, nudegimų, audinių nekrozės metu CRB koncentracija per pirmą - antrą susirgimo parą padidėja dešimtis – šimtus kartų (Ansar et al., 2013). Padidėjusi CRB koncentracija kraujo serume yra ankstyvas ir jautrus mikrobinės infekcijos indikatorius, tačiau nėra specifiškas, nes šio baltymo koncentracija būna padidėjusi ir prie kitų uždegiminio pobūdžio pažeidimų (reumatinių ligų, miokardo infarkto) (Ansar et al., 2013; Ventetuolo et al., 2008). CRB koncentracijos padidėjimas tiesiogiai siejasi su uždegiminio stimulo pobūdžiu (bakterijos sukelia žymiai ženklėsnį CRB padidėjimą nei virusai) bei priklauso nuo pažeisto organo ar audinio lokalizacijos (Ansar et al., 2013). CRB baltymo padidėjimas buvo stebimas tarp pacientų su sepsiu (Povoa et al., 2005; Yentis et al., 1995) ir CRB buvo jautresnis žymuo lyginant su temperatūros padidėjimu (karščiavimu) ir leukocitų skaičiaus pokyčiais tarp šių ligonių (Povoa et al., 2006), tačiau duomenų šio biožymens pritaikymui sepsio diagnostikai nepakako. Kadangi CRB skilimo

pusperiodis kraujo plazmoje yra apie 18-19 val., šį biožymenį galima naudoti patologinių procesų, sukeliančių uždegiminį atsaką, intensyvumo sekimui. CRB plačiai naudojamas kasdienėje gydytojo praktikoje uždegiminio proceso bei atsako į paskirtą gydymą vertinimui (Vassiliadis et al., 2012; Hirschfield et al., 2003), ypač vertinant gydymo antibiotikais efektyvumą (Povoa et al., 2005).

3.2.3.7. Prokalcitoninas

Prokalcitoninas (PCT) – tai polipeptidas, kurį sudaro 116 amino rūgščių. PCT yra hormono kalcitonino pirmtakas, kurį sintetina skydliaukės C tipo ląstelės ir kuris dalyvauja kalcio apykaitoje (Zaidi et al., 1992). Sepsio, sisteminės infekcijos ar stipraus uždegimo metu PCT koncentracija kraujo serume padidėja dešimtis – šimtus kartų (Whang et al., 1998). Pirminis patofiziologinis dirgiklis, susijęs su PCT koncentracijos ženkliu didėjimu, yra bakterinė infekcija. LPS bei kiti bakterinės infekcijos apykaitos produktai bei, kaip atsakas į infekciją, pasigaminę uždegiminiai citokinai (IL-6, TNF- α) indukuoja organizmo ląsteles produkuoti PCT (Deis et al., 2010). Manoma, kad PCT ūmaus uždegimo metu sintetina kepenų, mononuklearinės bei kitos organizmo ląstelės (Nijsten et al., 2000; Sponholz et al., 2006; Carnino et al., 2010). Svarbu pažymėti, kad PCT koncentracijos pokyčiams neturi įtakos cirkuliuojančių leukocitų kiekis kraujyje (Radimerski et al., 2010). PCT koncentracija periferiniame kraujyje ima ženkliai didėti praėjus 6–12 valandų po organizmo kontakto su bakterine infekcija. Paskyrus tinkamą gydymą antibiotikais ar organizmo imuninei sistemai neutralizavus infekcijos sukėlėją, PCT koncentracija ryškiai sumažėja. PCT koncentracija kraujyje koreliuoja su bakterinio infekcinio proceso eiga bei sunkumu (Muller et al., 2010; Schuetz et al., 2010; Schuetz et al., 2011; Becker, 2004). PCT koncentracijos nustatymas kraujyje plačiai taikomas bakterinio proceso diagnostikai bei gydymo

antibiotikais vertinimui (Schuetz et al., 2011).

3.2.4. Žmogaus leukocitų antigenas G

Žmogaus leukocitų antigenas G (HLA-G) – tai neklasikinė HLA I klasės molekulė, pasižyminti imunomoduliacinėmis savybėmis. Fiziologinėmis sąlygomis šią molekulę pastoviai ekspresuoja vaisiaus trofoblasto, skydliaukės, kepenų ląstelės bei eritrocitų, endotelio ląstelių pirmtakai, be to HLA-G ekspresija indukuojama sergant navikinėmis ligomis, uždegiminių susirgimų bei infekcijų metu (Carosella et al., 2008). Skiriamos 7 šio baltymo izoformos – ekspresuojamos ląstelių paviršiuje (HLA-G1, G2, G3, G4) ir tirpios (sHLA-G5, G6, G7) (Carosella et al., 2008; Gonzalez et al., 2012; Rebmann et al., 2003; Bahri et al., 2009). Vienas iš stipriausių sHLA-G induktorių yra imunosupresinėmis savybėmis pasižymintis citokinas IL-10 (Moreau et al., 1999). HLA-G poveikis yra imunosupresinio pobūdžio ir šis poveikis yra realizuojamas per visą eilę receptorių – KIR2DL4 (CD158d), ILT2 (LILRB1/CD85j), ILT4 (LILRB2/CD85d), CD160 (BY55), kurie yra endotelinių bei imuninės kilmės ląstelių (NK, B, T, makrofagų) paviršiuje (Pistoia et al., 2007; Shiroishi et al., 2003; Riteau et al., 2001; Colonna et al., 1998). sHLA-G5 bei netirpios HLA-G molekulės inhibuoja įgimtame bei įgytame imuniniame atsake dalyvaujančių ląstelių proliferaciją, indukuoja specifines Treg ląsteles (Carosella et al., 2008). sHLA-G5 bei netirpių HLA-G indukuotų Treg ląstelių imunosupresinis poveikis realizuojamas per sekretuojamą IL-10 (Naji et al., 2007). Skiriamas HLA-G+ reguliacinių T ląstelių potipis, kuris fenotipiškai bei funkciškai skiriasi nuo kitų reguliacinių T ląstelių (šios ląstelės ekspresuoja paviršiuje HLA-G1 bei sekretuoja HLA-G5, tačiau neekspresuoja CD25 bei FOXP3). Šių reguliacinių T ląstelių padaugėja ūmaus bakterinio uždegimo židiniuose, o imunosupresinį poveikį jos realizuoja per paviršiuje ekspresuojamus bei sekretuojamus sHLA-G5 (Feger et al.,

2007), todėl sHLA-G5 koncentracijos pokyčiai kraujo serume galėtų būti vertinami kaip vieni iš ūmaus bakterinio uždegimo intensyvumo rodiklių.

3.3. Įgimto imuninio atsako ypatumai tarp pacientų su febriline neutropenija

Nors per pastaruosius dešimtmečius buvo padaryta ženkli pažanga aiškinantis įgimto imuninio atsako subtilybes, tačiau aiškus ir tikslus atsakymo kaip vystosi ūmus uždegiminis atsakas į bakterinę infekciją tarp pacientų su FN nėra iki šiol. Infekcinio proceso metu tarp pacientų su FN buvo stebimos žemesnės TNF- α bei IL-1 β citokinų koncentracijos kraujo serume lyginant su šių citokinų koncentracijomis tarp sveikų žmonių (Ishii et al., 1991; Herrmann et al., 1994). *In vitro* studijų metu tyrinėjant kraujo ląstelių kultūras buvo nustatyta, kad TNF- α bei IL-1 β citokinų sumažėjusi produkcija tarp pacientų su FN galėtų būti siejama su sumažėjusiu cirkuliuojančių leukocitų kiekiu (de Bont et al., 2000; Denecker et al., 1997; Takamatsu et al., 1993). Tačiau kitų uždegiminių citokinų (IL-6, IL-8) sekrecija ūmaus bakterinio uždegimo metu tarp šios grupės pacientų buvo ženkliai išreikšta (de Bont et al., 1999; Engervall et al., 1995; Phillips et al., 2012). Manoma, kad tarp pacientų su FN pagrindiniu IL-6, IL-8 šaltiniu infekcinio proceso metu tampa neimuninės kilmės (kraujagyslių endotelio) ląstelės, kurios kaip buvo minėta anksčiau yra aktyvuojamos mikroorganizmų ekspresuojamų PAMP per PRR (TLR, NLR) (Nijhuis et al., 2002). Todėl būtų galima daryti išvadą, kad šioje pacientų grupėje vienas iš pagrindinių ūmaus uždegimo mediatorių yra IL-6 bei IL-8 (Nijhuis et al., 2002).

3.4. Biožymenys

Biožymuo – tai fiziologinių ir patologinių procesų bei farmakologinio atsako į paskirtą gydymą objektyvi charakteristika, kuri gali būti egzistuojančiais metodais išmatuojama bei įvertinama ir kuri yra šių procesų indikatorius (Atkinson et al., 2001; Standage et al., 2011). Šalia klinikinio paciento įvertinimo, biožymenys teikia papildomą ir objektyvią informaciją apie ligos patogenezę, eigą, prognozę bei padeda parinkti tinkamą gydymą ir įvertinti gydymo efektyvumą (Marshall et al., 2009; Kaplan et al., 2011). Kasdieninėje praktikoje biožymens (žymens) sąvoka dažniausiai naudojama tam tikro laboratorinio tyrimo, atliekamo iš paciento kraujo, šlapimo ar kitų biologinių skysčių, įvardijimui. Skiriamos šios biožymenų grupės - diagnostiniai, skринinginiai (atrankiniai), monitoravimo (sekimo) ir stratifikaciniai (klasifikavimo) (Puntmann, 2009; Marshall et al., 2009). Diagnostinių biožymenų pagalba patvirtinama ar atmetama liga ar patologinė būseną kitų tyrimų bei atitinkamos klinikos kontekste (pavyzdžiui troponinų naudojimas miokardo infarkto diagnostikoje). Atrankiniai biožymenys yra diagnostinių biožymenų potipis ir jie taikomi tam tikros ligos ar patologinės būsenos buvimo galimybei įvertinti tam tikroje populiacijoje. Idealus atrankinis biožymuo privalo turėti aukštą jautrumą. Teigiamas atrankinio biožymens rezultatas turi būti tvirtinamas diagnostiniu biožymeniu, kuris savo ruožtu privalo turėti aukštą specifiškumą (jautrumo bei specifiškumo sąvokos bus aptariamos toliau tekste) (Standage et al., 2011; Marshall et al., 2009; Kaplan et al., 2011). Sekimo (monitoravimo) biožymenys naudojami paskirto gydymo efektyvo bei trukmės vertinimui, taikomo gydymui vaisto dozės titravimui. Tinkamas monitoravimui biožymuo turi būti funkciškai susijęs su taikomo gydymo veikimo mechanizmu (pavyzdžiui gliukozės kiekio monitoravimas prie gydymo insulinu) (Marshall et al., 2009; Kaplan et al., 2011). Stratifikaciniai (klasifikavimo) biožymenys taikomi ligos ar patologinės būsenos sunkumo laipsniui įvertinti bei pacientų klasifikavimui į aukštos (kuriems turėtų būti taikoma

agresyvesnė, toksiškesnė terapija) bei žemos (kuriems būtų taikoma standartinė terapija) rizikos pacientus (Kaplan et al., 2011). Pagrindiniai biožymens kaip objektyvios charakteristikos vertės bei efektyvumo matai yra jautrumas ir specifiškumas, kurie yra nekintami konkrečiam biožymeniui ir nepriklauso nuo ligos ar patologinės būsenos, kuriai vertinti jie naudojami, paplitimo populiacijoje. Jautrumas apibrėžia dalį tiriamųjų su liga ar patologine būseną, kuriems biožymuo yra teigiamas. Kitaip tariant, jautrumas apibrėžia biožymens tikimybę aptikti ligą sergančiame. Specifiškumas apibrėžia dalį tiriamųjų be ligos ar patologinės būsenos, kuriems biožymuo yra neigiamas arba kitais žodžiais tariant apibrėžia biožymens tikimybę atmesti ligą sveikame. Biožymenys, pasižymintis dideliu jautrumu, turi žemą klaidingai neigiamų rezultatų dažnį, todėl dažnai taikomi atrankiniuose tyrimuose, kai reikia atmesti ligą pacientams su neigiamu biožymens rezultatu. Tuo tarpu biožymenys, kuriems būdingas didelis specifiškumas, pasižymi žemu klaidingai teigiamų rezultatų dažniu ir yra naudojami ligų diagnostikoje, nes teigiamas biožymens rezultatas rodo didelę tikimybę, kad pacientas turi konkretų susirgimą (Marshall et al., 2009; Kaplan et al., 2011). Kaip jau buvo minėta, jautrumas bei specifiškumas apibrėžia konkretaus biožymens savybes. Tačiau kasdieninėje praktikoje gydytojams svarbu žinoti kaip interpretuoti konkretaus tyrimo rezultatą, t.y. ar teigiamas bei neigiamas biožymens rezultatas atspindi ligos ar patologinės būsenos buvimą ar nebuvimą, o tai yra tiesiogiai susiję su ligos ar patologinės būsenos paplitimu populiacijoje. Teigiama nusakomoji vertė (TNV) bei neigiama nusakomoji vertė (NNV) padeda interpretuoti gautus biožymens rezultatus ligos ar patologinės būsenos paplitimo populiacijoje kontekste (Marshall et al., 2009; Kaplan et al., 2011). TNV procentinė išraiška atspindi tą dalį pacientų, kuriems biožymens rezultatas yra teigiamas ir kurie turi vienokį ar kitokį sutrikimą, kai tuo tarpu NNV procentinė išraiška atspindi sveikų tiriamųjų dalį, biožymens vertei esant neigiamai (Marshall et al., 2009;

Kaplan et al., 2011). Didelis ligos ar patologinės būsenos paplitimas populiacijoje dažniausiai siejasi su ženklia TNV ir atvirkščiai – žemas paplitimas dažniausiai siejasi su žema TNV, bet aukšta NNV. TNV tampa reikšminga interpretuojant teigiamą biožymens reikšmę, o NNV – neigiamą reikšmę (Marshall et al., 2009; Kaplan et al., 2011).

3.5. Citokinių, jų tirpių receptorių bei kitų įgimtame imuniniame atsake dalyvaujančių biomolekulių pokyčiai tarp pacientų su febriline neutropenija

De Bont ir kt. (1999) nustatė, kad IL-6 ir IL-8 vertės koreliuoja tarpusavyje ir šie citokinai gali būti naudojami kaip riziką vertinantys biožymenys, identifikuojant žemos rizikos septicemijai grupę, kai tuo tarpu kitų autorių atliktų tyrimų duomenimis, IL-6 ir IL-8 koncentracijų nustatymas kraujo serume buvo naudingas vertinant stafilokokinės bakteriemijos, sepsio riziką (Persson et al., 2004) bei gram-neigiamą bakteriemiją (Lehrnbecher et al., 1999). Stryjewski ir kt. (2005) nustatė, kad PCT kartu su IL-8 gali būti naudojami kaip atrankiniai tyrimai sepsio vertinimui, kai ribinės vertės PCT > 0,5 ng/ml ir IL-8 > 20 pg/ml (jautrumas – 94%, specifiškumas – 90%). Soker ir kt. (2001) atlikto tyrimo duomenimis, IL-6, IL-8 bei sIL-2R gali būti naudingi infekcijos rizikos vertinimui tarp vaikų, sergančių onkohematologinėmis ligomis su FN, kai tuo tarpu TNF- α bei IL-1 β koncentracijų nustatymas nebuvo kliniškai reikšmingas. Santolaya su kolegomis (2008) atliko klinikinę studiją, kurioje metu vertino potencialius sepsio prognostinius požymius pirmas 24 hospitalizacijos valandas, pacientams su onkohematologinėmis ligomis febrilinės neutropenijos metu. Anot studijoje dalyvavusių tyrėjų, sepsio rizikos vertinimui galėtų būti naudojami CRB (\geq 90/100 mg/l) ir IL-8 (\geq 200/300 pg/ml). Nijhuis su kolegomis (2005) bakterinės infekcijos riziką FN epizodo pradžios metu

vertino klinikinio ištyrimo pagalba bei nustatant IL-8 koncentraciją kraujo serume (pasirinkta IL-8 ribinė vertė buvo 60 pg/ml). Šio vertinimo modelio jautrumas bei NNV buvo atitinkamai po 100%, tačiau specifiškumas ir TNV buvo ženkliai mažesni ir siekė atitinkamai 21% ir 13%. Wong su kolegomis (2008) atlikto tyrimo duomenimis, IL-8 buvo tinkamas sepsinio šoko riziką vertinantis biožymuo, kai ribinė šio žymens koncentracija - 220 pg/ml, tačiau tiriamąją populiaciją sudarė vaikai, nesergantys onkohematologinėmis ligomis. Fleischhack ir kt. (2000) nustatė, kad PCT (ribinė vertė – 0,5 ng/ml) lyginant su IL-6, IL-8, IL-2R ir CRB buvo jautriausias ir specifiškiausias žymuo vertinant aukštos rizikos (gram-neigiama bakteriemija) ir žemos rizikos epizodus FN metu, o Engel ir kolegų (1999) atlikto tyrimo duomenimis, IL-8 buvo labiau specifiškesnis ir jautresnis už PCT vertinant gram-neigiamą bakteriemiją. Diepold ir kolegų (2008) duomenimis, IL-6 koncentracijos nustatymas, IL-6 ribinei vertei esant 42 pg/ml (jautrumas 90%, specifiškumas 85%), gali būti naudojamas sepsio bei bakterinės infekcijos rizikos vertinime tarp pediatriinio profilio pacientų su FN, kai tuo tarpu kitų autorių duomenimis IL-6 bei kiti žymenys (IL-1, IL-1-RA, TNF- α) nebuvo reikšmingi vertinant bakteriemiją ar bakterinės kilmės infekciją (Riikonen et al., 1992; Schonbohn et al., 1995; Lehrnbecher et al., 2004). Kitanovski ir kolegos (2006) vertino PCT, CRB ir IL-6 koncentracijas kraujo serume bei nustatė, kad pirmomis FN epizodo dienomis, vertinant bakteriemiją ir klinikinį sepsį, PCT ir IL-6 biožymenys pasižymėjo didesniu jautrumu ir specifiškumu lyginant su CRB. Be to, buvo nustatyta, kad kasdienis PCT koncentracijos nustatymas buvo susijęs su diagnostiniu tikslumo didėjimu (AUC didėjo nuo 0,83 pirmą dieną iki 0,91 trečią FN epizodo dieną), kai tuo tarpu IL-6 koncentracijos nustatymas pirmą - trečią dienomis buvo susijęs su diagnostinio tikslumo neigiama dinamika (AUC mažėjo nuo 0,87 iki 0,79) (Kitanovsky et al., 2006). Sakr su kolegomis (2008) atliko mokslinės literatūros apžvalgą, kurioje vertino PCT, CRB ir IL-6

koncentracijų pokyčius bakteriemijos diagnostikos kontekste. Šioje apžvalgoje PCT, CRB, IL-6 diagnostinės vertės, jų jautrumas, specifiškumas bei TNV ir NNV svyravo gana plačiose ribose (PCT ribinės vertės svyravo 0,4-1,3 ng/ml ribose, jautrumas svyravo 33-87% ribose, specifiškumas – 61-92% ribose, TNV – 50-85% ribose, NNV – 19-92% ribose; CRB ribinės vertės svyravo 3,2-143 mg/l ribose, jautrumas svyravo 34,6-83% ribose, specifiškumas – 21,4-86,3% ribose, TNV – 12-63,2% ribose, NNV – 8,3-92% ribose; IL-6 ribinės vertės svyravo 71-297 pg/ml ribose, jautrumas svyravo 68-93,6% ribose, specifiškumas – 62-72% ribose, TNV – 41-50% ribose, NNV – 70-97,2% ribose). Philips su kolegomis (2012) pateiktoje straipsnių apžvalgoje analogiška tendencija stebima ir su IL-8, kai šis biožymuo buvo naudojamas bakteriemijos, sepsio ar bakterinės infekcijos vertinimui (ribinės vertės svyravo 30-500 ng/ml ribose, jautrumas svyravo 44-87% ribose, specifiškumas – 61-89% ribose).

Hatzistilianou su kolegomis (2010) tyrinėjo CRP, PCT, TNF- α , IL-1b, IL-8, sTNFRII kaip potencialius biožymenis vertinant bakterinę infekciją vaikų tarpe, kurie sirgo ūmia limfoblastine leukemija FN epizodų metu. Šių autorių duomenimis, PCT buvo jautresnis ir specifiškesnis už kitus biožymenis (taikant ribinę vertę 2 ng/ml, jautrumas buvo 94%, o specifiškumas – 96,5%) diferencijuojant bakterinę infekciją nuo virusinės pirmą FN epizodo dieną (Hatzistilianou et al., 2010), tuo tarpu Miedema ir kt. (2011) atliktų tyrimų duomenimis, IL-8 buvo jautresnis biožymuo (ribinė vertė – 60 pg/ml, jautrumas – 92%) už PCT (ribinė vertė – 0,25 ng/ml, jautrumas – 79%) ir CRB (ribinė vertė – 40 mg/l, jautrumas – 69%), diferencijuojant bakterinės kilmės infekciją nuo kitų karščiavimo priežasčių pirmą FN dieną.

2012 metais parašytuose straipsniuose nagrinėjama tema galima išvelgti tendenciją bakterinės infekcijos vertinimui naudoti ne vieną ar keletą, bet visą paletę biožymenių, taikant tyrimo metodus, kurių metu vienos analizės metu galima įvertinti visą grupę analizių. Tang ir

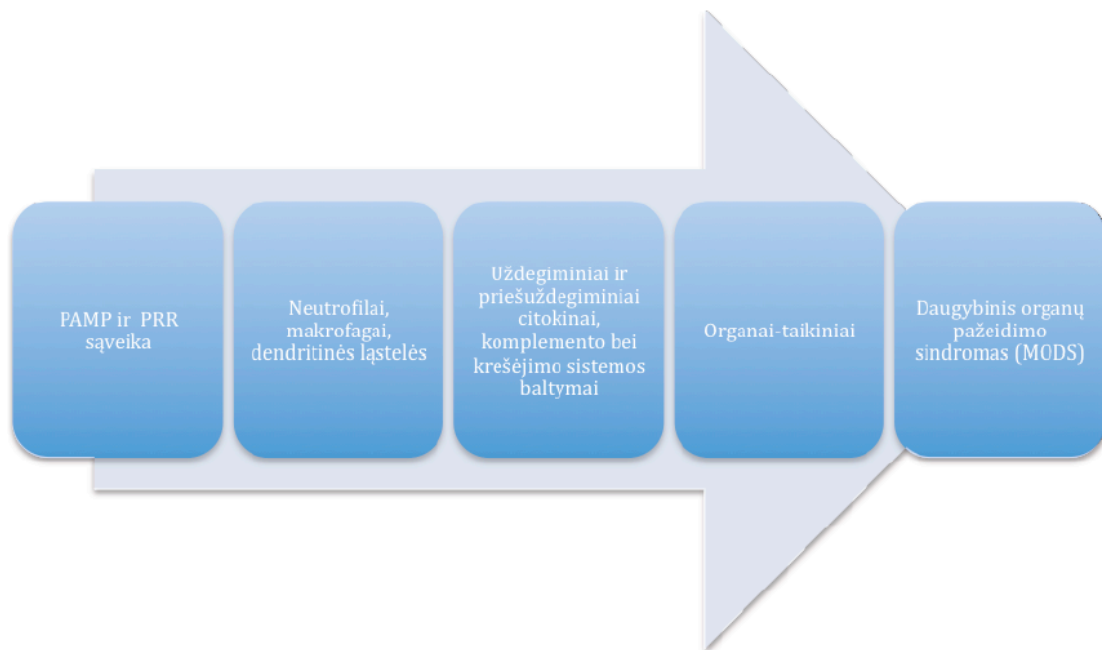
kolegos (2012) tyrinėjo citokinių (IL-4, IL-6, IL-10) bei gama-interferono koncentracijų skirtumus tarp dviejų grupių, kurias sudarė mikrobiologiškai patvirtinti gram-teigiami bei gram-neigiami bakteriemijos atvejai. Koncentracijų vertinimui buvo naudota tekmės citometrija. Autorių duomenimis, citokinių koncentracijų skirtumai tarp grupių buvo statistiškai reikšmingi ($p < 0,001$). Taikydami tą pačią tyrimo metodiką, Badurdeen su kolegomis tyrinėjo uždegiminių citokinių (IL-6, IL-8, IL-10, IL-12p70, TNF- α) ir Th1/Th2 citokinių (IL-2, IL-4, IL-5, gama-interferoną) taikymo galimybes mikrobiologiškai patvirtintos infekcijos indentifikavimui. Anot autorių, diferenciacija tarp tiriamųjų mikrobiologiškai teigiamos ir neigiamos grupių galima, kai IL-8 ribinė vertė yra > 300 pg/ml, IL-6 > 80 pg/ml, o IL-10 > 20 pg/ml. Mian ir kolegos (2012), naudodami Luminex analičių indentifikavimo sistemą, tyrinėjo citokinių (IL-1 α sIL-2R, IL-3, IL-6, IL-8, IL-10 bei TNF- α) ir PCT, kaip bakterinės infekcijos rizikos vertinimo biožymenų, taikymą klinikinėje praktikoje. Autorių duomenimis, PCT bei IL-6, IL-8, IL-10 gali būti taikomi bakterinės infekcijos rizikos vertinime FN epizodų metu, diferencijuojant pacientus į mažos bei aukštos rizikos grupes.

Atlikus mokslinės literatūros paiešką, buvo rasta tik keletas mokslinio pobūdžio straipsnių, kuriuose sIL-2R ir IL-10 buvo analizuojami kaip potencialūs bakterinės infekcijos biožymenys prasidėjus febrilinei neutropenijai. Spasova ir kt. (2005) nustatė, kad IL-10 biožymens koncentracija buvo aukštesnė gram-neigiamos bakteriemijos grupėje lyginant su nebakterieminiais epizodais ($p < 0,001$). Badurdeen ir kolegų (2012) atliktame tyrime buvo vertinami ne pavieniai biožymenys, o kompleksiskai naudojamų biožymenų (IL-6, IL-8, IL-10, CRB) vertė indentifikuojant mikrobiologiškai patvirtintus atvejus. Anot tyrėjų, atliekant šių biožymenų (IL-6, IL-8, IL-10, CRB) kaip nedalomos paletės koncentracijų nustatymus FN epizodo metu, įmanoma indentifikuoti bakterinę infekciją, o tiksliau ją atmesti, esant

neigiamiems šių tyrimų rezultatams (NNV – 96%). Vertindami sIL-2R kaip potencialų biožymenį bakterinės infekcijos indentifikavimui, Soker ir kiti (2001) nustatė, kad šis biožymuo naudingas bakterinės infekcijos nustatymui, kai tuo tarpu Fleischhack ir kolegų (2000) atliktų tyrimų duomenimis, PCT buvo tikslesnis už sIL-2R atliekant bakterinės infekcijos nustatymą.

3.6. Sepsis

Sepsis tai klinikinis sindromas, kuriam būdinga sisteminis uždegiminis atsakas, sukeltas bakterinės infekcijos. Sepsis dar vadinamas “citokinų audra”, nes šio sindromo metu stebima ženkliai išreikšta citokinų produkcija (Castellheim et al., 2009, Warren, 1997). Pagal Bone et al. (1996) sepsio patogenezėje galima išskirti dvi stadijas, t.y. ankstyvą arba uždegiminę, kuri pereina į vėlyvą arba priešuždegiminę. Sepsio ankstyvoje stadijoje stebima gausiai išreikšta uždegiminių citokinų sekrecija, kuri siejama su įgimtos imuninės sistemos aktyvacija (2 pav.). Citokinų (IL-1, IL-6, IL-8, TNF- α) bei kitų aktyvuotų baltymų (komplemento, krešėjimo sistemos) poveikis į audinių-taikinių ląsteles organizme gali sukelti dauginį organų pažeidimo sindromą (MODS), sepsinį šoką (Castellheim et al., 2009) (2 pav.).



2 pav. Sepsio patogenezė (V. Urbonas, 2012)

Sepsį organizme indukuoja bakterijų paviršiuje ekspresuojami bei išskiriami į aplinką PAMP, kurie sąveikaudami su PRR, esančiais imuninės (neutrofilų, makrofagų, dendritinių bei T ląstelių) bei neimuninės kilmės ląstelių paviršiuje, sukelia uždegiminių ir priešūždegiminių citokinų sintezę, krešėjimo bei komplemento baltymų aktyvaciją. Šie citokinai bei aktyvuoti baltymai, sąveikaudami su audinių-taikinių ląstelėmis (inkstais, kepenimis, kvėpavimo bei kraujotakos sistemos organais) gali sukelti MODS, sepsinį šoką.

Vėlyvoje sepsio stadijoje stebima imunosupresija, kurią indukuoja priešūždegiminiai citokinai (IL-10). Šios sepsio stadijos metu dažnai stebima sąlyginai patogeninės mikrofloros aktyvacija organizme. Viena iš šiuolaikinių koncepcijų, aiškinančių sepsio patogenezę, teigia, kad sepsis yra sutrikusio imuninio atsako į bakterinę infekciją išdava (uždegimą skatinančių ir uždegimą slopinančių imuninio atsako mechanizmų reguliacijos sutrikimas, kurį sąlygoja genetinis polinkis) (Wheeler et al., 2009).

Sepsis bei jo sukeltos komplikacijos išlieka pagrindine intensyviuose terapijos skyriuose gydomų ligonių mirties priežastimi (Marshall et al., 2005). Kaip jau buvo minėta, sepsis apibūdinamas kaip sisteminis uždegiminis atsakas į infekciją, tačiau vis dar nėra auksinio diagnostikos standarto šios patologinės būsenos ankstyvai diagnostikai.

Bakteriemiija nustatoma tik 30% pacientų, sergančių sepsiu (Bates et al., 1997), o ankstyvieji klinikiniai simptomai tokie kaip tachikardija, karščiavimas, leukocitozė ar leukopenija yra būdingi ne tik sepsiui, bet ir kitiems sindromams (sisteminio uždegiminio atsako sindromui) bei ligoms (Wacker et al., 2013). Uždelsta sepsio diagnostika didina mirštamumą, ilgėja ligonio buvimas ligoninėje bei su tuo susijusios išlaidos (Garnacho-Montero et al., 2008), todėl yra labai svarbu turėti kasdienėje klinikinėje praktikoje ankstyvus ir patikimus biožymenis sepsio nustatymui (Wacker et al., 2013).

Įvairūs biožymenys buvo tyrinėti ir vertinti sepsio diagnostikos kontekste. Simon su kolegomis (2004) atliktoje meta-analizėje lygino PCT ir CRB pokyčius bakterinės infekcijos metu ir nustatė, kad PCT yra informatyvesnis už CRB (Simon et al., 2004). Luzzani ir kolegų atliktos lyginamosios studijos duomenimis, PCT taip pat buvo tinkamesnis sepsio biožymuo nei CRB, be to, šios studijos metu buvo nustatyta PCT koncentracijos koreliacija su infekcijos sunkumu bei organų disfunkcija (Luzzani et al., 2003). Aikawa su kolegomis (2005) atliko tyrimą, kurio metu vertino PCT reikšmę sepsio diagnostikai. Mokslininkų išvadose teigiama, kad PCT koncentracijos pokyčiai yra specifiniai bakterinei infekcijai ir siūlo remiantis PCT koncentracijos pokyčiais priimti sprendimą dėl antibiotikų vartojimo tikslingumo (Aikawa et al., 2005). Uzzan su kolegomis (2006) atliko meta-analizę, kurioje vertino PCT bei CRB svarbą diagnozuojant sepsį kritinės būklės ligoniams (buvo vertintos 25 studijos, į kurias buvo įtraukta 2966 pacientai). Apibendrinus studijų rezultatus, PCT jautrumas svyravo nuo 42% iki 100%, o specifiškumas buvo nuo 48% iki 100%, kai tuo tarpu CRB jautrumas buvo 35 - 100%, o specifiškumas – 18 - 84%. Savo išvadose Uzzan su kolegomis teigė, kad PCT yra tinkamas diagnostinis biožymuo sepsio bei sepsinio šoko diagnostikai ir šis žymuo turėtų būti įtrauktas į sepsio diagnostinius algoritmus (Uzzan et al., 2006). Tang ir kolegų (2007) atliktoje meta-analizėje, kurioje buvo apžvelgta 18

mokslinių darbų, ir priešingai nei Uzzan su kolegomis atliktoje studijoje, teigiama, kad PCT diagnostinis tikslumas yra pakankamai žemas (suminis plotas po kreive siekė 0,78; jautrumas buvo 71%, specifiškumas – 71%) ir yra nepakankamas sepsio diagnostikai (Tang et al., 2007). Wacker su kolegomis atliko meta-analizę, kurioje vertino PCT informatyvumą sepsio diagnostikoje (buvo įvertintos 30 studijų, į kurias buvo įtraukta 3244 kritinės būklės pacientai). Bendras PCT jautrumas buvo 77%, o specifiškumas – 79% (ribinei PCT vertės medianai esant 1,1 ng/ml). Šių mokslininkų išvadose teigiama, kad PCT yra naudingas biožymuo, padedantis diagnozuoti sepsį tarp kritinės būklės pacientų, tačiau šio biožymens interpretacija turėtų būti derinama su paciento klinicine būkle, mikrobiologinio tyrimo rezultatais bei kitais instrumentiniais ir laboratoriniais tyrimais (Wacker et al., 2013). Kinijos mokslininkų grupė (2003) tyrė IL-6 ir PCT vertę diferencijuojant sepsį nuo neinfekcinės kilmės sisteminio uždegiminio atsako sindromo ir nustatė, kad šie biožymenys gali padėti diagnozuojant šias patologines būkles (Du et al., 2003). Liu su kolegomis (2005) atlikto tyrimo duomenimis, IL-6 ir PCT buvo statistiškai patikimi biožymenys diferencijuojant sepsį nuo neinfekcinės kilmės sisteminio uždegiminio atsako sindromo bei buvo stebima šių biožymenų koreliacija su ligos sunkumu (Liu et al., 2005). Gaini su kolegomis (2006) tyrė PCT, CRB ir IL-6 reikšmę sepsio diagnostikoje ir nustatė, kad CRB ir IL-6 pasižymėjo geresnėmis sepsio diagnostinėmis savybėmis nei PCT (Gaini et al., 2006). Kellum su kolegomis (2007) atliko multicentrinę studiją, į kurią buvo įtraukti 583 pacientai, turintys sepsį (šiems pacientams buvo konstatuotas plaučių uždegimas kartu su ūmiu sisteminio uždegiminio atsako sindromu). Šioje studijoje buvo vertinta citokinų (IL-6, IL-10, TNF- α) koncentracijos pokyčiai pirmą susirgimo savaitę. Autoriai nustatė, kad citokinų koncentracijos padidėjimas buvo stebimas 82% tirtų pacientų, didžiausios citokinų koncentracijos buvo susirgimo pradžioje (pirmą dieną) ir palaipsniui

mažėjo (2 – 4 dienos), o mirštamumas koreliavo su aukštomis IL-6 ir IL-10 koncentracijomis (Kellum et al., 2007).

3.7. Imunocheminė analizė, jos taikymas tirtų biožymenų nustatymui

Šiuolaikiniame moksle bei laboratorinėje diagnostikoje plačiai taikomi imunocheminės reakcijos pagrįsti detekcijos metodai. Imunocheminėje analizėje specifiniai monokloniniai antikūnai naudojami kaip reagentas norimo antigeno nustatymui arba reagentu gali būti specifinis antigenas, kai norime nustatyti specifinį antikūną (Thomas et al., 1998). Sąveikaujant multivalentiniam antigenui su bivalentiniu antikūnu formuojasi Ag-Ak (imuninis) kompleksas. Bipoliniai šios grįžtamosios sąveikos centrai, t.y. kintama Ak sritis (paratopas), sąveikauja su specifine Ag determinante (epitopu). Šios sąveikos didelį specifiškumą apsprendžia Ak ir Ag sąveikaujančių paviršių komplementarumas bei šių paviršių cheminės bei fizinės savybės (vandenilinių jungčių formavimasis, sąveika tarp skirtingo elektros krūvio jonų porų – taip vadinama Van der Waalo sąveika) (Thomas et al., 1998; Van Regenmortel, 1992). Ag ir Ak sąveikos kiekybinis ar kokybinis nustatymas galimas tik tada, kai šią sąveiką įmanoma vizualizuoti ar išmatuoti. Ag-Ak sąveikos vertinimo metodo pasirinkimą apsprendžia Ag savybės (dydis, kiekis, determinančių struktūra), Ak charakteristikos (avidškumas, specifiškumas) bei Ag koncentracija. Pagrindiniai metodai, kurie taikomi Ag-Ak sąveikos nustatymui yra tiesioginė detekcija bei detekcija, besiremianti Ag ar Ak žymėjimu – žymėtoji imunoanalizė (angl. *labeled immunoassay*) (Thomas et al., 1998). Taikant tiesioginės detekcijos metodą, nežinomos koncentracijos Ag kiekiui nustatyti naudama žinomos didelės koncentracijos specifinių Ak turintis reagentas. Esant Ak pertekliui tirpale, formuojasi tirpūs imuniniai kompleksai, kurie nustatomi turbidimetriškai (CRB

nustatymas). Turbidimetrijos metodas pagrįstas šviesos bangos sklaidimo intensyvumo sumažėjimo vertinimu dėl reakcijos metu susiformavusio precipitato, kurį sudaro ieškomos tiriamos medžiagos ir latekso dalelių, padengtų specifiniais monokloniniais antikūnais prieš tiriamą medžiagą junginys (Eda et al., 1998; Price et al., 1987; McPherson et al., 2007; Thomas et al., 1998). Vertinamas šviesos, sklindančios per precipitatą, intensyvumo pokytis. Absorbuotos šviesos kiekis tiesiogiai yra proporcingas tiriamos medžiagos koncentracijai; šis šviesos kiekio pokytis įvertinamas fotometro pagalba (McPherson et al., 2007; Eda et al., 1998; Price et al.).

Žymėtoji imunoanalizė priklausomai nuo žymeklio pobūdžio gali būti skirstoma į fermentinę (sHLA-G nustatymas), chemiliuminescentinę (interleukinų nustatymas) bei fluorescentinę (PCT nustatymas) (Thomas et al., 1998; Rongen 1994). Metodologiškai Ag nustatymas po Ag ir Ak sąveikos gali būti atliekamas skystoje terpėje (homogeninė analizė) ar heterogeninės analizės būdu, kai prisitvirtinęs prie kietos terpės Ak-Ag-žymėto Ak kompleksas (tam naudojamos plokštelės padengtos specifiniais Ak) atskiriamas nuo neprisitvirtinusių žymėtų Ak (pašalinami plovimų metu) (interleukinų, sHLA-G, PCT nustatymas) (Thomas et al., 1998; Jenkins, 1992).

4. PACIENTAI, TYRIMO MEDŽIAGA IR METODAI

Tiriamoji medžiaga surinkta 2009 – 2011 m. Vilniaus universiteto Vaikų ligoninės Onkohematologijos skyriuje. Į tyrimą buvo įtraukta 53 onkohematologinėmis ligomis sergantys vaikai su FN, kurie gydymo eigoje turėjo 82 karščiavimo epizodus. Tyrimai buvo atliekami Inovatyvios medicinos centre bei Vilniaus universiteto Vaikų ligoninės Laboratorinės diagnostikos skyriuje. Tyrimui atlikti gautas Lietuvos bioetikos komiteto leidimas Nr. 158200-12-130-35 (2009-12-02). Nuo pirmos karščiavimo dienos tris dienas iš eilės buvo imami kraujo

mėginiai bei nustatomos citokinų (IL-6, IL-8, IL-10), CRP, PCT ir sIL-2R koncentracijos. sHLA-G koncentracija buvo tirta tik pirmą karščiavimo dieną. Kraujo pasėliai aerobams, anaerobams, grybelinei kultūrai buvo imami pirmą karščiavimo parą prieš paskiriant antibakterinį gydymą.

4.1. Pacientų atranka, pradinis įvertinimas bei gydymas

Tyrime dalyvavo vaikai iki 18 metų sergantys onkohematologinėmis ligomis FN epizodo metu. Atvykus valandos laikotarpyje buvo įvertinama ir dokumentuojama vardas, pavardė, amžius, naviko tipas, bendra paciento būklė (atliekamas bendras klinikinis ištyrimas bei temperatūros matavimas, neurologinės būklės vertinimas) bei imami kraujo mėginiai bei mikrobiologiniai pasėliai prieš skiriant gydymą antibiotikais. Konstatavus FN būklę, pacientams buvo skiriamas pradinis gydymas plataus veikimo spektro antibiotikais (III kartos cefalosporiniais, beta laktaminiais – karbapenemų grupės, aminoglikozidais) arba jų deriniais bei papildomai skiriant priešgrybelinę terapiją flukonazoliu. FN epizodas buvo konstatuojamas, kai neutrofilų kiekis buvo stebimas $\leq 0,5 \times 10^9/l$ bei temperatūra pažastyje vienkartinio matavimo buvo $> 38,5^\circ\text{C}$. Pirmas dvi paras pacientų klinikinė būklė (gyvybinės funkcijos bei temperatūros pokyčiai) buvo vertinama kas 8 valandas, o nuo trečios paras tai buvo atliekama kartą dienoje iki paciento išrašymo iš ligoninės.

4.2. Tiriamųjų grupių apibūdinimas

Remiantis klinikinių bei mikrobiologinių tyrimų duomenimis, FN epizodai buvo suskirstyti į dvi grupes – neaiškios kilmės karščiavimo (NKK), į kurią buvo įtraukti pacientai be sepsio požymių, su neigiamais mikrobiologiniais pasėliais bei bakteriemijos ir sepsio (BS). BS grupę

sudarė pacientai su teigiamais mikrobiologiniais pasėliais ir (ar) kliniškai diagnozuotu sepsiu. Kadangi vertinami buvo FN epizodai, dalis pacientų su daugybiniais FN epizodais priklausomai nuo epizodo pobūdžio galėjo priklausyti ir vienai, ir kitai tiriamajai grupei.

4.3. Kraujo mėginių, skirtų biožymenų vertinimui, paėmimas ir laikymas

Kraujo mėginiai buvo imami pacientui atvykus, t.y. febrilinio epizodo pirmą, antrą ir trečią dienomis. Veninio kraujo mėginiams surinkti buvo naudojami 5 ml tūrio sterilūs polistireno cilindriniai mėgintuvėliai, skirti serumo mėginiams (Kima Company, Arzergrande, Italija). Praėjus pusei valandos, mėgintuvėliai su kraujo mėginiu buvo centrifuguojami 10 min prie 2000 g. Gautas supernatantas (serumas) buvo išpilstytas po 1 ml į Eppendorf tipo mėgintuvėlius ir nedelsiant užšaldytas $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ iki tyrimų atlikimo.

4.4. Biožymenų nustatymas

4.4.1. CRB nustatymas turbidimetrijos metodu

CRB nustatymui serume buvo naudota kompanijos F.Hoffmann-La Roche Ltd (Bazelis, Šveicarija) padalinio Roche Diagnostics įranga (analizatorius Cobas Integra 400 Plus) bei šios kompanijos tiekiami reagentai bei papildomos medžiagos. Tyrimas buvo atliekamas vadovaujantis gamintojo rekomendacijomis. Metodas standartizuotas pagal IFCC (angl. *International Federation of Clinical Chemistry*) referentinę medžiagą CRM 470 (RPPHS 91/0619), skirtą serumo baltymų vertinimo standartizacijai (Johnson, 1993).

Reagentai ir tiriamieji serumai prieš tyrimo atlikimą buvo laikomi kambario temperatūroje 25-30 min. Analizatorius Cobas Integra 400

Plus kalibruotas originaliais kalibratoriais atliekant 6 taškų kalibraciją, tyrimo kokybė kontroliuota originaliomis kontrolinėmis medžiagomis (Precinorm Protein ir Precipath Protein, kurių koncentracijos buvo 5 mg/l ir 86 mg/l). Į atskiras mikrokjuvetes buvo pipetuojama po 2,5 µl tiriamo serumo, 82 µl TRIS stabilizuojančio buferio, 28 µl mikrolatekso dalelių, padengtų specifiniais pelės monokloniniais antikūnais prieš CRB bei 92 µl NaCl izotoninio tirpalo (bendras tiriamo tirpalo kiekis buvo 204,5 µl). Mikrokjuvetės inkubuotos 7 min 37°C tamsoje. Absorbuotos šviesos pokytis (sklindančios šviesos intensyvumas matuotas po 1 min.) įvertintas instaliuoto fotometro pagalba naudojant 552 nm filtrą. Analizatoriuje esančios programinės įrangos pagalba absorbuotos šviesos pokytis perskaičiuotas į CRB koncentracijas, išreikštas mg/l ar nmol/l. CRB analitinis jautrumas (apatinė detekcijos riba) siekė 1 mg/l ar 9,52 nmol/l.

4.4.2. sHLA-G nustatymas imunofermentinės analizės (ELISA) metodu

sHLA-G nustatymui buvo naudotas kompanijos BioVendor Laboratory Medicine, Inc. (Brno, Čekija) diagnostinis rinkinys su specifiniais IgG1 klasės antikūnais prieš tirpią sHLA-G5 molekulę bei asocijuotą baltymą β2-mikroglobuliną, pagamintais kompanijos Exbio Praha a.s. (Praha, Čekija). Tyrimas buvo atliekamas vadovaujantis gamintojo pateiktomis rekomendacijomis. Reagentai ir tiriamieji serumai prieš tyrimo atlikimą buvo laikomi kambario temperatūroje 25-30 min.

Į plokštelę, padengtą monokloniniais antikūnais prieš sHLA-G5, buvo pipetuojama po 50 µl skiedimo buferio ir skirtingų koncentracijų standarto (3,125 V/ml; 6,25 V/ml; 12,5 V/ml; 25 V/ml; 50 V/ml; 100 V/ml; 200 V/ml; 1000 V/ml) bei po 50 µl skiedimo buferio ir tiriamojo serumo. Plokštelė buvo dedama ant purtyklės (taikant kratymo dažnį 300 rpm) ir

inkubuojama vieną valandą kambario temperatūroje. Po to buvo atliekamas plovimo ciklas (trys praplovimai naudojant plovimui skirtą tirpalą). Po plovimo ciklo, buvo pipetuojama po 100 µl konjugato, kurį sudarė monokloniniai pelės IgG1 klasės antikūnai prieš sHLA-G5 bei asocijuotą baltymą β2-mikroglobuliną, žymėti fermentu peroksidaze. Plokštelė buvo dedama ant purtyklės (taikant kratymo/apsisukimo dažnį 300 rpm) ir inkubuojama vieną valandą kambario temperatūroje. Po to buvo kartojamas plovimo ciklas. Po plovimo ciklo, buvo pipetuojama po 100 µl substrato, kurį sudarė 3,3',5,5'-tetrametilbenzidino (TMB) tirpalas. Plokštelė buvo inkubuojama 10 min. kambario temperatūroje tamsoje. Po to buvo pipetuojama po 100 µl stop tirpalo, kurį sudarė 0,2M H₂SO₄. Spalvos pokytis buvo vertinimas BEP 2000 Advance analizatoriumi (Siemens Healthcare, JAV), naudojant 450 nm filtrą. Analičių koncentracijos (V/ml) buvo paskaičiuotos naudojant BEP 2000 Advance analizatoriaus programinę įrangą naudojant kalibracijos kreivę, kurioje Y ašyje buvo atidedami standartinių tirpalų spalvos pokyčiai (absorbancija), o X ašyje – žinomos standartinių tirpalų koncentracijos, išreikštos V/ml. sHLA-G detekcijos analitinis jautrumas (apatinė detekcijos riba) buvo 2 V/ml.

4.4.3. Interleukinų bei tirpių receptorių nustatymas chemiluminescentinės heterogeninės imunoanalizės metodu

4.4.3.1. sIL-2R nustatymas

sIL-2R nustatymui serume buvo naudotas analizatorius Immulite (Siemens Healthcare Diagnostics, JAV) bei šios kompanijos tiekiami reagentai bei papildomos medžiagos. Tyrimas buvo atliekamas vadovaujantis gamintojo rekomendacijomis.

Reagentai ir tiriamieji serumai prieš tyrimo atlikimą buvo laikomi kambario temperatūroje 25-30 min. Analizatorius Immulite kalibruotas originaliais kalibratoriais atliekant 4 taškų kalibraciją, tyrimo kokybė kontroliuota originaliomis dviejų lygių kontrolinėmis medžiagomis Immulite Cytokine Control Module LKIP (koncentracijos buvo 579 V/ml ir 2063 V/ml). Į atskiras specialias polistireno mikrokiuvetes, padengtas monokloniniais pelės antikūnais prieš sIL-2R buvo pipetuojama po 50 μ L tiriamo serumo bei šarminė fosfataze (SF) žymėtų triušio polikloninių antikūnų prieš sIL-2R. Mikrokiuvetės inkubuotos 30 min 37°C tamsoje. Po to mikrokiuvetės su prie sienelių adsorbuotais anti-sIL-2R – sIL-2R – anti-sIL-2R-SF konglomeratais buvo 3 minutes cetrifuguojamos analizatoriuje instaliuota mikrocentrifuga (centrifugos apsisukimų dažnis – 5000 rpm) tam, kad būtų pašalintas serumas su neprisijungusiais SF žymėtais triušio polikloniniais antikūnais prieš sIL-2R. Po centrifugavimo ciklo, į atitinkamas mikrokiuvetes buvo pipetuojama po 25 μ L chemiliuminescentinio substrato ir mikrokiuvetės inkubuotos 5 min 37°C tamsoje. Chemiliuminescentinio substrato sudėtyje esančio adamantil-dioksetano fosfato esteriai buvo hidrolizuojami mikrokiuvetėje esančios šarminės fosfatazės ir šios cheminės reakcijos metu susidaręs šviesos fotonų srautas, kuris tiesiogiai proporcingas sIL-2R koncentracijai tiriamajame serume, buvo vertinamas analizatoriuje instaliuotu fotometru. Susidariusių šviesos fotonų srautas buvo vertinamas inkubacijos pabaigoje. Vadovaujantis kalibracijos duomenimis, Immulite programinė įranga šviesos srauto signalus perskaičiavo į sIL-2R koncentraciją, išreikštą V/ml. sIL-2R detekcijos analitinis jautrumas (apatinė detekcijos riba) buvo 5 V/ml.

4.4.3.2. IL-6 nustatymas

IL-6 nustatymui serume buvo naudotas analizatorius Immulite (Siemens Healthcare Diagnostics, JAV) bei šios kompanijos tiekiami reagentai bei papildomos medžiagos. Tyrimas buvo atliekamas vadovaujantis gamintojo rekomendacijomis.

Analizatorius Immulite kalibruotas originaliais kalibratoriais atliekant 4 taškų kalibraciją, tyrimo kokybė kontroliuota originaliomis dviejų lygių kontrolinėmis medžiagomis Immulite Cytokine Control Module LK6P (koncentracijos buvo 82 pg/ml ir 414 pg/ml). IL-6 koncentracijos nustatymo eiga buvo analogiška sIL-2R koncentracijos nustatymui, tik tyrimui buvo naudota po 100 μ L tiriamo serumo ir inkubacijos trukmė buvo 60 min 37°C tamsoje, o po centrifugavimo ciklo, į atitinkamas mikrokuivetes buvo pipetuojama po 50 μ L chemiliuminescentinio substrato ir mikrokuivetės inkubuotos 5 min 37°C tamsoje. IL-6 detekcijos analitinis jautrumas (apatinė detekcijos riba) buvo 2 pg/ml.

4.4.3.3. IL-8 nustatymas

IL-8 nustatymui serume buvo naudotas analizatorius Immulite (Siemens Healthcare Diagnostics, JAV) bei šios kompanijos tiekiami reagentai bei papildomos medžiagos. Tyrimas buvo atliekamas vadovaujantis gamintojo rekomendacijomis.

Analizatorius Immulite kalibruotas originaliais kalibratoriais atliekant 4 taškų kalibraciją, tyrimo kokybė kontroliuota originaliomis dviejų lygių kontrolinėmis medžiagomis Immulite Cytokine Control Module LK8P (koncentracijos buvo 100 pg/ml ir 507 pg/ml). IL-8 koncentracijos nustatymo eiga buvo analogiška sIL-2R koncentracijos

nustatymui. IL-8 detekcijos analitinis jautrumas (apatinė detekcijos riba) buvo 2 pg/ml.

4.4.3.4. IL-10 nustatymas

IL-10 nustatymui serume buvo naudotas analizatorius Immulite (Siemens Healthcare Diagnostics, JAV) bei šios kompanijos tiekiami reagentai bei papildomos medžiagos. Tyrimas buvo atliekamas vadovaujantis gamintojo rekomendacijomis.

Analizatorius Immulite kalibruotas originaliais kalibratoriais atliekant 4 taškų kalibraciją, tyrimo kokybę kontroliuota originaliomis dviejų lygių kontrolinėmis medžiagomis Immulite Cytokine Control Module LK10P (koncentracijos buvo 50 pg/ml ir 380 pg/ml). IL-10 koncentracijos nustatymo eiga buvo analogiška IL-6 koncentracijos nustatymui. IL-10 detekcijos analitinis jautrumas (apatinė detekcijos riba) buvo 1 pg/ml.

4.4.4. PCT nustatymas fluorescentinės heterogeninės imunoanalizės metodu

PCT nustatymui tiriamųjų serume buvo naudotas Vidas analizatorius (BioMerieux Clinical Diagnostics, Marcy l'Etoile, Prancūzija) bei šios kompanijos tiekiami reagentai bei papildomos medžiagos. PCT nustatymas buvo atliekamas vadovaujantis gamintojo rekomendacijomis.

Reagentai ir tiriamieji serumai prieš tyrimo atlikimą buvo laikomi kambario temperatūroje 25-30 min. Analizatorius kalibruotas originaliais liofilizuotais kalibratoriais S1 ir S2, kurie prieš atliekant instrumento kalibraciją buvo tirpinami distiliuotame vandenyje (po 2 ml kiekvienam kalibratoriui). Tyrimo kokybę kontroliuota originaliomis dviejų lygių liofilizuotomis kontrolinėmis medžiagomis (PCT Controls, kurių

koncentracijos buvo 10 ng/ml ir 150 ng/ml), kurios prieš vartojimą buvo tirpinamos distiliuotame vandenyje (naudota po 2 ml distiliuoto vandens kiekvienai kontrolinei medžiagai).

Į atskiras originalias kiuvetes, padengtas pelės monokloniniais antikūnais prieš žmogaus PCT ir žymėtus SF buvo pipetuojama po 200 µl tiriamo serumo. Kiuvetės inkubuotos 20 min 37°C. Po inkubacijos, buvo atliekamas plovimo ciklas, kurio metu pašalintas serumas. Po plovimo ciklo, į atitinkamas kiuvetes buvo pipetuojama po 100 µl substrato (4-metil-umbeliferil-fosfato) ir mikrokiuvetės inkubuotos 5 min 37°C tamsoje. Šarminės fosfatazės poveikyje, substratas buvo hidrolizuojamas į fluorescentinėmis savybėmis pasižyminčią medžiagą 4-metil-umbeliferoną, kurios fluorescencija buvo matuojama fotometru, naudojant 450 nm filtrą. Fluorescencijos intensyvumas buvo tiesiogiai proporcingas PCT koncentracijai tiriamuose serumuose. Pagal kalibracijos rezultatus, analizatoriuje instaliuota programinė įranga fluorescencijos intensyvumą perskaičiavo į ng/ml. PCT nustatymo analitinis jautrumas buvo 0,05 ng/ml.

4.5. Kraujo pasėlių paėmimas ir vertinimas

Kraujo mėginiai pasėliams buvo imami pacientui atvykus, t.y. febrilinio epizodo pirmą dieną. Iš pradžių buvo imami mėginiai pasėliams, po to mėginiai biožymenų nustatymui. Vaikams iki 10 metų amžiaus buvo naudojami One BACTEC Peds Plus/F mėgintuvėliai-terpės (5 ml talpos), vyresniems - One BACTEC Peds Plus Aerobic/F ir One BACTEC Peds Plus Anaerobic/F (10 ml talpos) mėgintuvėliai-terpės (žiūr. 1 lentelę).

1 lentelė. Kraujo pasėliams naudoti mėgintuvėliai - terpės

Amžius, metai	Paėmimo vieta Nr.1 naudoti mėgintuvėliai	Paėmimo vieta Nr.2 naudoti mėgintuvėliai	Mėginio kiekis
<10	One BACTEC Peds Plus/F	One BACTEC Peds Plus/F	6–10 ml
≥10	One BACTEC Peds Plus Aerobic/F ir One BACTEC Peds Plus Anaerobic/F	One BACTEC Peds Plus Aerobic/F ir One BACTEC Peds Plus Anaerobic/F	20–30 ml

Auksčiau paminėti BACTEC tipo pediatriniai, aerobiniai ir anaerobiniai mėgintuvėliai su paimtu krauju buvo dedami į Bactec 9240 prietaisą (Becton Dickinson, JAV) tolimesnei inkubacijai bei tyrimui. Mikroorganizmų dauginimasis susijęs su CO₂ koncentracijos didėjimu, kuris savo ruožtu aktyvavo fluorescentinėmis savybėmis pasižyminčią medžiagą natrio polianetolsulfonata, esančią šiuose mėgintuvėliuose. Bactec 9240 prietaise esantis fotometras 10 min intervalu fiksavo fluorescencijos pokyčius mėgintuvėliuose, kurie buvo proporcingi CO₂ koncentracijai bei besidauginančių bakterijų kiekiui. Kraujo pasėliai Bactec 9240 prietaise buvo inkubuojami tris paras, neatsiradus bakterijų augimo požymių per šį laikotarpį, mėginys buvo traktuojamas kaip neigiamas. Mikroorganizmo rūšies indentifikavimui teigiami BACTEC pasėliai buvo tiriami toliau atliekant morfologinį ištyrimą (dažant Gramo būdu ir mikroskopuojant), sėjant į atitinkamas aerobines ar anaerobines terpes bei atliekant biocheminius tyrimus.

Vienokių ar kitokių mikroorganizmų augimas kraujo bakteriologiniuose pasėliuose buvo traktuojamas kaip bakteriemija (koaguliazėi neigiamų *Staphylococcus* rūšies bakteriemijos patvirtinimui, augimas turėjo būti stebimas dviejuose skirtinguose

pasėliuose, paimtuose iš skirtingų vietų; kitu atveju tai buvo traktuojama kaip pasėlio užteršimas).

Sepsis buvo vertinamas remiantis tarptautinėmis sepsio diagnostikos gairėmis (Goldstein et al., 2005) ir buvo diagnozuojamas, kai temperatūra buvo didesnė kaip 38,5°C, stebima tachikardija (daugiau kaip 110 ar 180 kartų per minutę – priklausomai nuo amžiaus), padažnėjęs kvėpavimo dažnis (daugiau kaip 18 ar 50 kartų per minutę – priklausomai nuo amžiaus), patvirtintas (mikrobiologinio pasėlio pagalba) ar įtariamas infekcinis procesas (plaučių uždegimas, petechiniai ar kitokio pobūdžio bėrimai), stebima vieno ar kelių organų disfunkcija.

4.6. Rezultatų vertinime naudoti statistiniai metodai

Tirtos imties kiekybinių kintamųjų (biožymenų) charakteristikos buvo skaičiuojamos naudojant viduriniąją variacinės eilutės reikšmę (mediana). Nominalieji kintamieji buvo pateikiami absoliučiais skaičiais ar procentine išraiška. Palyginimas tarp skirtingų tiriamųjų grupių (imčių) buvo atliekamas taikant Mann-Whitney neparametrinį statistinį kriterijų. Tos pačios tiriamosios grupės biožymenų pokyčiai pirmomis FN epizodo dienomis buvo analizuojami taikant vienfaktorinę dispersinę analizę (angl. *one-way ANOVA*). Jei ANOVA metodu atliktas vertinimas buvo statistiškai reikšmingas, toliau grupės buvo analizuojamos taikant *Post Hoc* Bonferroni analizę. Diagnostinės, atrankinės biožymenų ypatybės buvo vertinamos naudojant ROC kreivių metodą (Hanley et al., 1983). ROC kreivių metodo pagalba buvo apskaičiuotas plotas po kreive (AUC), kuris parodo tiriamo biožymens tikslumą (angl. *accuracy*). Biožymens tikslumas buvo vertinamas pagal AUC skaitinę vertę (kuo AUC artimesnis vienetui, tuo biožymuo tikslesnis, esant reikšmei 0,5 ir mažiau, biožymuo nepasižymi diagnostinėmis, atrankinėmis bei monitoringo savybėmis) (Zweig et al., 1993). Taip pat taikant ROC

kreivių metodą buvo apskaičiuotas biožymenų jautrumas, specifiškumas, NNV, TNV. Binarinė logistinė regresinė analizė taikyta vertinant, kaip priklausomi kintamieji (kliniškai ar bakteriologiškai patvirtinta bakteriemija - sepsis) koreliuoja su nepriklausomais kiekybiniais kintamaisiais (biožymenų skaitinėmis vertėmis). Gauti regresinių modelių rezultatai buvo tarpusavyje lyginami naudojant ROC kreives. Statistinis ryšys tarp kintamųjų bei koreliacijos stiprumas buvo vertinamas naudojant *Spearman* tiesinės koreliacijos koeficientą (r_s). Tikrinant statistines hipotezes buvo pasirinktas reikšmingumo lygmuo 0,05 (Kasiulevičius et al., 2008; Peat et al., 2005). Statistinė analizė atlikta naudojant statistinių programų paketus MedCalc (versija 11.4.2.0, Mariakerke, Belgija) ir SPSS (versija 15.0.1, SPSS Inc., Čikaga, JAV). Statistinė analizė atlikta vadovaujantis Lovell rekomendacijomis, skirtomis biožymenų statistinei analizei (Lovell, 2012). Remiantis SPOG bei kitomis atliktomis studijomis (Agyeman et al., 2011; Santolaya et al., 2007; Santolaya et al., 2002), statistinis rezultatų interpretavimas buvo taikomas vertinant febrilinės neutropenijos epizodus, o ne atskirus individus. Diagnostinės, atrankinės biožymenų savybės buvo vertinamos pirmą – antrą FN epizodo dienomis, monitoravimo biožymenų savybės buvo vertinamos pirmą – trečią FN epizodo dienomis. Biožymenų vertinimas buvo atliekamas vadovaujantis STARD (angl. *Standards for Reporting of Diagnostic Accuracy*) rekomendacijomis (Bossuyt et al., 2003).

5. REZULTATAI

5.1. Demografiniai duomenys, tiriamųjų grupių ypatybės

2009 – 2011 metais vykdyto tyrimo metu buvo iširta 53 onkohematologinėmis ligomis sergantys ligoniai su FN, kurie gydymo eigoje turėjo 82 karščiavimo epizodus. 10 tirtų pacientų mirė. 18 pacientų turėjo daugiau nei vieną FN epizodą (po 2 epizodus turėjo vienuolika pacientų, po 3 – keturi pacientai, po 4 – vienas pacientas, po 5 – vienas pacientas, po 6 – vienas pacientas). Pacientų amžius svyravo nuo 1 iki 17 metų (mediana – 6 metai), tyrime dalyvavo 23 moteriškos lyties ir 30 vyriškos lyties pacientų.

2 lentelė. Tiriamosios imties bendra charakteristika

	BS grupė	NKK grupė
Lytis:		
moteriška	8	18
vyriška	14	19
Amžius, metai:		
mediana (ribos)	6 (2-17)	6 (1-17)
Hematologiniai navikai:		
ULL	17	20
UML	2	3
limfomos	1	1
Solidiniai navikai:		
osteosarkoma	1	2
meduloblastoma	-	1
nefroblastoma	-	2
neuroblastoma	1	1
Ewing sarkoma	-	2
MAS	-	3
KC aplazija	-	2
Viso FN epizodų	29 (35%)	53 (65%)
Karščiavimo trukmė, dd:		
mediana (ribos)	2 (1-18)	2 (1-11)

5.2. Bakteriemijos ir sepsio grupės ypatybės mikrobiologiniu požiūriu

BS tiriamųjų grupę sudarė 22 pacientai (8 moteriškos lyties bei 14 vyriškos lyties), kurie tiriamojo periodo metu turėjo 29 karščiavimo epizodus (du pacientai turėjo po 2 karščiavimo epizodus, vienas – turėjo 3 epizodus ir vienas – 4). Teigiami mikrobiologiniai pasėliai buvo nustatyti 23 FN epizodų metu, sepsis – 6 FN epizodų metu. Gram-neigiami mikroorganizmai buvo nustatyti 12 FN epizodų metu, vyraujant *Escherichia coli* sukeltai infekcijai (*Escherichia coli* nustatyta 6 epizodų metu, *Klebsiella pneumoniae* – 2 epizodų metu, *Enterobacter asburiae* – 1 epizodo, *Klebsiella oxytoca* – 1, *Bacteroides urealyticus* – 1 ir

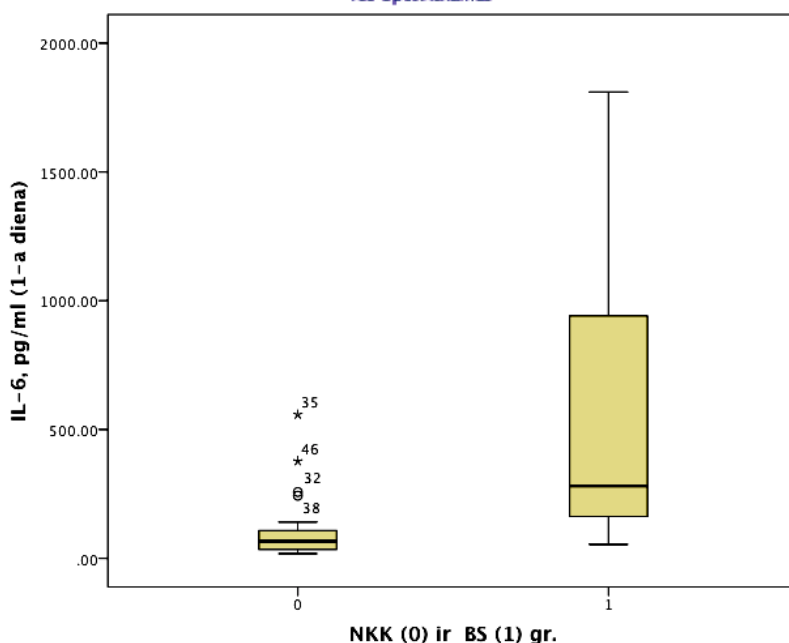
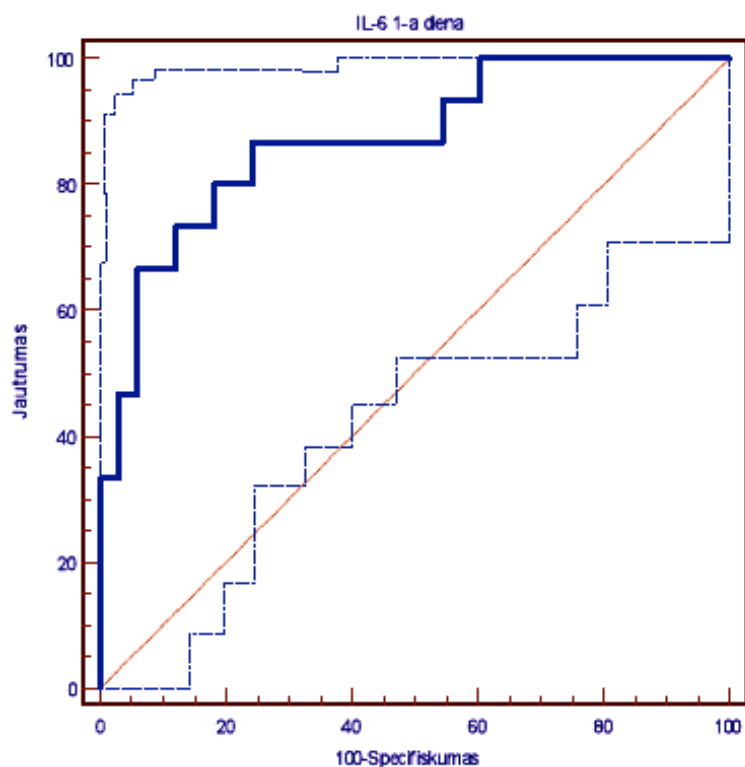
Pseudomonas aeruginosa – 1 epizodo metu). Gram-teigiami mikroorganizmai buvo mikrobiologiškai nustatyti 8 FN epizodų metu, vyraujant stafilokokinei mikroflorai (*Staphylococcus epidermidis* nustatytas 5 epizodų metu, tačiau vienas atvejis traktuotas kaip mikrobiologinės terpės užkrėtimas, *Staphylococcus hominis* – 2 atvejų metu, *Staphylococcus haemolyticus* – 1 ir *Staphylococcus aureus* – 1 atvejo metu). Keletas mikroorganizmų viename pasėlyje buvo indentifikuoti 3 FN epizodų metu. Dviem atvejais buvo nustatyta mišri mikroflora (*Escherichia coli* ir *Bacillus cereus*, *Klebsiella pneumoniae* ir *Staphylococcus haemolyticus*), vieno atvejo metu buvo indentifikuoti du gram-neigiami mikroorganizmai (*Aeromonas hydrophila* ir *Pseudomonas putida*).

5.3. Pacientų, priklausančių skirtingoms tiriamoms grupėms, biožymenų tikslumas febrilinės neutropenijos epizodų metu

Biožymenų tikslumas (angl. *accuracy*) buvo vertinamas taikant ROC kreivių metodą ir apskaičiuojant plotą po kreive (AUC) bei tiriamų analizių jautrumą, specifiškumą, NNV bei TNV.

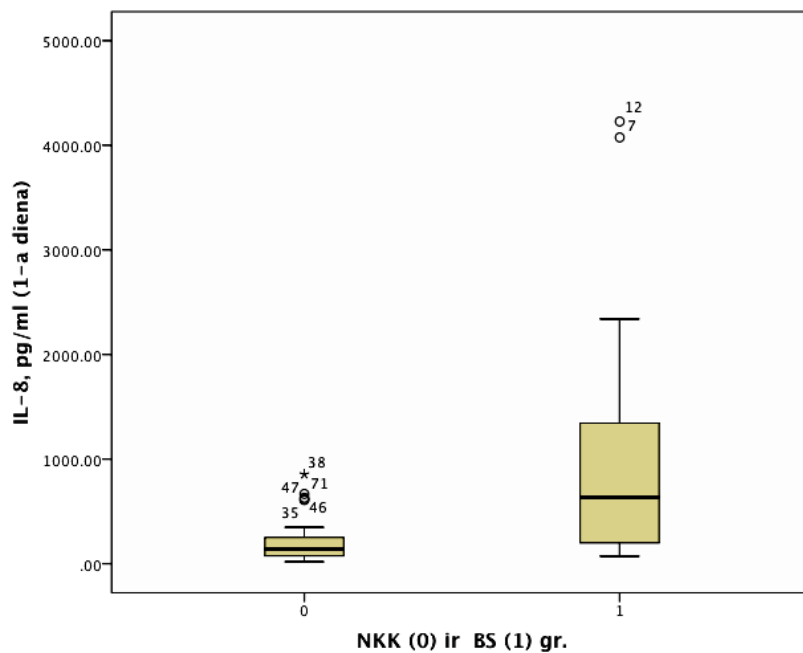
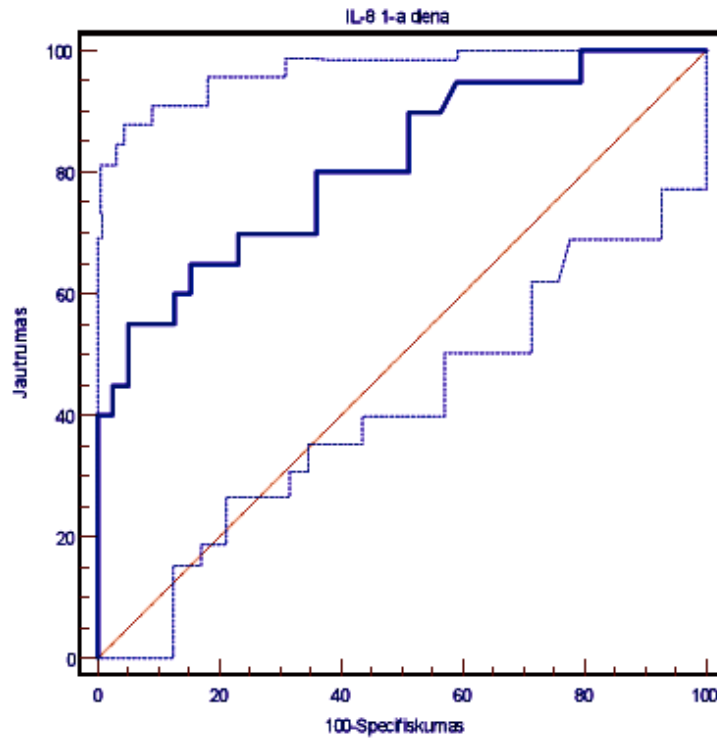
Pirmos dienos biožymenų skaitinių verčių (IL-6, IL-8, IL-10, sIL-2R, CRB, PCR, sHLA-G) grafinė analizė pateikiama 3-9 paveiksluose; biožymenų jautrumas, specifiškumas, NNV, TNV – 3 lentelėje.

Daugumos pirmą FN epizodo dieną tyrinėtų biožymenų tikslumas svyravo 0,72-0,87 ribose (AUC=0,72-0,87). Citokinų IL-6, IL-8 ir IL-10 gebėjimas diferencijuoti NKK ir BS grupes pirmą dieną buvo didesnis už 0,80 (AUC_{IL-6}=0,87; AUC_{IL-8}=0,81; AUC_{IL-10}=0,82), o CRB siekė tik 0,60 (AUC_{CRB}=0,60) ir nebuvo statistiškai reikšmingas (P=0,1229). Kitų tirtų biožymenų tikslumas buvo mažesnis už 0,80 ir siekė 0,72-0,79 (AUC_{sHLA-G}=0,72; AUC_{sIL-2R}=0,74; AUC_{PCT}=0,79) (3 - 9 pav.).



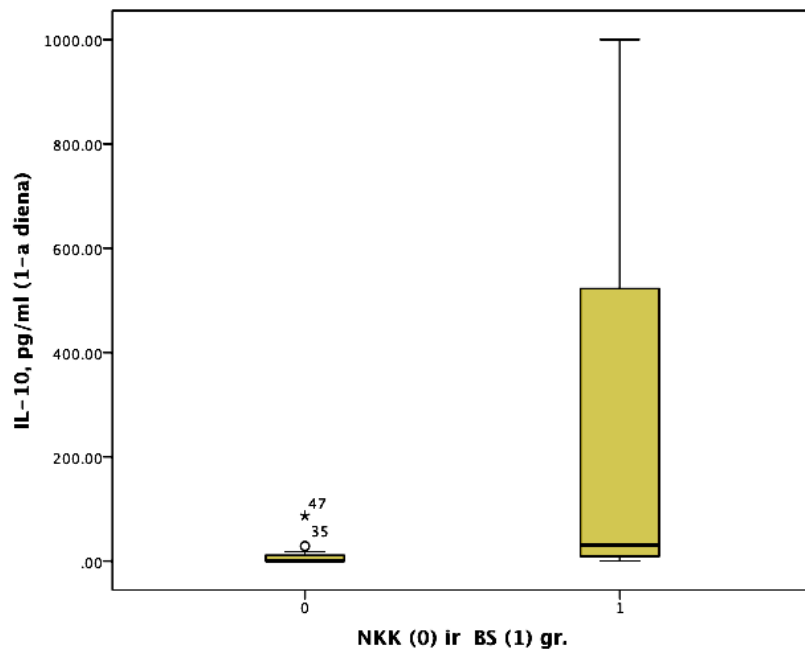
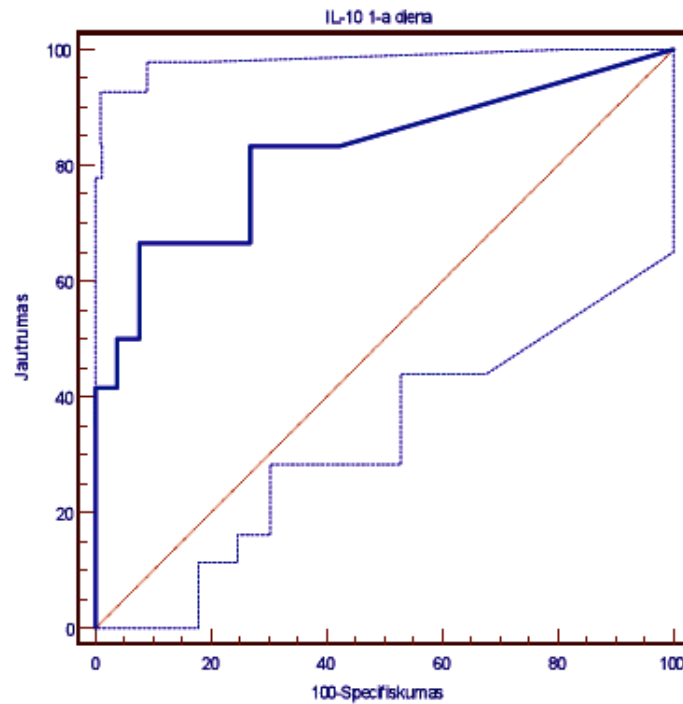
3 pav. IL-6 tikslumas bei šio biožymens skaitinės vertės NKK ir BS grupėse.

Paveikslo viršutinėje dalyje pateikta IL-6 ROC kreivė (ryškiai mėlyna, punktyrinės mėlynos linijos žymi 95% CI), kurios AUC=0,87, $P<0,0001$ (įstriža oranžinė linija žymi 0,5 ribą). Apatinėje šio paveikslo dalyje pateiktas IL-6 reikšmių (mažiausios reikšmės, apatinės kvartilės, medianos, viršutinės kvartilės, didžiausios reikšmės) svyravimai tarp analizuojamų NKK ir BS grupių (žvaigždutėmis, apskritimais pažymėtos reikšmės, kurių skaitinės vertės buvo didesnės už didžiausią reikšmę dydžiu, ne mažesniu kaip interkvartilės intervalo skaitinė vertė x 1,5; skaičiai šalia – atitinkamus FN epizodus).



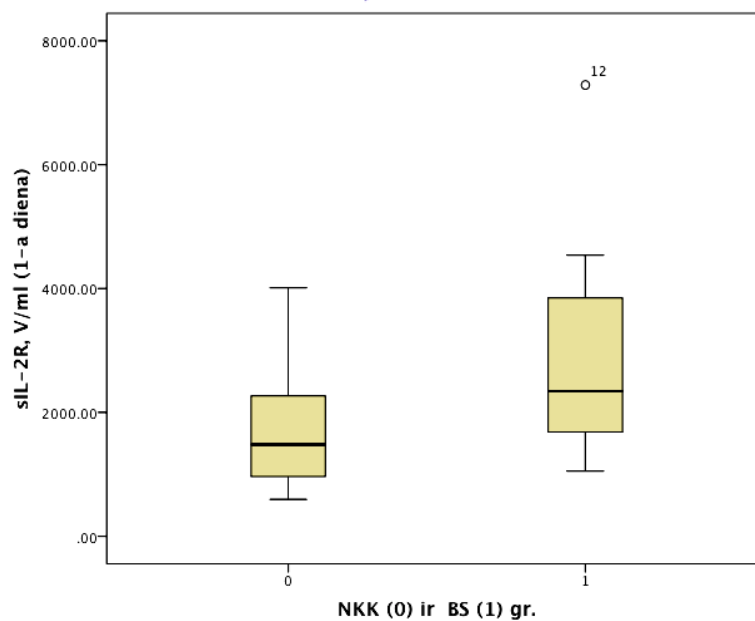
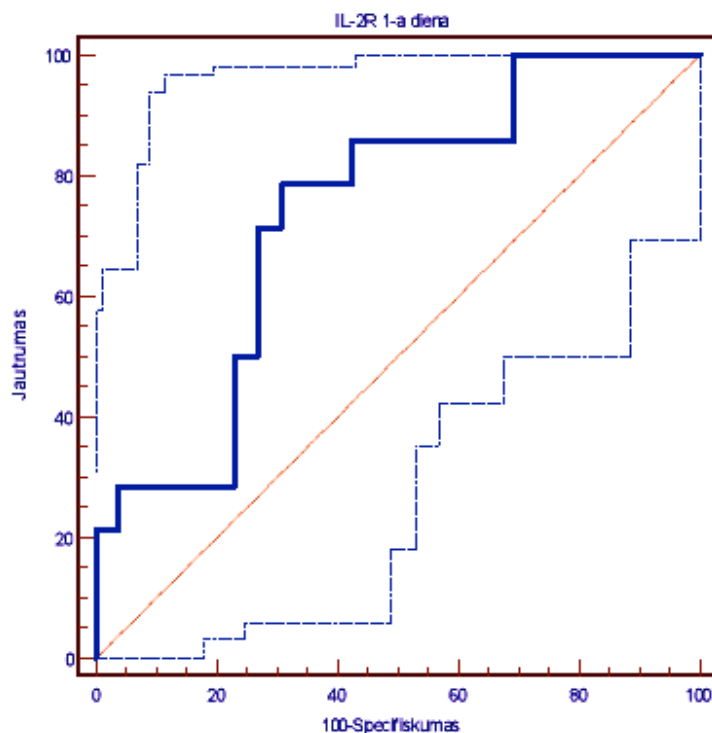
4 pav. IL-8 tikslumas bei šio biožymens skaitinės vertės NKK ir BS grupėse.

Paveikslo viršutinėje dalyje pateikta IL-8 ROC kreivė (ryškiai mėlyna, punktyrinės mėlynos linijos žymi 95% CI), kurios AUC=0,81; P<0,0001 (įstriža oranžinė linija žymi 0,5 ribą). Apatinėje šio paveikslo dalyje grafiškai pateikta IL-8 reikšmių (mažiausios reikšmės, apatinės kvartilės, medianos, viršutinės kvartilės, didžiausios reikšmės) svyravimai tarp analizuojamų NKK ir BS grupių (žvaigždutėmis, apskritimais pažymėtos reikšmės, kurių skaitinės vertės buvo didesnės už didžiausią reikšmę dydžiu, ne mažesniu kaip interkvartilės intervalo skaitinė vertė x 1,5; skaičiai šalia – atitinkamus FN epizodus).



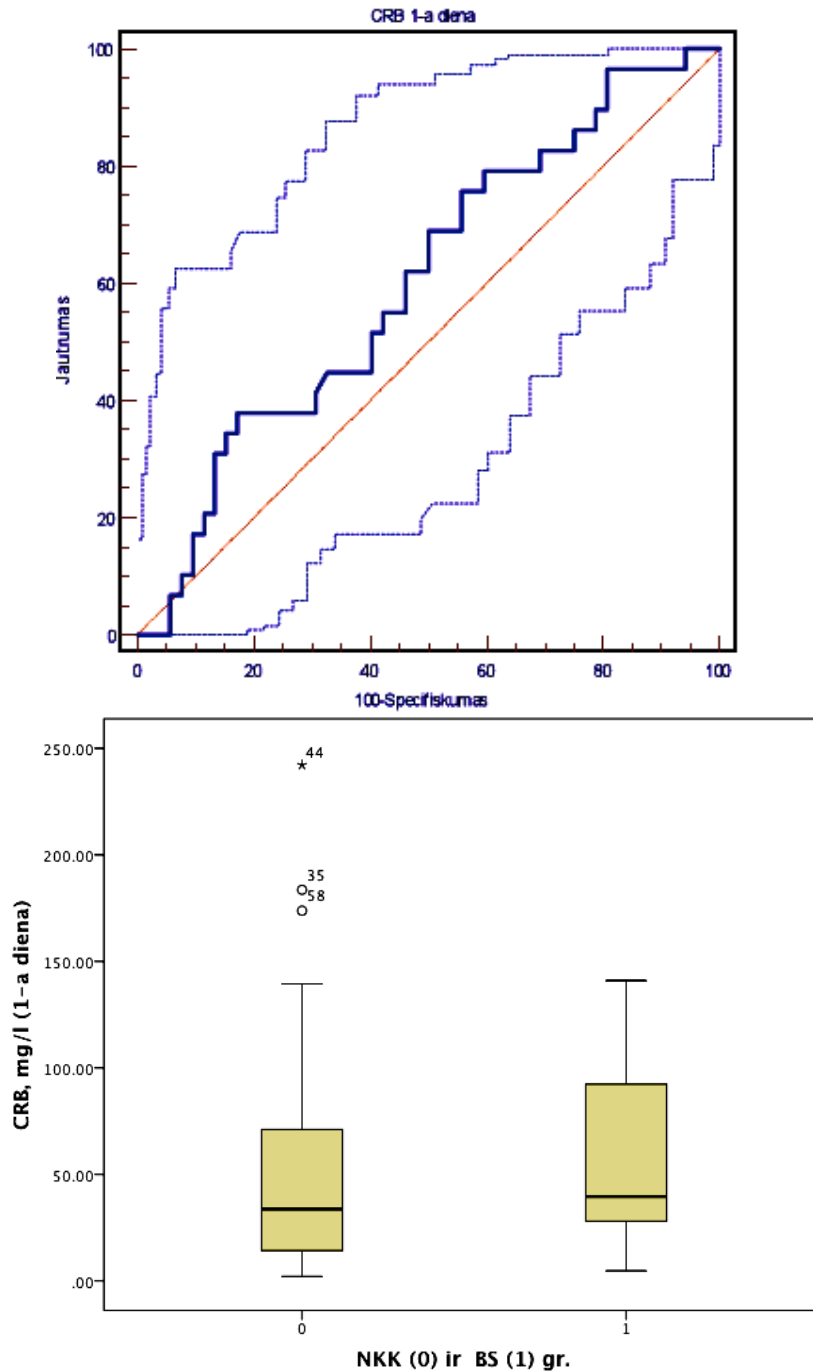
5 pav. IL-10 tikslumas bei šio biožymens skaitinės vertės NKK ir BS grupėse.

Paveikslo viršutinėje dalyje pateikta IL-10 ROC kreivė (ryškiai mėlyna, punktyrinės mėlynos linijos žymi 95% CI), kurios AUC=0,82; P=0,0001 (įstriža oranžinė linija žymi 0,5 ribą). Apatinėje šio paveikslo dalyje grafiškai pateikta IL-10 reikšmių (mažiausios reikšmės, apatinės kvartilės, medianos, viršutinės kvartilės, didžiausios reikšmės) svyravimai tarp analizuojamų NKK ir BS grupių (žvaigždutėmis, apskritimais pažymėtos reikšmės, kurių skaitinės vertės buvo didesnės už didžiausią reikšmę dydžiu, ne mažesniu kaip interkvartilės intervalo skaitinė vertė x 1,5; skaičiai šalia – atitinkamus FN epizodus).



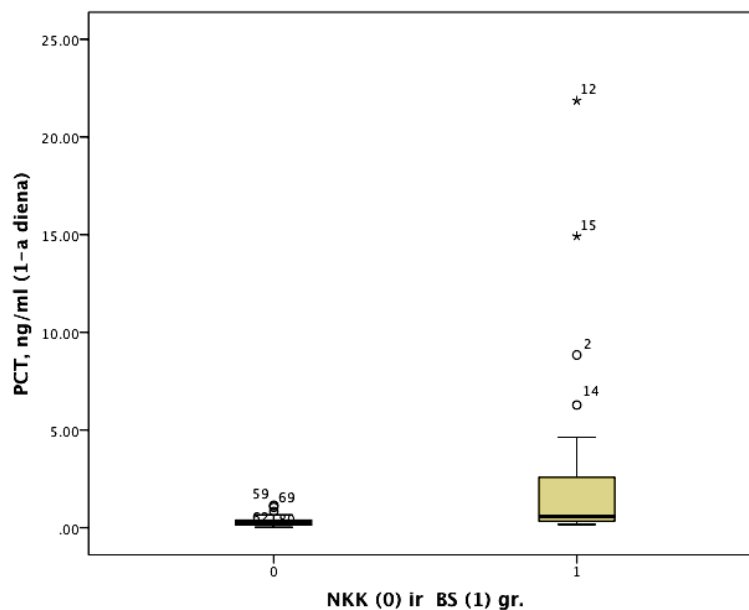
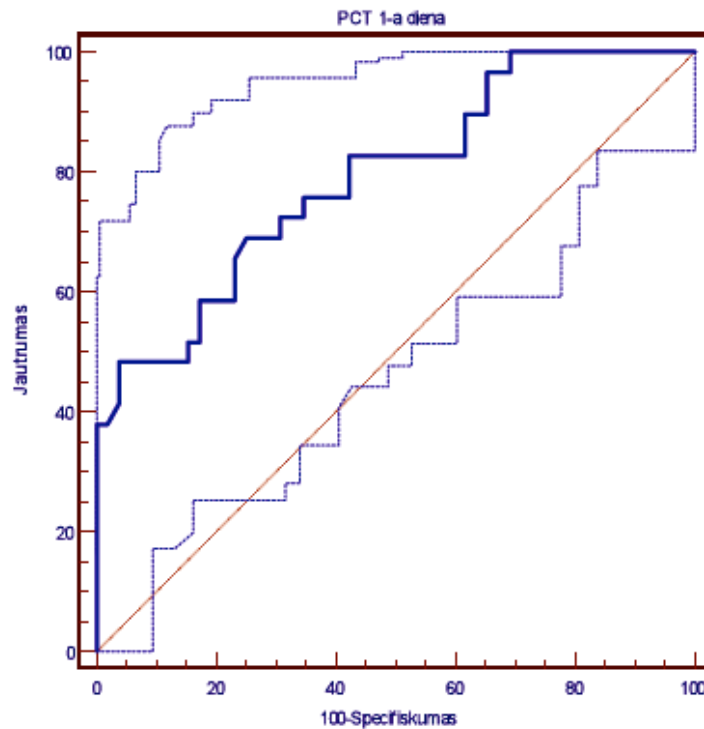
6 pav. sIL-2R tikslumas bei šio biožymens skaitinės vertės NKK ir BS grupėse.

Paveikslo viršutinėje dalyje pateikta sIL-2R ROC kreivė (ryškiai mėlyna, punktyrinės mėlynos linijos žymi 95% CI), kurios AUC=0,74; P=0,0061 (įstriža oranžinė linija žymi 0,5 ribą). Apatinėje šio paveikslo dalyje grafiškai pateikta sIL-2R reikšmių (mažiausios reikšmės, apatinės kvartilės, medianos, viršutinės kvartilės, didžiausios reikšmės) svyravimai tarp analizuojamų NKK ir BS grupių (žvaigždutėmis, apskritimais pažymėtos reikšmės, kurių skaitinės vertės buvo didesnės už didžiausią reikšmę dydžiu, ne mažesniu kaip interkvartilės intervalo skaitinė vertė x 1,5; skaičiai šalia – atitinkamus FN epizodus).



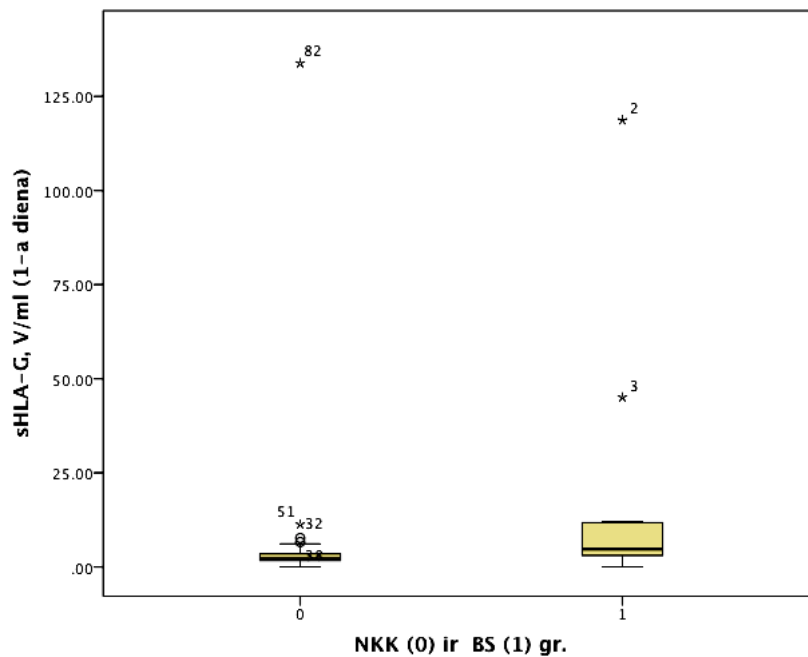
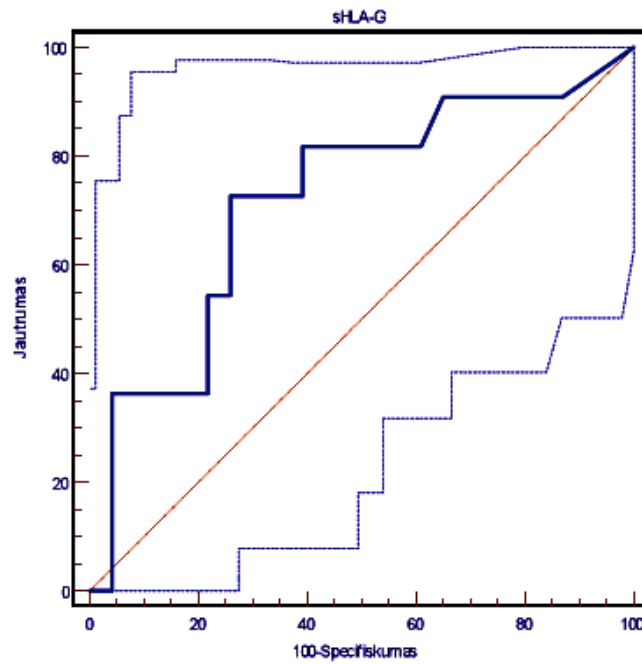
7 pav. CRB tikslumas bei šio biožymens skaitinės vertės NKK ir BS grupėse.

Paveikslo viršutinėje dalyje pateikta CRB ROC kreivė (ryškiai mėlyna, punktyrinės mėlynos linijos žymi 95% CI), kurios AUC=0,60; P=0,1229 (jstriža oranžinė linija žymi 0,5 ribą). Apatinėje šio paveikslo dalyje grafiškai pateikta CRB reikšmių (mažiausios reikšmės, apatinės kvartilės, medianos, viršutinės kvartilės, didžiausios reikšmės) svyravimai tarp analizuojamų NKK ir BS grupių (žvaigždutėmis, apskritimais pažymėtos reikšmės, kurių skaitinės vertės buvo didesnės už didžiausią reikšmę dydžiu, ne mažesniu kaip interkvartilės skaitinė vertė x 1,5; skaičiai šalia – atitinkamus FN epizodus).



8 pav. PCT tikslumas bei šio biožymens skaitinės vertės NKK ir BS grupėse.

Paveikslo viršutinėje dalyje pateikta PCT ROC kreivė (ryškiai mėlyna, punktyrinės mėlynos linijos žymi 95% CI), kurios AUC=0,79; $P < 0,0001$ (įstriža oranžinė linija žymi 0,5 ribą). Apatinėje šio paveikslo dalyje grafiškai pateikta PCT reikšmių (mažiausios reikšmės, apatinės kvartilės, medianos, viršutinės kvartilės, didžiausios reikšmės) svyravimai tarp analizuojamų NKK ir BS grupių (žvaigždutėmis, apskritimais pažymėtos reikšmės, kurių skaitinės vertės buvo didesnės už didžiausią reikšmę dydžiu, ne mažesniu kaip interkvartilės skaitinė vertė x 1,5; skaičiai šalia – atitinkamus FN epizodus).



9 pav. sHLA-G tikslumas bei šio biožymens skaitinės vertės NKK ir BS grupėse.

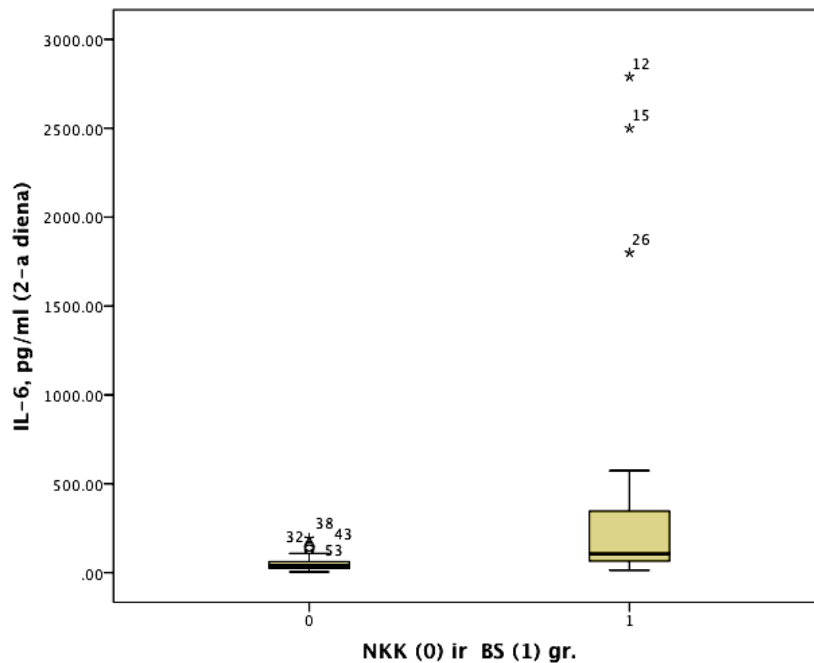
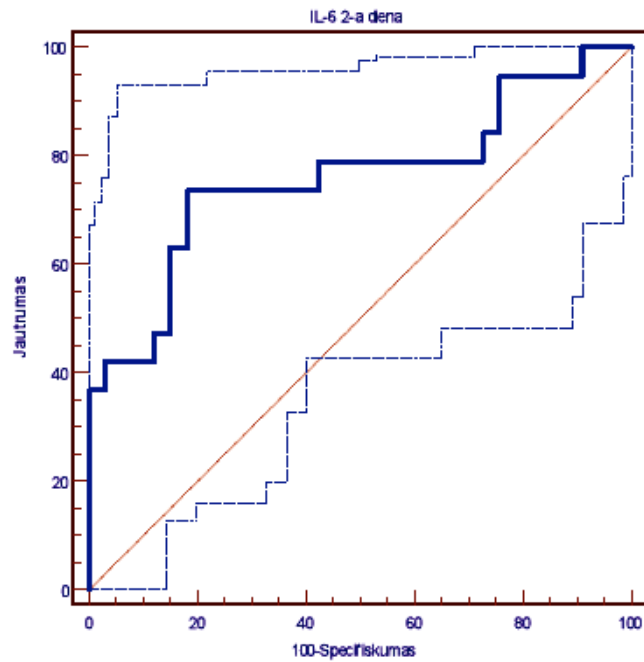
Paveikslo viršutinėje dalyje pateikta sHLA-G ROC kreivė (ryškiai mėlyna; punktyrinės mėlynos linijos žymi 95% CI), kurios AUC=0,72; $P < 0,0274$ (įstriža oranžinė linija žymi 0,5 ribą). Apatinėje šio paveikslo dalyje grafiškai pateikta sHLA-G reikšmių (mažiausios reikšmės, apatinės kvartilės, medianos, viršutinės kvartilės, didžiausios reikšmės) svyravimai tarp analizuojamų NKK ir BS grupių (žvaigždutėmis, apskritimais pažymėtos reikšmės, kurių skaitinės vertės buvo didesnės už didžiausią reikšmę dydžiu, ne mažesniu kaip interkvartilės skaitinė vertė $\times 1,5$; skaičiai šalia – atitinkamus FN epizodus).

3 lentelė. Pirmos FN epizodo dienos biožymenų ribinės vertės bei jų jautrumas, specifiškumas, TNV, NNV ROC analizės duomenimis. Jautrumas bei specifiškumas buvo vertintas kaip vienodai reikšmingi biožymenis apibrėžiantys rodikliai; TNV, NNV apskaičiuotas įvertinus BS grupės procentinę išraišką (35%) nuo bendros imties.

Žymuo	AUC	Ribinė vertė	Jautrum., %	Specif., %	TNV, %	NNV, %	P
IL-6	0,87	108 pg/ml	87	76	66	91	<0,0001
IL-8	0,81	631 pg/ml	55	95	85	80	<0,0001
IL-10	0,82	18 pg/ml	67	92	82	84	0,0001
sIL-2R	0,74	1658 V/ml	79	69	58	86	0,0061
CRB	0,60	82 mg/l	38	83	54	71	0,1229
PCT	0,79	1,04 ng/ml	48	96	87	77	<0,0001
sHLA-G	0,72	2,54 V/ml	73	74	60	83	0,0274

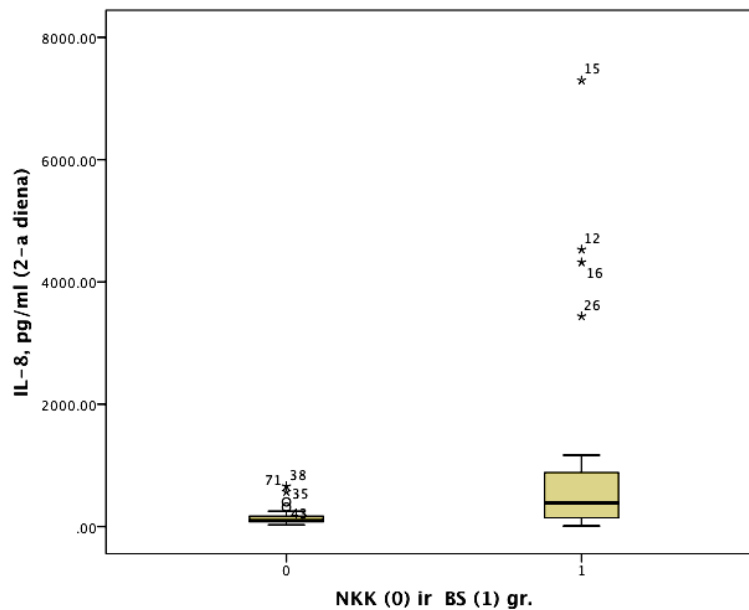
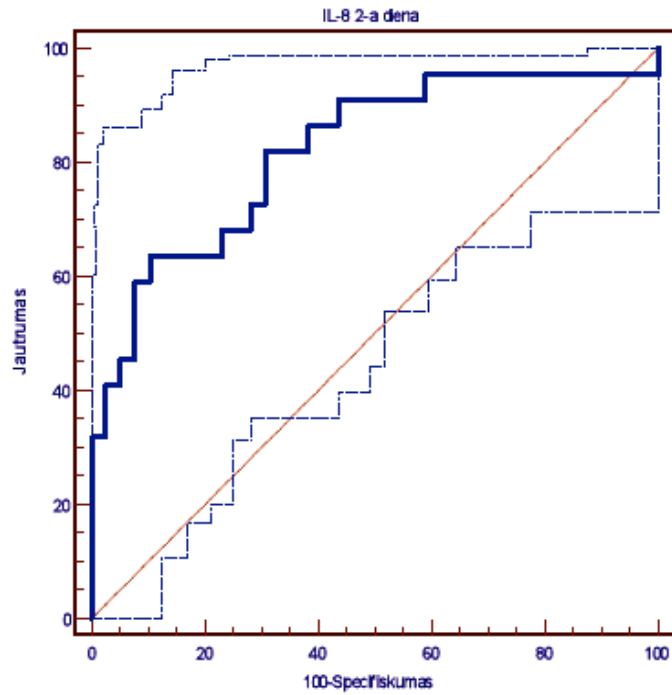
Antros dienos biožymenų skaitinių verčių (IL-6, IL-8, IL-10, sIL-2R, CRB, PCT) grafinė analizė pateikiama 10-15 paveiksluose; biožymenų jautrumas, specifiškumas, NNV, TNV – 4 lentelėje.

Antrą FN epizodo dieną tyrinėtų biožymenų tikslumas svyravo 0,72-0,89 ribose (AUC=0,72-0,89). Biožymenų IL-8 ir PCT gebėjimas diferencijuoti NKK ir BS grupes antrą FN epizodo dieną buvo didesnis už 0,80 (AUC_{IL-8}=0,82; AUC_{PCT}=0,89). Kitų tirtų biožymenų tikslumas buvo mažesnis už 0,80 ir siekė 0,72-0,76 (AUC_{IL-6}=0,76; AUC_{IL-10}=0,74; AUC_{sIL-2R}=0,72; AUC_{CRB}=0,72) (10–15 pav.).



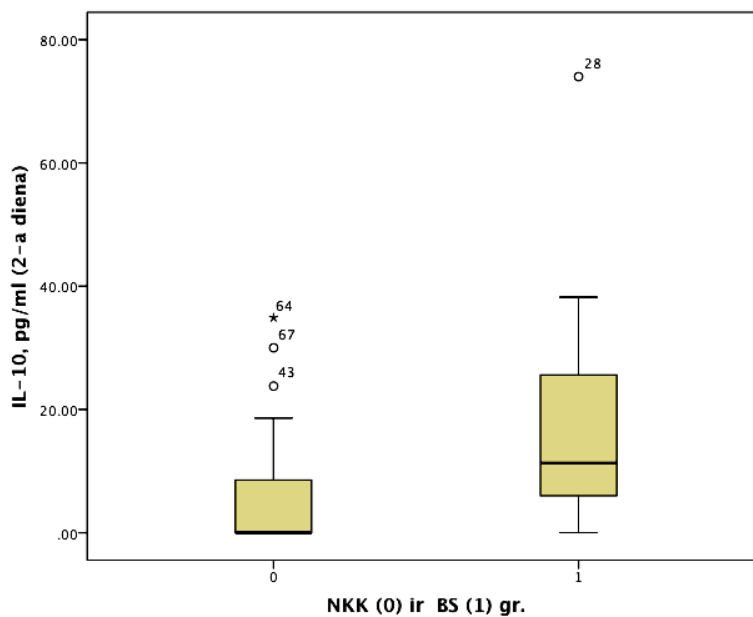
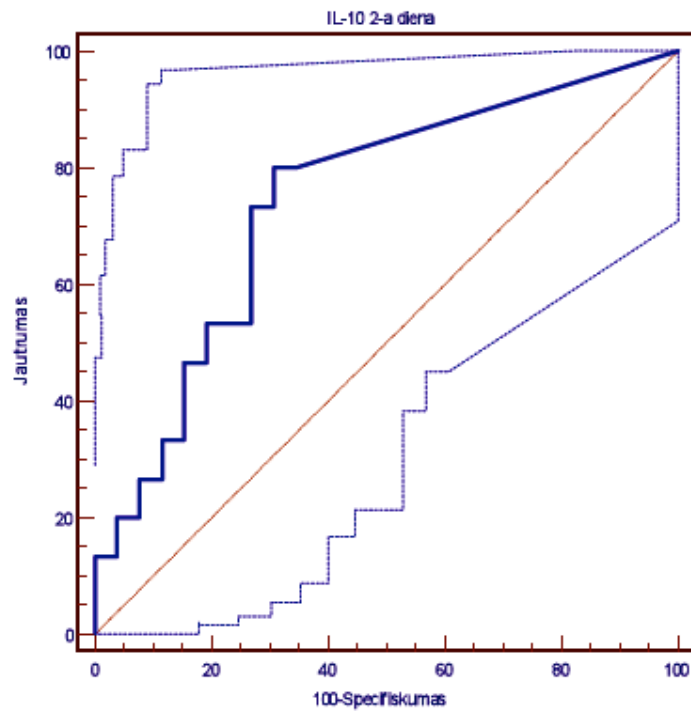
10 pav. IL-6 tikslumas bei šio biožymens skaitinės vertės NKK ir BS grupėse (antra FN epizodo diena).

Paveikslo viršutinėje dalyje pateikta IL-6 ROC kreivė (ryškiai mėlyna; punktyrinės mėlynos linijos žymi 95% CI), kurios AUC=0,76; P=0,0003 (įstriža oranžinė linija žymi 0,5 ribą). Apatinėje šio paveikslo dalyje pateiktas IL-6 reikšmių (mažiausios reikšmės, apatinės kvartilės, medianos, viršutinės kvartilės, didžiausios reikšmės) svyravimai tarp analizuojamų NKK ir BS grupių (žvaigždutėmis, apskritimais pažymėtos reikšmės, kurių skaitinės vertės buvo didesnės už didžiausią reikšmę dydžiu, ne mažesniu kaip interkvartilės skaitinė vertė x 1,5; skaičiai šalia – atitinkamus FN epizodus).



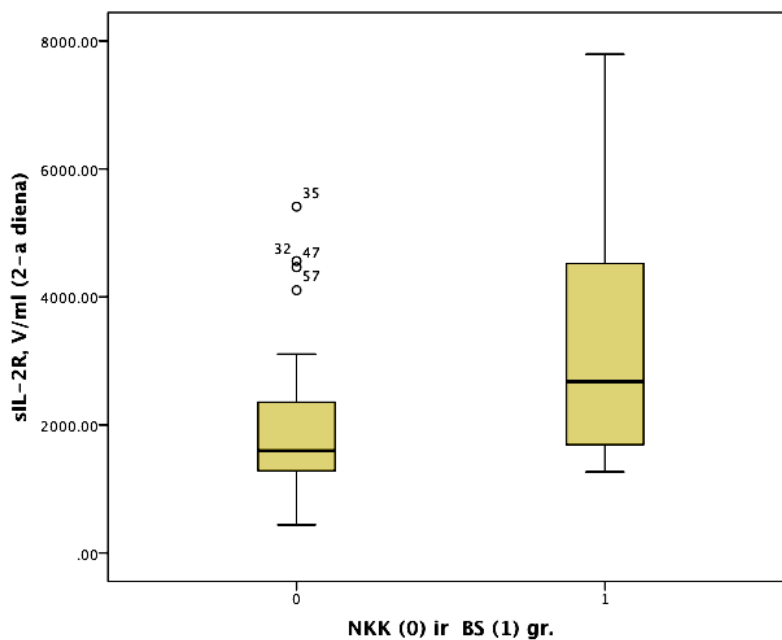
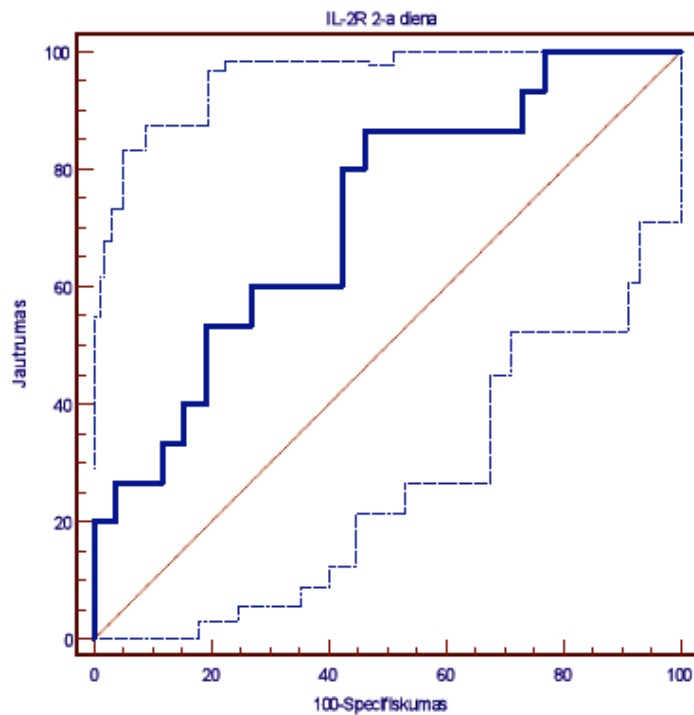
11 pav. IL-8 tikslumas bei šio biožymens skaitinės vertės NKK ir BS grupėse (antra FN epizodo diena).

Paveikslo viršutinėje dalyje pateikta IL-8 ROC kreivė (ryškiai mėlyna; punktyrinės mėlynos linijos žymi 95% CI), kurios AUC=0,82; P<0,0001 (įstriža oranžinė linija žymi 0,5 ribą). Apatinėje šio paveikslo dalyje grafiškai pateikta IL-8 reikšmių (mažiausios reikšmės, apatinės kvartilės, medianos, viršutinės kvartilės, didžiausios reikšmės) svyravimai tarp analizuojamų NKK ir BS grupių (žvaigždutėmis, apskritimais pažymėtos reikšmės, kurių skaitinės vertės buvo didesnės už didžiausią reikšmę dydžiu, ne mažesniu kaip interkvartilės skaitinė vertė x 1,5; skaičiai šalia – atitinkamus FN epizodus).



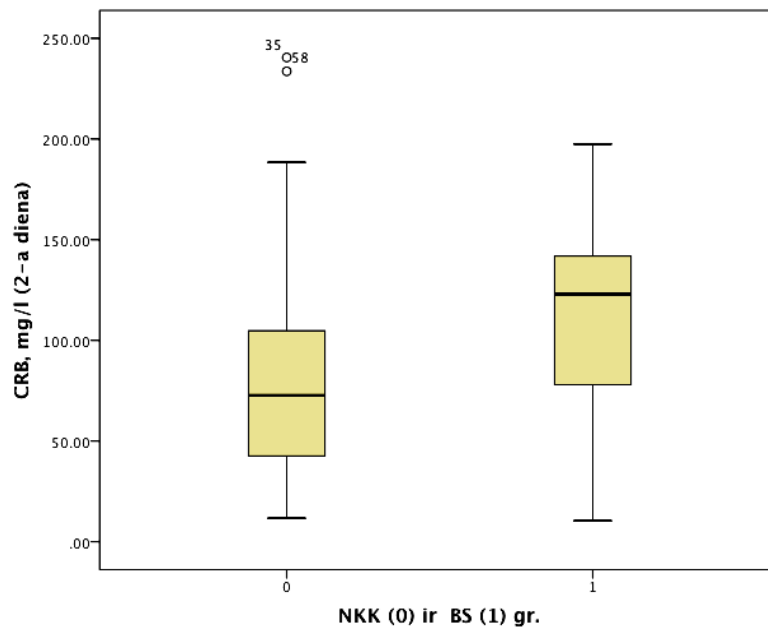
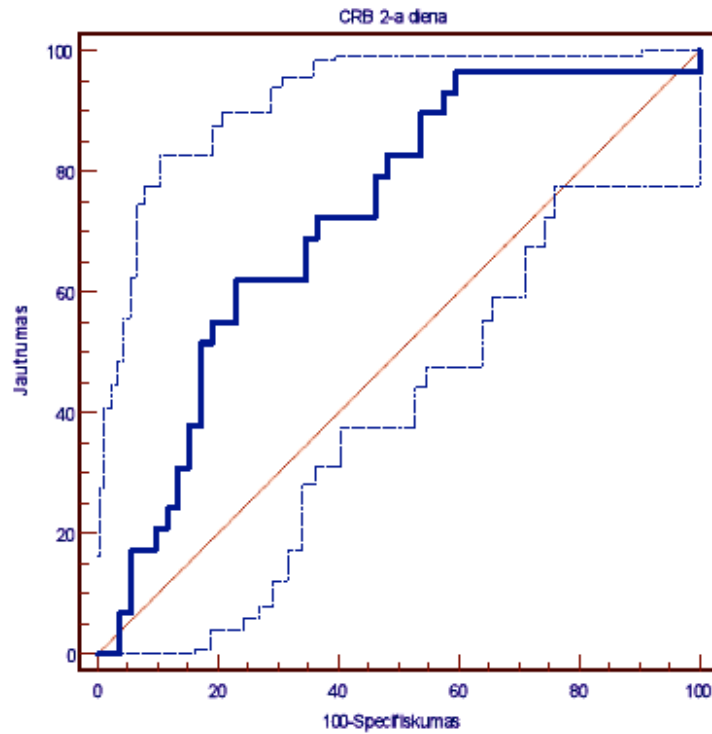
12 pav. IL-10 tikslumas bei šio biožymens skaitinės vertės NKK ir BS grupėse (antra FN epizodo diena).

Paveikslo viršutinėje dalyje pateikta IL-10 ROC kreivė (ryškiai mėlyna; punktyrinės mėlynos linijos žymi 95% CI), kurios AUC=0,74; P=0,0041 (įstriža oranžinė linija žymi 0,5 ribą). Apatinėje šio paveikslo dalyje grafiškai pateikta IL-10 reikšmių (mažiausios reikšmės, apatinės kvartilės, medianos, viršutinės kvartilės, didžiausios reikšmės) svyravimai tarp analizuojamų NKK ir BS grupių (žvaigždutėmis, apskritimais pažymėtos reikšmės, kurių skaitinės vertės buvo didesnės už didžiausią reikšmę dydžiu, ne mažesniu kaip interkvartilės skaitinė vertė x 1,5; skaičiai šalia – atitinkamus FN epizodus).



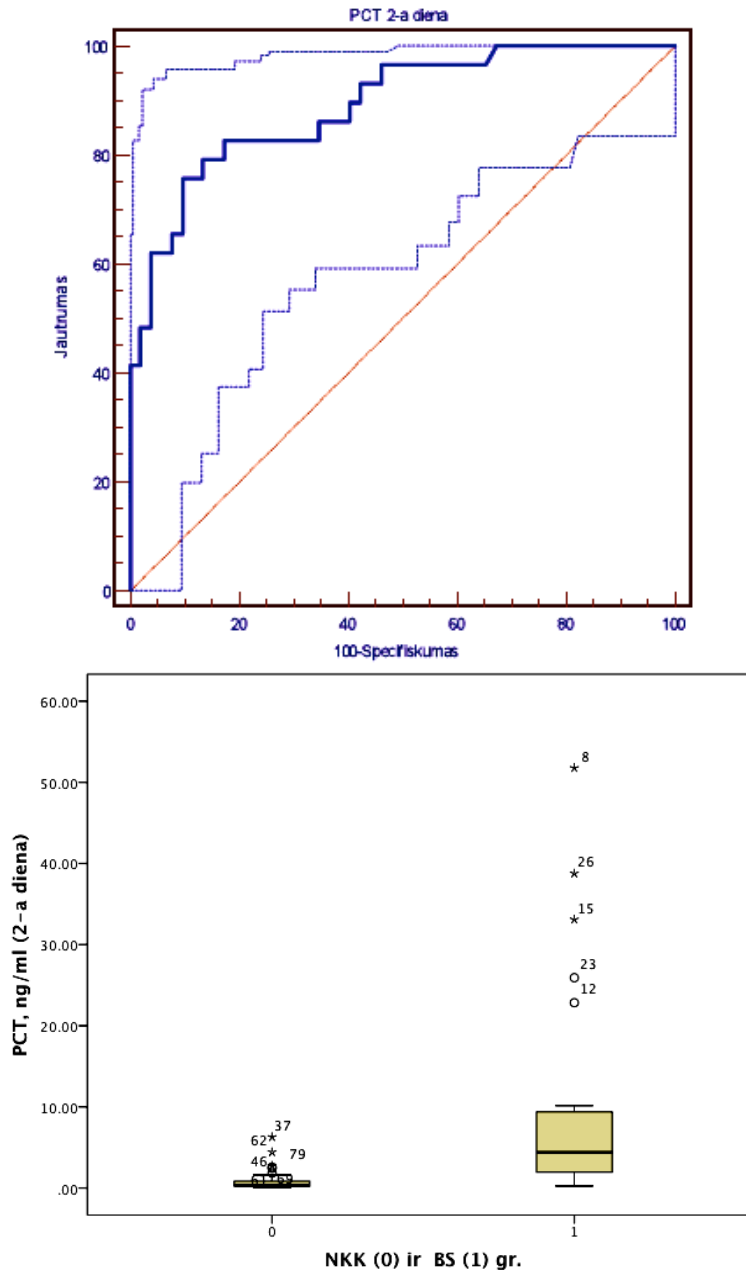
13 pav. sIL-2R tikslumas bei šio biožymens skaitinės vertės NKK ir BS grupėse (antra FN epizodo diena).

Paveikslo viršutinėje dalyje pateikta sIL-2R ROC kreivė (ryškiai mėlyna; punktyrinės mėlynos linijos žymi 95% CI), kurios AUC=0,72; P=0,0109 (įstriža oranžinė linija žymi 0,5 ribą). Apatinėje šio paveikslo dalyje grafiškai pateikta sIL-2R reikšmių (mažiausios reikšmės, apatinės kvartilės, medianos, viršutinės kvartilės, didžiausios reikšmės) svyravimai tarp analizuojamų NKK ir BS grupių (žvaigždutėmis, apskritimais pažymėtos reikšmės, kurių skaitinės vertės buvo didesnės už didžiausią reikšmę dydžiu, ne mažesniu kaip interkvartilės skaitinė vertė x 1,5; skaičiai šalia – atitinkamus FN epizodus).



14 pav. CRB tikslumas bei šio biožymens skaitinės vertės NKK ir BS grupėse (antra FN epizodo diena).

Paveikslo viršutinėje dalyje pateikta CRB ROC kreivė (ryškiai mėlyna; punktyrinės mėlynos linijos žymi 95% CI), kurios AUC=0,72; P=0,0003 (jstriža oranžinė linija žymi 0,5 ribą). Apatinėje šio paveikslo dalyje grafiškai pateikta CRB reikšmių (mažiausios reikšmės, apatinės kvartilės, medianos, viršutinės kvartilės, didžiausios reikšmės) svyravimai tarp analizuojamų NKK ir BS grupių (žvaigždutėmis, apskritimais pažymėtos reikšmės, kurių skaitinės vertės buvo didesnės už didžiausią reikšmę dydžiu, ne mažesniu kaip interkvartilės skaitinė reikšmė x 1,5; skaičiai šalia – atitinkamus FN epizodus).



15 pav. PCT tikslumas bei šio biožymens skaitinės vertės NKK ir BS grupėse (antra FN epizodo diena).

Paveikslo viršutinėje dalyje pateikta PCT ROC kreivė (ryškiai mėlyna; punktyrinės mėlynos linijos žymi 95% CI), kurios AUC=0,89; $P < 0,0001$ (įstriža oranžinė linija žymi 0,5 ribą). Apatinėje šio paveikslo dalyje grafiškai pateikta PCT reikšmių (mažiausios reikšmės, apatinės kvartilės, medianos, viršutinės kvartilės, didžiausios reikšmės) svyravimai tarp analizuojamų NKK ir BS grupių (žvaigždutėmis, apskritimais pažymėtos reikšmės, kurių skaitinės vertės buvo didesnės už didžiausią reikšmę dydžiu, ne mažesniu kaip interkvartilės skaitinė reikšmė $\times 1,5$; skaičiai šalia – atitinkamus FN epizodus).

4 lentelė. Antros FN epizodo dienos biožymenų ribinės vertės bei jų jautrumas, specifiškumas, TNV, NNV ROC analizės duomenimis.

Jautrumas bei specifiškumas buvo vertintas kaip vienodai reikšmingi biožymenis apibrėžiantys rodikliai; TNV, NNV apskaičiuotas įvertinus BS grupės procentinę išraišką (35%) nuo bendros imties.

Žymuo	AUC	Ribinė vertė	Jautrum., %	Specif., %	TNV, %	NNV, %	P
IL-6	0,76	78 pg/ml	74	82	69	85	<0,0003
IL-8	0,82	249 pg/ml	64	90	77	82	<0,0001
IL-10	0,74	5,05 pg/ml	80	69	58	87	0,0041
sIL-2R	0,72	1596 V/ml	87	54	50	88	0,0061
CRB	0,72	106 mg/l	62	77	59	79	0,0003
PCT	0,89	1,85 ng/ml	76	90	81	87	<0,0001

5 lentelė. Pirmos-antros FN epizodo dienomis vertintų biožymenų jautrumas, specifiškumas, TNV, NNV esant vienodoms atitinkamo biožymens ribinėms vertėms ROC analizės duomenimis.

Žymuo	Dienos	AUC	Ribinė vertė	Jautrum., %	Specif., %	TNV, %	NNV, %
IL-6	1-a diena	0,87	108 pg/ml	87	76	66	91
	2-a diena	0,76	108 pg/ml	47	88	68	76
IL-8	1-a diena	0,81	316 pg/ml	60	85	68	80
	2-a diena	0,82	316 pg/ml	59	92	81	81
PCT	1-a diena	0,79	1,13 ng/ml	38	98	91	75
	2-a diena	0,89	1,13 ng/ml	83	83	72	90
IL-10	1-a diena	0,82	11,3 pg/ml	67	78	61	81
	2-a diena	0,74	11,3 pg/ml	47	81	57	74
sIL-2R	1-a diena	0,74	1658 V/ml	79	69	58	86
	2-a diena	0,72	1658 V/ml	80	58	51	84
CRB	1-a diena	0,60	61 mg/l	38	69	40	67
	2-a diena	0,72	61 mg/l	93	42	46	92

Pirmos ir antros dienos tyrinėtų bioaktyvių molekulių (IL-6, IL-8, IL-10, sIL-2R, CRB, PCT) ribinės vertės (angl. *cut-off*) buvo skirtingos (3, 4 lent.), kai jautrumas bei specifiškumas buvo traktuojami kaip vienodai reikšmingi biožymenis apibūdinantys rodikliai. Skirtingų ribinių verčių taikymas pirmą ir antrą FN epizodų dienomis vertinant bakterinę

infekciją būtų sunkiai pritaikomas kasdieniniame gydytojo darbe, todėl ribinės vertės kiekvienam biožymeniui buvo suvienodintos ir tai buvo atlikta remiantis ROC kreivių analizės duomenimis (5 lent.)

Pirmą dieną tirtų citokinų bei tirpių citokinų receptorių jautrumas svyravo 60–87% ribose, specifiškumas 69–85% ribose, TNV – 58–68% ribose, NNV – 81–91% ribose. Antrą dieną vertintų citokinų bei tirpių citokinų receptorių jautrumas svyravo 47–80% ribose, specifiškumas 58–92% ribose, TNV – 51–81% ribose, NNV – 74–84% ribose (5 lent.). Pirmą dieną CRB jautrumas buvo 38%, specifiškumas - 69%, TNV – 40%, NNV – 67% (ribinei vertei esant 61 mg/l); PCT jautrumas buvo 38%, specifiškumas - 98%, TNV – 91%, NNV – 75% (ribinei vertei esant 1,13 ng/ml). Antrą dieną CRB jautrumas siekė 93%, specifiškumas - 42%, TNV – 46%, NNV – 92% (ribinei vertei esant 61 mg/l); o PCT jautrumas buvo 83%, specifiškumas - 83%, TNV – 72%, NNV – 90% (ribinei vertei esant 1,13 ng/ml). Vertinant biožymenų rodiklių pokyčius dinamikoje, buvo stebimas ženklus CRB, PCT jautrumo bei NNV didėjimas, kai tuo tarpu IL-6 jautrumas bei NNV dinamikoje mažėjo. IL-6, IL-8 specifiškumas ir TNV dinamikoje didėjo, o PCT, sIL-2R specifiškumas bei TNV mažėjo (5 lent.).

5.4. Tiriamose grupėse vertintų biožymenų kiekybinių reikšmių palyginimas pirmą - antrą febrilinės neutropenijos epizodo dienomis

Biožymenų kiekybinių verčių palyginimas pirmą ir antrą FN epizodo dienomis tarp NKK ir BS tiriamųjų grupių buvo atliekamas taikant Mann-Whitney neparametrinį statistinį kriterijų (žiūr. į 6 lent.).

Daugumos pirmą dieną tirtų biožymenų (IL-6, IL-8, IL-10, sIL-2R, PCT, sHLA-G) koncentracijų medianos buvo didesnės ir statistiškai reikšmingos BS grupėje lyginant su NKK grupe. IL-6 reikšmės mediana NKK grupėje buvo 65 pg/ml, BS grupėje buvo 281 pg/ml ($p < 0,0001$), IL-

8 reikšmės mediana NKK grupėje buvo 140 pg/ml, BS grupėje buvo 636 pg/ml ($p=0,0001$), IL-10 reikšmės mediana NKK grupėje buvo 0 pg/ml, BS grupėje buvo 31 pg/ml ($p=0,017$), sIL-2R reikšmės mediana NKK grupėje buvo 1480 pg/ml, BS grupėje buvo 2342 pg/ml ($p=0,0136$), PCT reikšmės mediana NKK grupėje buvo 0,27 ng/ml, BS grupėje buvo 0,57 ng/ml ($p<0,0001$) ir sHLA-G reikšmės mediana NKK grupėje buvo 2,06 V/ml, BS grupėje buvo 4,76 V/ml ($p=0,0410$). Vienintelis biožymuo, kurio koncentracijos abiejose grupėse statistiškai reikšmingai nesiskyrė buvo CRB ($p=0,1256$) ir mediana NKK grupėje buvo 34 mg/l, BS grupėje – 40 mg/l.

6 lentelė. Biožymenų verčių palyginimas tarp NKK ir BS grupių pirmomis FN epizodo dienomis taikant Mann-Whitney neparametrinį statistinį kriterijų.

IL-6, IL-8, IL-10 matavimo vienetai pg/ml; CRB – mg/l; PCT – ng/ml; sIL-2R, sHLA-G – V/ml.

Žymuo, diena	Grupės (NKK, BS)	Mažiausia vertė	Didžiausia vertė	Mediana	Mediana 95% CI	P	
I-a diena	IL-6	NKK	18	558	65	39-93	<0,0001
		BS	54	1818	281	122-1081	
	IL-8	NKK	18	855	140	81-211	0,0001
		BS	72	4227	636	198-1360	
	IL-10	NKK	0	87	0	0-8	0,0017
		BS	0	1000	31	4-596	
	sIL-2R	NKK	594	4012	1480	966-2026	0,0136
		BS	1054	7286	2342	1593-4307	
	CRB	NKK	2	242	34	23-55	0,1256
		BS	5	140	40	28-91	
	PCT	NKK	0,02	1,15	0,27	0,18-0,34	<0,0001
		BS	0,17	22	0,57	0,34-2,31	
	sHLA-G	NKK	0	134	2,06	1,73-3,30	0,0410
		BS	0	119	4,76	1,88-38	
II-a diena	IL-6	NKK	4	193	38	29-61	0,0019
		BS	14	2790	105	52-395	
	IL-8	NKK	27	658	98	86-139	<0,0001
		BS	9	7297	386	149-856	
	IL-10	NKK	0	35	0	0-7	0,0105
		BS	0	74	11	3-29	
	sIL-2R	NKK	440	5410	1595	1432-2229	0,0199
		BS	1265	7790	2675	1654-5297	
	CRB	NKK	12	240	73	54-95	0,0010
		BS	10	197	122	90-142	
	PCT	NKK	0,05	6,28	0,36	0,26-0,55	<0,0001
		BS	0,26	52	4,38	2,07-8,92	

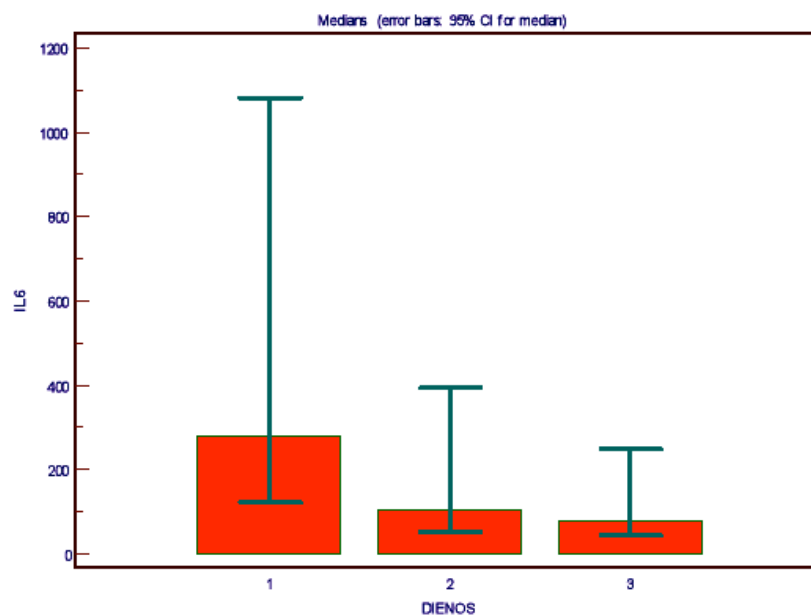
Visų antrą FN epizodo dieną tirtų biomolekulių (IL-6, IL-8, IL-10, sIL-2R, PCT, CRB) reikšmių medianos buvo didesnės BS grupėje palyginus su NKK grupe ir pasižymėjo statistiniu reikšmingumu.

IL-6 reikšmės mediana antrą FN epizodo dieną NKK grupėje buvo 38 pg/ml, BS grupėje buvo 105 pg/ml ($p=0,0019$), IL-8 reikšmės mediana NKK grupėje buvo 98 pg/ml, BS grupėje buvo 386 pg/ml ($p<0,0001$), IL-10 reikšmės mediana NKK grupėje buvo 0 pg/ml, BS

grupėje buvo 11 pg/ml ($p=0,0105$), sIL-2R reikšmės mediana NKK grupėje buvo 1595 pg/ml, BS grupėje buvo 2675 pg/ml ($p=0,0199$), PCT reikšmės mediana NKK grupėje buvo 0,36 ng/ml, BS grupėje buvo 4,38 ng/ml ($p<0,0001$) ir CRB reikšmės mediana NKK grupėje buvo 73 mg/l, BS grupėje buvo 122 mg/l ($p=0,0010$).

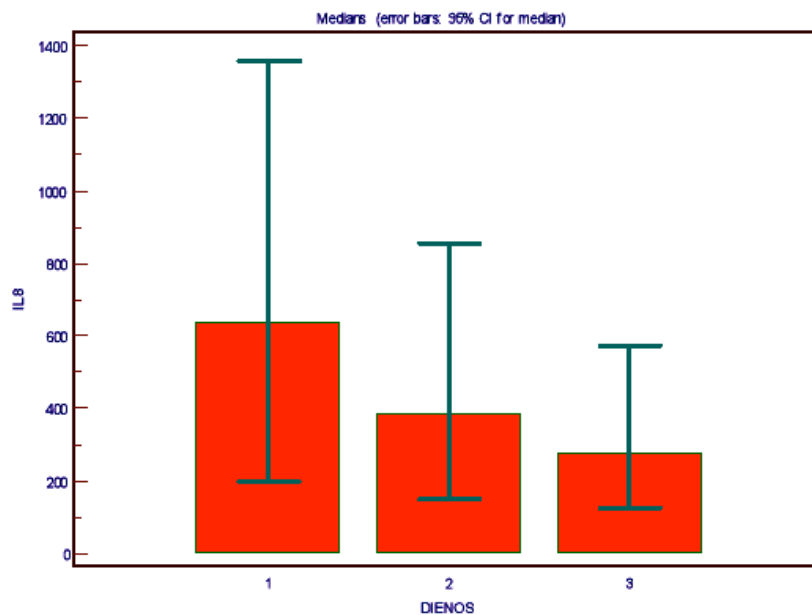
5.5. Bakteriemijos ir sepsio grupės biožymenų pokyčiai pirmą – trečią febrilinės neutropenijos epizodo dienomis

BS grupės biožymenų pokyčiai pirmomis FN epizodo dienomis buvo analizuojami taikant vienfaktorinę dispersinę analizę (ANOVA) bei *Post Hoc* Bonferroni analizę (žiūr. į 16 - 21 lent.).



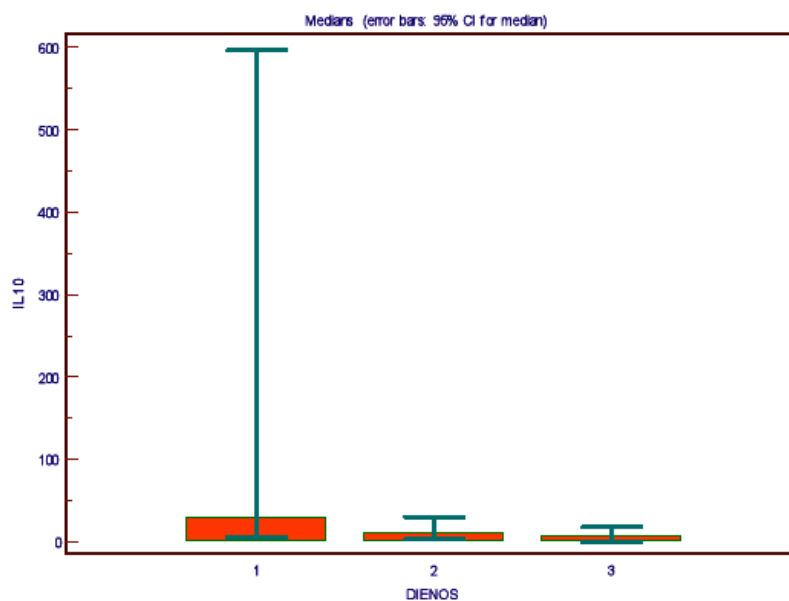
16 pav. IL-6 pokyčiai BS grupėje pirmą - trečią FN epizodo dienomis ($P=0,956$).

Žalia vertikali linija žymi medianos 95% pasikliautinumo intervalą (IL-6 vertinimo vienetai buvo pg/ml)



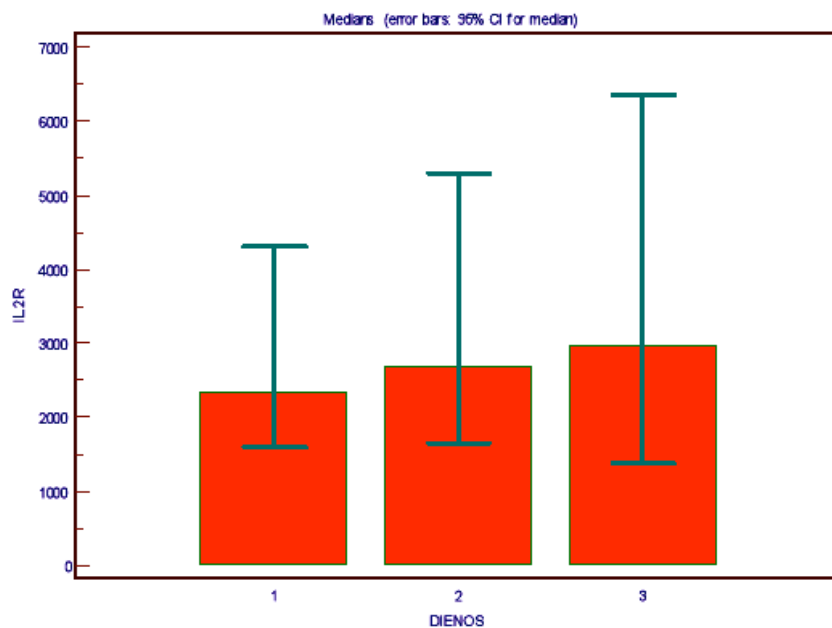
17 pav. IL-8 pokyčiai BS grupėje pirmą - trečią FN epizodo dienomis (P=0,860).

Žalia vertikali linija žymi medianos 95% pasikliautinumo intervalą (IL-8 vertinimo vienetai buvo pg/ml)



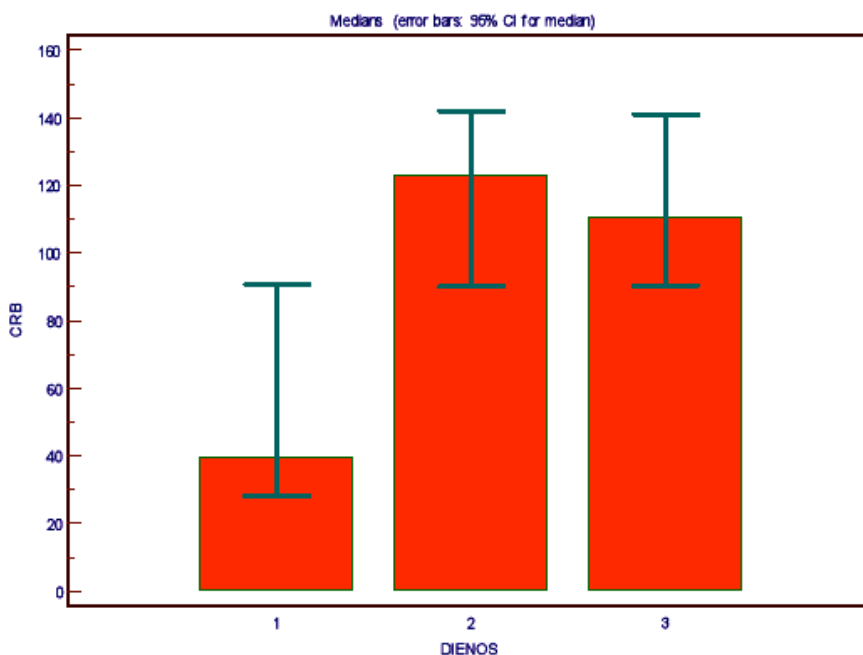
18 pav. IL-10 pokyčiai BS grupėje pirmą - trečią FN epizodo dienomis (P=0,004).

Žalia vertikali linija žymi medianos 95% pasikliautinumo intervalą (IL-10 vertinimo vienetai buvo pg/ml)



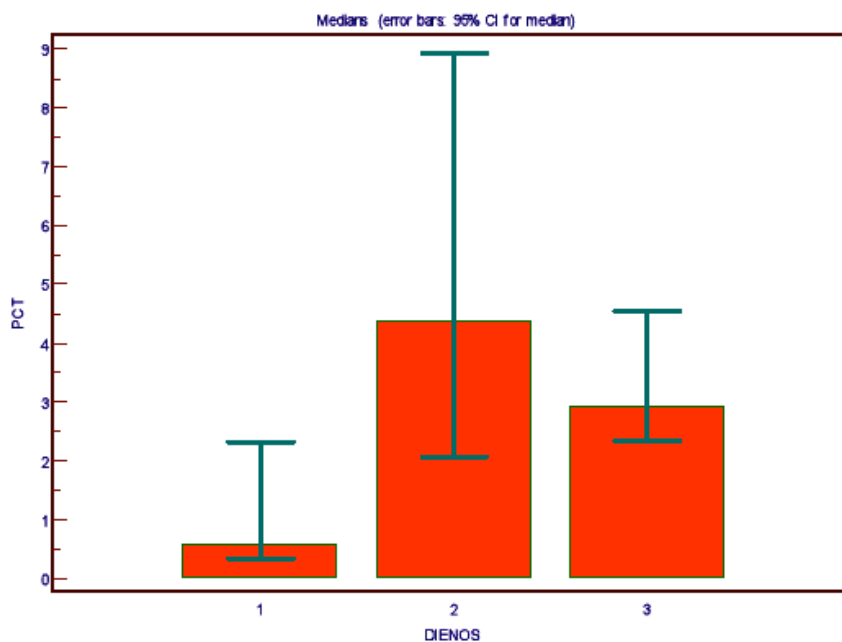
19 pav. sIL-2R pokyčiai BS grupėje pirmą - trečią FN epizodo dienomis (P=0,554).

Žalia vertikali linija žymi medianos 95% pasikliautinumo intervalą (sIL-2R vertinimo vienetai buvo V/ml)



20 pav. CRB pokyčiai BS grupėje pirmą - trečią FN epizodo dienomis (P=0,001).

Žalia vertikali linija žymi medianos 95% pasikliautinumo intervalą (CRB vertinimo vienetai buvo mg/l)



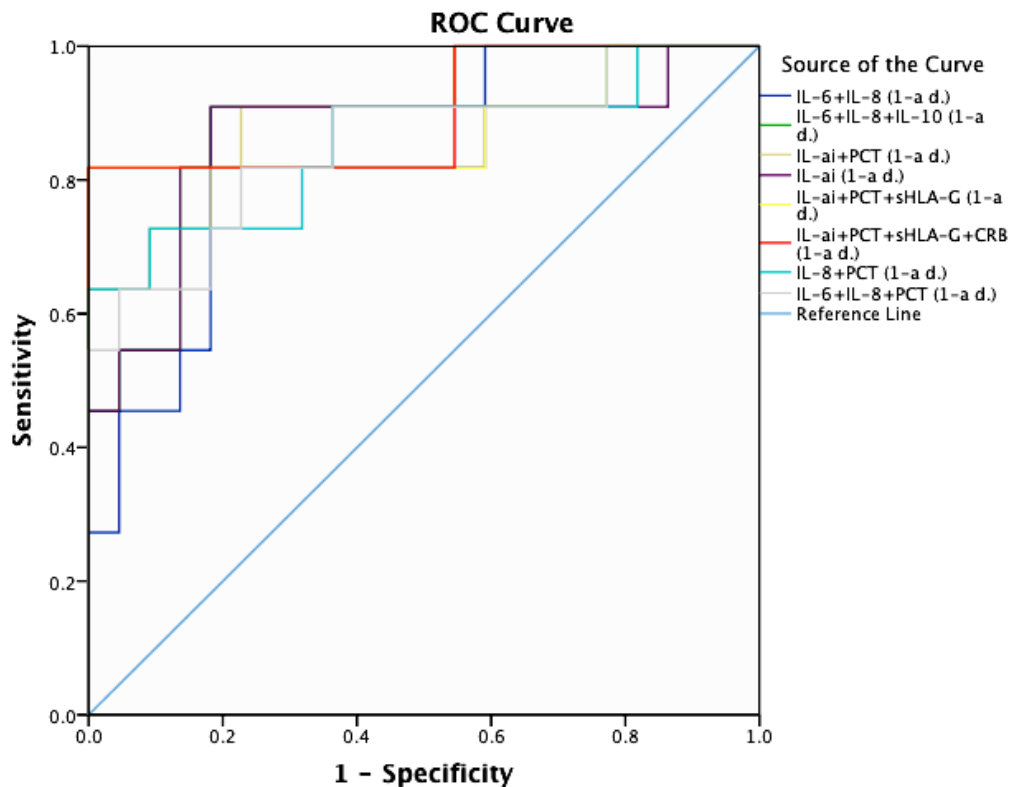
21 pav. PCT pokyčiai BS grupėje pirmą - trečią FN epizodo dienomis (P=0,0038).

Žalia vertikali linija žymi medianos 95% pasikliautinumo intervalą (PCT vertinimo vienetai buvo ng/ml)

Vertinant uždegiminių citokinų IL-6 ir IL-8 bei priešuždegiminio citokino IL-10 pokyčius pirmomis trimis FN epizodo dienomis, buvo stebima šių biožymenų koncentracijos mažėjimo tendencija. IL-6 ir IL-8 biožymenų koncentracijų mažėjimas statistiškai nebuvo reikšmingas. IL-10 koncentracijos mažėjimas pirmą - antrą dienomis statistiškai buvo reikšmingas (P=0,009, Bonferroni *Post Hoc* analizė), tačiau antrą - trečią dienomis galime įžvelgti tik koncentracijos mažėjimo tendenciją. sIL-2R koncentracija BS grupėje pirmą - trečią dienomis didėjo, tačiau šis biožymens kiekio didėjimas nebuvo statistiškai reikšmingas. Vertinant CRB bei PCT pokyčius, buvo stebimas šių biožymenų koncentracijų didėjimas pirmą - antrą dienomis, kuris buvo statistiškai reikšmingas (P<0,001 ir P=0,035, Bonferroni *Post Hoc* analizė). Antrą - trečią dienomis šių biožymenų koncentracijos mažėjo, tačiau pokyčiai nebuvo statistiškai reikšmingi (16 - 21 pav.).

5.6. Bakteremijos ir sepsio sąsajos su tirtų biožymenų skaitinėmis vertėmis

Bakteremijos ir sepsio sąsajos su nagrinėtų citokinų bei kitų tirtų uždegimo procese dalyvaujančių biomolekulių skaitinėmis vertėmis buvo nagrinėta taikant binarinę logistinę regresiją, o gauti modeliai, kuriuos sudarė nuo 2 iki 7 biožymenų paletės, tarpusavyje buvo lyginami naudojant ROC kreivių metodą, kurio pagalba pagal AUC buvo vertinamas atitinkamo modelio tikslumas bei gebėjimas diferencijuoti BS ir NKK grupes (žiūr. į 22 - 23 pav.).



22 pav. Suminis biožymenų tikslumas vertinant sepsį ir bakteremiją binarinės logistinės regresijos bei ROC kreivių metodu (pirma diena).

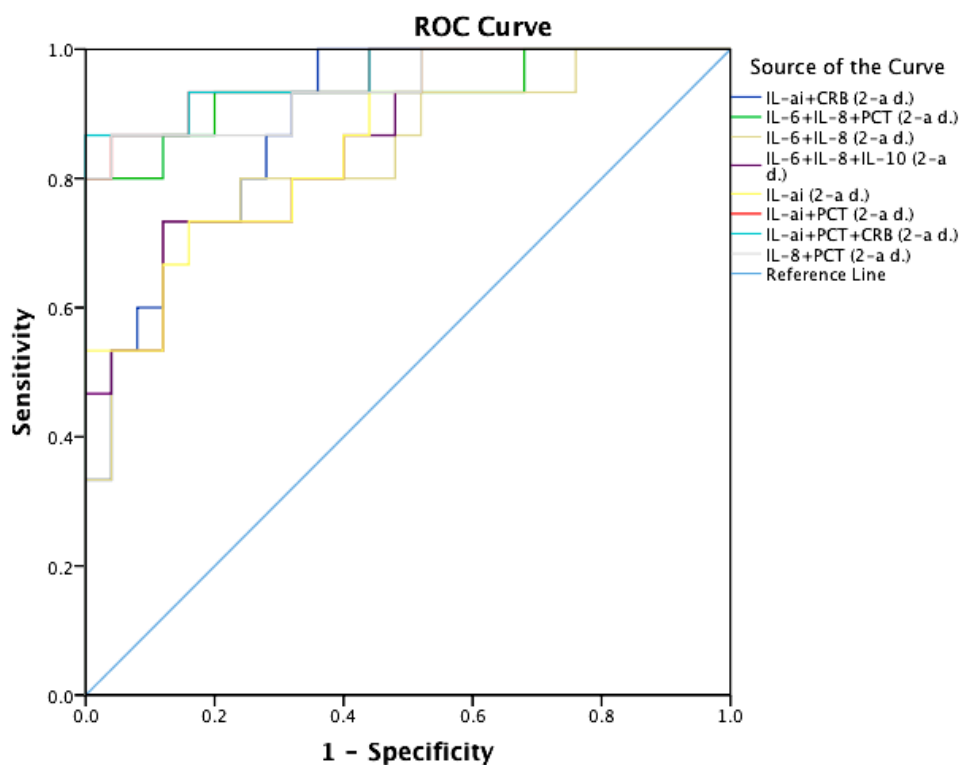
$AUC_{IL-6+IL-8}=0,82$; $AUC_{IL-6+IL-8+IL-10}=0,87$; $AUC_{IL-ai}=0,86$;

$AUC_{IL-ai+PCT}=0,91$; $AUC_{IL-ai+PCT+sHLA-G}=0,88$; $AUC_{IL-ai+PCT+sHLA-G+CRB}=0,90$;

$AUC_{IL-6+IL-8+PCT}=0,86$; $AUC_{IL-8+PCT}=0,86$ (IL-ai=IL-6+IL-8+IL-10+sIL-2R;

sensitivity – jautrumas; *specificity* - specifiškumas).

Pirmą FN epizodo dieną didžiausiu tikslumu pasižymėjo citokinių, tirpių receptorių (IL-6, IL-8, IL-10, sIL-2R) bei PCT paletė ir šios paletės, sudarytos iš penkių biožymenų, tikslumas siekė 0,91 ($AUC_{IL-ai+PCT}=0,91$), kai tuo tarpu paletės, sudarytos iš septynių (IL-6, IL-8, IL-10, sIL-2R, CRB, PCT, sHLA-G) bei šešių (IL-6, IL-8, IL-10, sIL-2R, PCT, sHLA-G) biožymenų tikslumas buvo mažesnis ir atitinkamai siekė 0,90 ($AUC=0,90$) ir 0,88 ($AUC=0,88$). Pakankamai aukštu tikslumu pasižymėjo dviejų – trijų biožymenų paletės, sudarytos iš IL-6, IL-8, PCT ($AUC_{IL-6+IL-8+PCT}=AUC_{IL-8+PCT}=0,86$) (22 pav.). Taikant *Pearson* ranginės koreliacijos koeficientą, buvo įvertintas koreliacijos stiprumas tarp didžiausiu tikslumu pasižymėjusios paletės ir tarp dviejų ir trijų biožymenų paletėčių, sudarytų iš IL-6, IL-8 ir PCT. Koreliacija tarp paletės, kurią sudarė IL-6, IL-8, IL-10, sIL-2R bei PCT ir paletės, sudarytos iš IL-6, IL-8, PCT buvo stipri ($r_s = 0,92$; $p<0,0001$); stipria koreliacija pasižymėjo ir ryšys tarp paletės, sudarytos iš IL-8 ir PCT bei paletės, sudarytos iš IL-6, IL-8, IL-10, sIL-2R ir PCT ($r_s = 0,90$; $p<0,0001$).



23 pav. Suminis biožymenų tikslumas vertinant sepsį ir bakteremiją binarinės logistinės regresijos bei ROC kreivių metodu (antra diena).

$AUC_{IL-6+IL-8}=0,84$; $AUC_{IL-6+IL-8+IL-10}=0,86$; $AUC_{IL-ai}=0,86$; $AUC_{IL-ai+CRB}=0,89$;
 $AUC_{IL-ai+PCT}=0,96$; $AUC_{IL-ai+PCT+CRB}=0,96$; $AUC_{IL-6+IL-8+PCT}=0,93$;
 $AUC_{IL-8+PCT}=0,94$ (IL-ai=IL-6+IL-8+IL-10+sIL-2R; *sensitivity* – jautrumas;
specificity - specifiškumas).

Antrą dieną didžiausiu tikslumu bei gebėjimu diferencijuoti BS ir NKK grupes pasižymėjo paletės, sudarytos iš penkių bei šešių biožymenų, t.y. PCT, citokinų, citokinų tirpių receptorių (IL-6, IL-8, IL-10, sIL-2R) bei citokinų, citokinų tirpių receptorių (IL-6, IL-8, IL-10, sIL-2R), PCT ir CRB ir siekė 0,96 ($AUC=0,96$) (23 pav.). Kitų diagnostinio pobūdžio palečių, kurias sudarė nuo dviejų iki penkių biožymenų, tikslumas svyravo 0,84–0,94 ribose ($AUC=0,84$ –0,94). Taikant *Spearman* ranginės koreliacijos koeficientą, buvo įvertintas koreliacijos stiprumas tarp didžiausiu tikslumu pasižymėjusios paletės, kurią sudarė IL-6, IL-8, IL-10, sIL-2R bei PCT ir tarp dviejų - trijų biožymenų palečių, sudarytų iš IL-6, IL-8 ir PCT. Koreliacija tarp paletės, kurią sudarė IL-6,

IL-8, IL-10, sIL-2R bei PCT ir paletės, sudarytos iš IL-6, IL-8, PCT buvo stipri ($r_s = 0,91$; $p < 0,0001$); stipria koreliacija pasižymėjo ir ryšys tarp paletės, sudarytos iš IL-8 ir PCT bei paletės, sudarytos iš IL-6, IL-8, IL-10, sIL-2R ir PCT ($r_s = 0,93$; $p < 0,0001$).

6. REZULTATŲ APTARIMAS

Šiuo metu vyrauja visuotinai priimta klinikinė praktika visus onkohematologinėmis ligomis sergančius vaikus, kuriems chemoterapijos fone išsivystė karščiavimas bei neutropenija, stacionarizuoti bei taikyti gydymą plataus veikimo spektro intraveniniais antibiotikais (Ruokonen et al., 1999), nors įvairių studijų duomenimis bakterinė karščiavimo etiologija patvirtinama tik 10-45% febrilinės neutropenijos atvejų (Castagnola et al., 2007; Bakhshi et al., 2008; Klastersky et al., 2007). Todėl šio darbo pagrindinis tikslas buvo identifikuoti biožymenis, kurių pagalba būtų galima greitai ir tiksliai patvirtinti ar atmesti bakterinę infekciją vaikams FN epizodo metu, tam, kad tikslios laboratorinės diagnostikos pagalba būtų galima išvengti bereikalingo plataus spektro intraveninių antibiotikų skyrimo ir su tuo susijusių komplikacijų bei gyvenimo kokybės blogėjimo. Tinkamų biožymenų parinkimas šiam moksliniam darbui buvo atliekamas vadovaujantis tradiciniu moksliniu metodu, t.y. remiantis iškelta hipoteze, kad ūmaus bakterinio uždegimo bei sepsio patogenezėje dalyvaujančių biomolekulių koncentracijos pacientų kraujo serume turėtų kisti (didėti ar mažėti) ir šis pokytis turėtų atspindėti bakterinės infekcijos buvimą ar nebuvimą.

Šiame darbe buvo tyrinėjami citokinai (IL-6, IL-8, IL-10), tirpūs citokinų receptoriai (sIL-2R) bei kitos bioaktyvios molekulės (CRP, PCT, sHLA-G) ir analizuojami šių potencialių biožymenų koncentracijų pokyčiai pirmomis FN epizodo dienomis. Pacientai buvo suskirstyti į dvi

grupės (NKK ir BS) ir tris dienas iš eilės (išskyrus sHLA-G) buvo vertinama aukščiau paminėtų potencialių biožymenų koncentracija pacientų kraujo serume bei atliekamas pirmos dienos kraujo serumų mikrobiologinis įvertinimas.

Bakteriemijos ir sepsio dažnis tirtoje imtyje sudarė 35% ir šis rodiklis neprieštaruoja kitų tyrėjų rezultatams, kuriuose teigiama, kad bakterinio pobūdžio karščiavimas neutropenijos metu sudarė 10-45% visų FN atvejų (Castagnola et al., 2007; Bakhshi et al., 2008; Klastersky et al., 2007; Vellenga et al., 1996; Klastersky et al., 2000).

Keitėsi ir infekcijos sukėlėjų pobūdis. Praeito amžiaus pabaigoje išskirtinai vyravo gram-neigiami sukėlėjai, kai tuo tarpu paskutinio dešimtmečio tyrėjų duomenimis bakterinio pobūdžio komplikacijas FN metu sukeldavo tiek gram-neigiami, tiek gram-teigiami (vyraujant stafilokokinei infekcijai) sukėlėjai, kurių pasiskirstymas buvo apytikriai vienodas (Nijhuis et al., 2002; Pizzo, 1993; Palazzi, 2011; Castagnola et al., 2007). Teigiamas poslinkis link gram-teigiamų sukėlėjų, kaip bakterinio uždegimo etiologinio faktoriaus tarp pacientų su FN, siejamas su plačiai paplitusiu profilaktiniu plataus spektro geriamų antibiotikų vartojimu bei centrinių veninių kateterių naudojimu (Palazzi, 2011; Freifeld, 2011; Danilatou et al., 2003). Mūsų atlikto tyrimo duomenimis, gram-teigiami bakteriemijos sukėlėjai BS grupėje sudarė 42% (8 atvejai), vyraujant *Staphylococcus epidermidis* sukėlėjui, gram-neigiami sukėlėjai sudarė 52% (12 atvejų), vyraujant *Esherichia coli* bakterijai ir keletas sukėlėjų viename mėginyje buvo indentifikuota trijų bakteriemijos atvejų metu (6%).

Mūsų atliktame tyrime tirtų biožymenų (IL-6, IL-8, IL-10, sIL-2R, PCT, CRB, sHLA-G) savybes indentifikuoti bakterinę infekciją bei įvertinti jos riziką analizavome pirmą ir antrą FN epizodo dieną (pirmosios valandos kliniškai yra reikšmingiausios, nes gydytojas hematologas turi priimti sprendimą dėl gydymo taktikos pasirinkimo). Mes nustatėme, kad pirmą ir antrą FN epizodo dienomis IL-6, IL-8 ir PCT koncentracijų

medianos reikšmingai skyrėsi tarp NKK ir BS grupių. CRB koncentracijų mediana tarp nagrinėjamų grupių pirmą dieną statistiškai reikšmingai nesiskyrė ir statistinį reikšmingumą įgijo tik antrą FN epizodo dieną ir tai neprieštarauja kitų autorių (Miedema et al., 2011; Kalio et al., 2001) duomenims, kuriuose CRB tampa statistiškai reikšmingas vėliau t.y. antrą - trečią FN epizodų dienomis. Šių biožymenų tikslumas pirmą dieną svyravo 0,60-0,87 intervale (AUC=0,60-0,87). Labiausiai išreikštu gebėjimu diferencijuoti NKK ir BS grupes bei didžiausiu tikslumu pasižymėjo IL-6 (AUC=0,87), kai tuo tarpu IL-8 ir PCT tikslumas buvo mažesnis ir praktiškai vienodame lygyje (AUC_{IL-8}=0,81; AUC_{PCT}=0,79), o CRB siekė tik 0,60 (AUC=0,60). IL-10 tikslumas siekė 0,82 (AUC=0,82), o sIL-2R diagnostinis tikslumas buvo 0,74 (AUC=0,74).

Antrą FN epizodo dieną tiksliausias biožymuo buvo PCT ir siekė 0,89 (AUC_{PCT}=0,89), o kitų vertintų biožymenų tikslumas svyravo 0,72-0,82 ribose (AUC_{IL-6}=0,76; AUC_{IL-8}=0,82; AUC_{CRB}=0,72). sIL-2R ir IL-10 AUC reikšmės skyrėsi viena nuo kitos labai nedideliame intervale ir atitinkamai buvo 0,72 (AUC_{sIL-2R}=0,72) ir 0,74 (AUC_{IL-10}=0,74).

Vertindami nagrinėtų biožymenų (IL-6, IL-8, IL-10, sIL-2R, PCT, CRB) AUC rodiklio pokyčius (didėjimą ar mažėjimą) pirmą - antrą FN epizodo dienomis, galime teigti, kad IL-8, PCT, CRB tikslumas didėjo (stebimas šių biožymenų AUC didėjimas), kai tuo tarpu IL-6, IL-10, sIL-2R – mažėjo (AUC dinamikoje mažėjo). Mūsų atlikto tyrimo rezultatai koreliuoja su Philips ir kolegų (2012) atliktos meta-analizės bei kitų autorių duomenimis, tačiau galima pastebėti pakankamai didelį analizuotų rodiklių (ribinių verčių, jautrumo, specifiškumo, TNV, NNV) išsibarstymą. Paminėtų rodiklių skaitinių verčių heterogeniškumui atliktuose tyrimuose įtakos turėjo pakankamai nedidelės tyrinėtos imtys (nuo keliolikos iki keleto šimtų), skirtingai apibrėžiamos tiriamosios grupės bei tyrimo vertinamosios baigtys, biožymenų nustatymui naudojami skirtingi analizatoriai bei reagentai, individualaus genetinio polinkio bakterinei infekcijai bei FN ignoravimas bei nevertinimas,

mišrios tiriamosios grupės (hematologiniais ir solidiniais navikais sergantys) (Philips et al., 2012; Poele et al., 2009; Macher et al., 2010; Kitanovsky et al., 2006).

Pirmos ir antros dienos nagrinėtų biožymenų ribinės vertės buvo skirtingos, kai jautrumas bei specifiškumas buvo vertinami kaip vienodai reikšmingi biožymenis apibūdinantys rodikliai. Tačiau skirtingų ribinių verčių taikymas pirmą ir antrą FN epizodo dienomis vertinant bakterinę infekciją būtų nepatogus ir nepraktiškas kasdienėje gydytojo veikloje, todėl remiantis ROC kreivių analizės duomenimis buvo pasirinktos tos pačios ribinės vertės analogiškam biožymeniui, o tirtų biožymenų jautrumas, specifiškumas, NNV ir TNV vertinti bei analizuoti vienodų atitinkamo biožymens ribinių verčių kontekste.

Diagnostinėmis savybėmis pasižymintis biožymuo privalo turėti pakankamai didelį specifiškumą bei TNV, kai tuo tarpu atrankinio pobūdžio – didelį jautrumą bei NNV. Pirmą FN epizodo dieną labiausiai išreikštomis diagnostinėmis savybėmis tarp IL-6, IL-8 ir PCT pasižymėjo PCT biožymuo, kurio specifiškumas buvo 98%, o TNV – 91% (ribinei vertei esant 1,13 ng/ml), kai tuo tarpu atrankiniam tyrimui labiausiai tiko – IL-6 (jautrumas – 87%, NNV – 91%). Antrą dieną tinkamiausiu diagnostikai tarp šių biožymenų buvo IL-8 (specifiškumui esant 92%, o TNV – 81%), o atrankiniam tyrimui – PCT (jautrumas buvo 83%, NNV – 90%, ribinei vertei esant 1,13 ng/ml).

Analizavome ir kitų biožymenų, t.y. sIL-2R, IL-10 ir CRB savybes identifikuoti bakterinę infekciją bei įvertinti jos riziką. Šių biožymenų koncentracijų pokyčius vertinome pirmą ir antrą FN epizodo dieną ir nustatėme, kad pirmomis FN epizodo dienomis sIL-2R ir IL-10 koncentracijų medianos reikšmingai skyrėsi tarp NKK ir BS grupių, o CRB skaitinių verčių medianos įgijo statistinį reikšmingumą tik antrą FN epizodo dieną. Kaip ir su prieš tai minėtais biožymenimis, atlikome šių biožymenų ribinių verčių suvienodinimą pagal ROC kreivių analizės duomenis.

Pirmą bei antrą FN epizodo dieną labiau išreikštomis atrankinėmis savybėmis pasižymėjo sIL-2R biožymuo, kurio jautrumas buvo 79-80%, o NNV – 84-86%, kai tuo tarpu IL-10 jautrumas svyravo 47-67% ribose, o NNV – 74-81% tarpe. Diagnostinės šių biožymenų savybės buvo išreikštos silpniau, nes abiejų tirtų analizių TNV variavo pakankamai žemose ribose (TNV – 51-61%). Labiausiai išreikštomis atrankinėmis savybėmis antrą FN epizodo dieną pasižymėjo CRB, kurio jautrumas buvo 93%, o NNV – 92% (ribinei vertei esant 61 mg/l).

Vieni iš dažniausių klinikinėje praktikoje naudojamų biožymenų, skirtų uždegiminių bei bakterinių procesų organizme vertinimui, yra CRB bei PCT. Tiksliai diagnostikai labai svarbi atitinkamo biožymens ribinė vertė, kuri žymi ribą tarp normos ir tam tikros patologinės būsenos. Kasdienėje gydytojo praktikoje dažniausiai taikoma CRB ribinė vertė bakterinės infekcijos diagnostikai pacientams su santykinai normaliu imuniniu atsaku yra 50 mg/l (Povoa et al., 1998). Mūsų tyrimo duomenimis, CRB ribinė vertė buvo aukštesnė ir siekė 61 mg/l (nežymų CRB ribinės vertės skirtumą tarp visuotinai priimtos ir mūsų tyrime gautos galima būtų sieti su specifine tiriamąja imtimi, kurią sudarė pacientai, esantys įvairaus laipsnio imunosupresinėje būklėje). Taikant šią ribinę vertę, antrą FN epizodo dieną atmesti bakteriemiją ir sepsį (tyrimo rezultatui esant neigiamam) buvo galima 92% tikslumu (NNV buvo 92%, jautrumas – 93%). PCT ribinės vertės sepsio bei septinio šoko diagnostikai Wacker ir kolegų (2013) atliktos meta-analizės duomenimis varijuoja nuo 0,5 iki 2,2 ng/ml. Mūsų atliktame tyrime PCT ribinė vertė buvo 1,13 ng/ml ir tai neprieštarauja paminėtos meta-analizės rezultatams (Wacker et al., 2013), be to, taikant šią ribinę vertę pirmą dieną patvirtinti bakteriemiją - sepsį buvo galima 91% tikslumu (TNV buvo 91%, specifiškumas - 98%), o antrą dieną PCT labiau tiko bakteriemijos bei sepsio atmetimui (tyrimo rezultatui esant neigiamam) 90% tikslumu (NNV buvo 90%, jautrumas – 83%).

Pirmą kartą sHLA-G buvo vertinamas ir analizuojamas kaip potencialus bakteriemijos bei sepsio indentifikavimo biožymuo. sHLA-G kaip ir IL-10 pasižymi imunosupresinėmis savybėmis, be to, HLA-G ekspresiją įtakoja IL-10 (Hofmeister et al., 2003; Moreau et al., 1999). Mūsų tyrimų duomenimis, pirmą FN epizodo dieną sHLA-G koncentracijų medianos reikšmingai skyrėsi tarp NKK ir BS grupių, o tikslumas siekė 0,72 (AUC=0,72). Šis biožymuo pasižymėjo labiau išreikštomis atrankinėmis savybėmis t.y. bakteriemijos bei sepsio atmetimui (neigiamas rezultatas), ribinei vertei esant 2,54 V/ml (jautrumas buvo 73%, NNV – 83%).

Šiame tyrime vertinome ir aukščiau paminėtų biožymenų pritaikomumą ligos eigos monitoravimui bei atsako į gydymą antibiotikais vertinimui. Kaip žinome, vienas iš pagrindinių reikalavimų, taikomų ligos eigos sekimui ar atsakui į gydymą naudojamiems biožymenims, yra jų glaudžios sąsajos su ligos ar sindromo patogenezė. Be to, naudojami šiam tikslui biožymenys turi pasižymėti ir pakankamai trumpu gyvavimo pusperiodžiu. Mūsų atliktame tyrime kaip potencialius monitoravimo žymenis vertinome IL-6, IL-8, IL-10, sIL-2R, PCT, CRB. Tris dienas iš eilės buvo tiriami šių analizių koncentracijų pokyčiai BS grupėje bei vertinamas šių biožymenų koncentracijų pokyčių statistinis reikšmingumas. Tam, kad vieną ar kitą analizę būtų galima naudoti kaip monitoravimo biožymenį, statistiškai reikšmingas koncentracijų skirtumas turėtų būti stebimas pirmą - antrą bei antrą - trečią dienomis. Deja, statistiškai reikšmingu koncentracijos pokyčiu pirmą - antrą, antrą - trečią dienomis nepasižymėjo nei viena iš tirtų analizių. Tačiau analizuojant koncentracijų pokyčius galima įžvelgti tam tikras biožymenų koncentracijų kitimo tendencijas – IL-6, IL-8, IL-10 koncentracijos mažėjo (statistiškai reikšmingas buvo IL-10 koncentracijos pokytis pirmą - antrą dienomis), sIL-2R – palaipsniui didėjo, o CRB ir PCT – pirmą - antrą dienomis statistiškai reikšmingai didėjo, o antrą - trečią dienomis ėmė mažėti. Visus šiuos biožymenų

pokyčius galima būtų sieti su plataus spektro antibiotikų paskyrimu pirmą FN epizodo dieną, tačiau šiam teiginiui patvirtinti reikėtų detalesnių studijų.

Savo tyrime mes vertinome kiekvieno biožymens tikslumą ir gebėjimą diferencijuoti NKK ir BS grupes arba kitais žodžiais tariant vertinome biožymenų gebėjimą patvirtinti ar atmesti bakterinę infekciją pirmomis FN epizodo dienomis. Vertintų biožymenų tikslumas pirmą - antrą dienomis svyravo 0,72-0,89 ribose ($AUC=0,72-89$), išskyrus pirmos dienos CRB, kuris tesiekė 0,60 ($AUC=0,60$) ir nebuvo statistiškai reikšmingas. Be to, taikant binarinę logistinę regresiją, buvo sukurti modeliai, kuriuos sudarė nuo 2 iki 7 biožymenų paletės, kurie toliau buvo analizuojami taikant ROC kreivių metodą. Didžiausiu gebėjimu diferencijuoti NKK ir BS grupes pirmą bei antrą dieną pasižymėjo diagnostinė paletė, kurią sudarė citokinai, citokinų tirpūs receptoriai ir PCT (5 biožymenų paletė), kurių AUC atitinkamai buvo 0,91 (pirmą dieną), o antrą dieną siekė net 0,96. Palyginus šių paletėčių ir atitinkamų pavienių citokinų AUC reikšmes pirmą ir antrą dieną, galime daryti išvadą, kad taikydami paletes galime pasiekti didesnę tikslumą, kuris pirmą dieną būtų +0,04 ($AUC_{IL-6}=0,87$; $AUC_{ILs+PCT}=0,91$), o antrą dieną būtų +0,07 ($AUC_{PCT}=0,89$; $AUC_{ILs+PCT}=0,96$). Tačiau kasdienėje praktikoje bakteriemijos bei sepsio vertinimui naudoti penkis biožymenis būtų nepatogu ir pakankamai brangu. Todėl taikant *Spearman* ranginės koreliacijos koeficientą, buvo įvertintas koreliacijos stiprumas tarp šios penkių biožymenų paletės bei paletės, kurią sudarė IL-8 ir PCT. Pirmos dienos paletėčių skaitinių verčių koreliacija buvo stipri ir siekė 0,90 ($r_s=0,90$), o antros dienos koreliacija buvo nežymiai stipresnė ir siekė 0,93 ($r_s=0,93$). Taigi įvertinus šiuos duomenis galime daryti išvadą, kad praktikoje vietoj penkių biožymenų (IL-6, IL-8, IL-10, sIL-2R, PCT) bakteriemijos - sepsio vertinimui galime naudoti du biožymenis (IL-8 bei PCT), išlaikant tą patį diagnostinį tikslumą.

Įvertinus pavienių biožymenų AUC vertes pirmą ir antrą dieną bei AUC verčių dinamiką (didėjimą ar mažėjimą) pirmomis FN epizodo dienomis galime teigti, kad tiksliausi biožymenys yra IL-6, IL-8 bei PCT. Šie mūsų tyrime gauti rezultatai neprieštarauja Philips ir kolegų (2012) atliktos biožymenų meta-analizės išvadoms, kuriose teigiama, kad IL-6, IL-8 bei PCT turėtų būti toliau tyrinėjami didesnės apimties klinikinėse studijose kaip potencialūs ir daug žadantys bakterinio proceso biožymenys FN epizodų metu.

Apibendrinus atliktų tyrimų duomenis, galima teigti, kad šiame darbe tyrinėti citokinai, citokinų tirpūs receptoriai bei kitos bioaktyvios molekulės gali būti naudojami kaip pagalbinė priemonė klinikinėje praktikoje vertinant bakteriemiją ir sepsį, tačiau išsamesnės ir didesnės apimties klinikinės studijos su aiškiai apibrėžtais tyrimo tikslais bei uždaviniais reikalingos tam, kad būtų įvertintas PCT, IL-6, IL-8, sHLA-G bei IL-10, sIL-2R tinkamumas identifikuojant bakterinę infekciją FN epizodų metu.

7. IŠVADOS

- 1) Bakteriemijos bei sepsio vertinimui FN epizodų metu tiksliausi biožymenys citokinų, citokinų receptorių grupėje pirmą FN epizodo dieną buvo IL-6 (AUC=0,87), IL-10 (AUC=0,82) ir IL-8 (AUC=0,81), antrą FN epizodo dieną – IL-8 (AUC=0,82) ir IL-6 (AUC=0,76);
- 2) Bakteriemijos ir sepsio vertinimui FN epizodų metu tiksliausias biožymuo tarp kitų uždegimo patogenezėje dalyvaujančių biomolekulių buvo PCT, kurio AUC pirmą bei antrą dienomis atitinkamai buvo 0,79 ir 0,89;

- 3) Pirmą FN epizodo dieną labiausiai išreikštomis diagnostinėmis savybėmis pasižymėjo PCT biožymuo, kurio specifiškumas buvo 98%, o TNV – 91%, kai tuo tarpu atrankiniam tyrimui labiausiai tiko – IL-6 (jautrumas – 87%, NNV – 91%). Antrą dieną tinkamiausiu diagnostikai buvo IL-8 (specifiškumas buvo 92%, o TNV – 81%), o atrankiniam tyrimui – CRB (jautrumas buvo 93%, NNV – 92%);

- 4) Bakteriemijos bei sepsio vertinimui FN epizodų metu naudojant biožymenų paletes tikslumas didėja, t.y. pirmą dieną +0,04 ($AUC_{IL-6}=0,87$; $AUC_{ILs+PCT}=0,91$), o antrą dieną +0,07 ($AUC_{PCT}=0,89$; $AUC_{ILs+PCT}=0,96$);

- 5) Monitoravimui analizuoti citokinai, citokinų tirpūs receptoriai, CRB ir PCR netiko, nes jų koncentracijos pokyčiai pirmą - trečią FN epizodo dienomis nebuvo statistiškai reikšmingi, tačiau buvo galima įžvelgti šių biožymenų pokyčių tendencijas, t.y. IL-6, IL-8, IL-10 koncentracijos mažėjo; CRB, PCT koncentracijos pirmą - antrą dieną didėjo, trečią dieną mažėjo; sIL-2R koncentracija didėjo.

8. LITERATŪROS SĄRAŠAS

1. Agyeman P, Aebi C, Hirt A, et al. Predicting bacteremia in children with cancer and fever in chemotherapy-induced neutropenia: Results of the prospective multicenter SPOG 2003 FN study. *Pediatr Infect Dis J* 2011; 30:e114-e119.
2. Aikawa N, Fujishima S, Endo S, et al. Multicenter prospective study of procalcitonin as an indicator of sepsis. *J Infect Chemother* 2005; 11(3):152-159.
3. Akashi-Takamura S, Miyake K. TLR accessory molecules. *Curr Opin Immunol* 2008; 20:420-425.
4. Akira S, Takeda K, Kaisho T, et al. Toll-like receptors: critical proteins linking innate and acquired immunity. *Nat Immunol* 2001; 2:675-680.
Akira S, Uematsu S, Takeuchi O. Pathogen recognition and innate immunity. *Cell* 2006; 124:197-216.
5. Ambrahamsson J, Pahiman M, Mellander L. Interleukin 6, but not tumour necrosis factor-alpha, is a good predictor of severe infection in febrile neutropenic and non-neutropenic children with malignancy. *Acta Paediatr* 1997; 86(10):1059-64.
6. Ammann RA, Tissing WJ, Phillips B. Rationalizing the approach to children with fever and neutropenia. *Curr Opin Infect Dis* 2012; 25:258-265.
7. Ansar W, Ghosh S. C-reactive protein and the biology of disease. *Immunol Res* 2013; DOI 10.1007/s12026-013-8384-0.
8. Atkinson AJ, Colburn WA, DeGruttola VG, et al. Biomarkers and surrogate endpoints: Preferred definitions and conceptual framework. *Clinical Pharmacology & Therapeutics* 2001; 69:89-95.
9. Badurdeen S, Hodge G, Osborn M, et al. Elevated Serum Cytokine Levels Using Cytometric Bead Arrays Predict Culture Positive Infections in Childhood Oncology Patients With Febrile Neutropenia. *J Pediatr Hematol Oncol* 2012; 43:e36-e38.

10. Baggiolini M, Dewald B, and Moser B. Human chemokines: an update. *Annu Rev Immunol* 1997; 15:675–705.
11. Bahri R, Naji A, Menier C, et al. Dendritic Cells Secrete the Immunosuppressive HLA-G Molecule upon CTLA4-Ig Treatment: Implication in Human Renal Transplant Acceptance. *J Immunol* 2009; 183:7054-7062.
12. Becker KL. Procalcitonin and the Calcitonin Gene Family of Peptides in Inflammation, Infection, and Sepsis: A Journey from Calcitonin Back to Its Precursors. *J Clin Endocrinol Metab* 2004, 89:1512-1525.
13. Bakhshi S, Padmanjali KS, Arya LS. Infections in childhood acute lymphoblastic leukemia: an analysis of 222 febrile neutropenic episodes. *Pediatr Hematol Oncol* 2008; 25:385-392.
14. Belkaid Y. Regulatory T cells and infection: a dangerous necessity. *Nat Rev Immunol* 2007; 7:875-888.
15. Bates DW, Sands K, Miller E, et al. Predicting bacteremia in patients with sepsis syndrome. Academic Medical Center Consortium Sepsis Project Working Group. *J Infect Dis* 1997; 176:1538–1551.
16. Bhoj VG, Chen ZJ. Ubiquitilation in innate and adaptive immunity. *Nature* 2009; 458:430-437. Black S, Kushner I, Samols D. C-reactive Protein. *J Biol Chem* 2004; 279(47):48487–48490.
17. Bley JY, Chauvin F, Le Cesne A, et al. Early lymphopenia after cytotoxic chemotherapy as a risk factor for febrile neutropenia. *J Clin Oncol* 1996; 14:636-643.
18. Bodey GP, Buckley M, Sathe YS, et al. Quantitative relationships between circulating leukocytes and infection in patients with acute leukemia. *Ann Intern Med* 1966; 64(2):328-340.
19. Bone RC. Immunologic dissonance: a continuing evolution in our understanding of the systemic inflammatory response syndrome (SIRS) and the multiple organ dysfunction syndrome (MODS). *Ann Intern Med* 1996; 125:680-687.

20. Borregaard N. Neutrophils, from marrow to microbes. *Immunity* 2010; 33:657–670.
21. Bossuyt PM, Reitsma JB, Bruns DE, et al. The STARD Statement for Reporting Studies of Diagnostic Accuracy: Explanation and Elaboration. *Clin Chem* 2003; 49(1):7-18.
22. Boyman O, Sprent J. The role of interleukin-2 during homeostasis and activation of the immune system. *Nat Rev Immunol* 2012; 12:180-190.
23. Buyukberber N, Buyukberber S, Sevinc A, et al. Cytokine concentrations are not predictive of bacteremia in febrile neutropenia patients. *Med Oncol* 2009; 26:55-61.
24. Carnino L, Betteto S, Loiacono M, et al. Procalcitonin as a predictive marker of infections in chemoinduced neutropenia. *J Cancer Res Clin Oncol* 2010; 136:611–615.
25. Carosella ED, Favier B, Rouas-Freiss N, et al. Beyond the increasing complexity of the immunomodulatory HLA-G molecule. *Blood* 2008; 111:4862-4870.
26. Castagnola E, Fontana V, Caviglia I, et al. A prospective study on the epidemiology of febrile episodes during chemotherapy-induced neutropenia in children. *Clin Infect Dis* 2007; 45:1296-1304.
27. Castellheim A, Brekke OL, Espevik T, et al. Innate Immune Responses to Danger Signals in Systemic Inflammatory Response Syndrome and Sepsis. *Scandinavian Journal of Immunology* 2009; 69:479-491.
28. Charo IF, Ransohoff RM. The many roles of chemokines and chemokine receptors in inflammation. *NEJM* 2006; 354:610-621.
29. Colonna MJ, Samaridis M, Cella M, et al. Human myelomonocytic cells express an inhibitory receptor for classical and nonclassical MHC class I molecules. *J Immunol* 1998; 160:3096–3100.
30. Crokaert F. Febrile neutropenia in children. *Int J Antimicrob Agents* 2000; 16:173-176.

31. Danilatou V, Mantadakis E, Galanakis E, et al. Three cases of viridans group streptococcal bacteremia in children with febrile neutropenia. *Scand J Infect Dis* 2003; 35:873-876.
32. De Bont ESJM, Vellenga E, Swaanenburg JCJM, et al. Plasma IL-8 and IL-6 levels can be used to define a group with low risk of septicemia among cancer patients with fever and neutropenia. *Brit J Haematol.* 1999; 107:375-380.
33. De Bont ESJM, Kimpen JL, Tamminga RY, et al. Intrinsic capacity of monocytes to produce cytokines ex vivo in patients with acute lymphoblastic leukaemia. *Cytokine* 2000; 12:1723–1726.
34. De Bont ES, Vellenga E, Swaanenburg JC, et al. Plasma IL-8 and IL-6 levels can be used to define a group with low risk of septicemia among cancer patients with fever and neutropenia. *Br J Haematol* 1999; 107:375–380.
35. Deis JN, Creech CB, Estrada CM, et al. Procalcitonin as a Marker of Severe Bacterial Infection in Children in the Emergency Department. *Pediatr Emer Care* 2010; 26:51-63.
36. Denecker NE, Kullberg BJ, Drenth JP, et al. Regulation of the production of pro-inflammatory cytokines and antagonists during chemotherapy-induced neutropenia in patients with haematological malignancies. *Cytokine* 1997; 9:702–710.
37. Diepold M, Noellke P, Duffner U, et al. Performance of Interleukin-6 and Interleukin-8 serum levels in pediatric oncology patients with neutropenia and fever for the assessment of low-risk. *BMC Infectious Diseases* 2008; 8:28 doi:10.1186/1471-2334-8-28.
38. Dotta L, Tassone L, Badolato R. Clinical and genetic features of warts, hypoglobulinemia, infections and myelokathexis (WHIM) syndrome. *Curr Mol Med* 2011; 11:317–325.
39. Du B, Pan J, Chen D, Li Y. Serum procalcitonin and interleukin-6 level may help to differentiate systemic inflammatory response of infectious and non-infectious origin. *Chin Med J*

(Engl) 2003; 116(4):538-42.

40. Dubos F, Delebarre M, Martinot A. Predicting the risk of severe infection in children with chemotherapy-induced febrile neutropenia.

Curr Opin Hematol 2012; 19:39-43.

41. Eckmann L, Karin M. NOD2 and Crohn's disease: loss or gain of function? *Immunity* 2005; 22:661-667.

42. Eda S, Kaufmann J, Roos W, et al. Development of a New Microparticle-Enhanced Turbidimetric Assay for C-reactive Protein with Superior Features in Analytical Sensitivity and Dynamic Range. *J Clin Lab Anal* 1998; 12:137-144.

43. Edmond MB, Ober JF, Weinbaum DL, et al. Vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* bacteremia: risk factors for infection. *Clin Infect Dis* 1995; 20:1126-1133.

44. Engel A, Steinbach G, Kern P, et al. Diagnostic value of procalcitonin serum levels in neutropenic patients with fever: comparison with Interleukin-8. *Scand J Infect Dis* 1999; 31:185-9.

45. Engervall P, Granstrom M, Andersson B, et al. Monitoring of endotoxin, interleukin-6 and C-reactive protein serum concentrations in neutropenic patients with fever. *Eur J Haematol* 1995; 54:226-34.

46. Ermolaeva MA, Michallet MC, Papadoupoulou N, et al. Function of TRADD in tumor necrosis factor receptor 1 signaling and in TRIF-dependent inflammatory responses. *Nat Immunol* 2008; 9:1037-1046.

47. Faraoni I, Antonetti FR, Cardone J, et al. miR-155 gene: a typical multifunctional microRNA. *Biochim Biophys Acta* 2009; 1792:497-505.

48. Faure E, Equils O, Sieling PA, et al. Bacterial lipopolysaccharide activates NF-kappaB through toll-like receptor 4 (TLR-4) in cultured human dermal endothelial cells. Differential expression of TLR-4 and TLR-2 in endothelial cells. *J Biol Chem* 2000; 275:11058-11063.

49. Feger U, Tolosa E, Huang YH, et al. HLA-G expression defines a novel regulatory T cell subset present in human peripheral blood and sites of inflammation. *Blood* 2007; 110:568-577.

50. Feld R, Bodey GP. Infections in patients with malignant lymphoma treated with combination chemotherapy. *Cancer* 1977; 39:1018-1025.
51. Finberg RW, Talcott JA. Fever and neutropenia – how to use a new treatment strategy. *N Engl J Med* 1999; 341(5):362-368.
52. Fleischhack G, Kambeck I, Cipic D, et al. Procalcitonin in pediatric cancer patients: its diagnostic relevance is superior to that of C reactive protein, interleukin 6, interleukin 8, soluble interleukin 2 receptor and soluble tumour necrosis factor receptor II. *Brit J Haematol* 2000; 111:1093-1102.
53. Foster M, Samman S. Zinc and Regulation of Inflammatory Cytokines: Implications for Cardiometabolic Disease. *Nutrients* 2012; 4:676-694.
54. Freifeld AG. Clinical practice guideline for the use of antimicrobial agents in neutropenic patients with cancer. *Clin Infect Dis* 2011; 52:e56-e93.
55. Freycon F, Trombert-Paviot B. Trends in treatment-related deaths (TRDs) in childhood cancer and leukemia over time: a follow-up of patients included in the cancer registry of the Rhone-Alpes region in France (ARCERRA). *Pediatr Blood Cancer* 2008; 50:1213-1220.
56. Fritz JH, Ferrero RL, Philpott DJ, et al. Nod-like proteins in immunity, inflammation and disease. *Nat Immunol* 2006; 7:1250-1257.
57. Friedland JS, Suputtamongkol Y, Remick DG, et al.. Prolonged elevation of interleukin-8 and interleukin-6 concentrations in plasma and of leukocyte interleukin-8 mRNA levels during septicemic and localized *Pseudomonas pseudomallei* infection. *Infect Immun* 1992; 60: 2402–2408.
58. Gabay C, Kushner I. Acute-phase proteins and other systemic responses to inflammation. *N Engl J Med* 1999; 340:448–54.
59. Gaïni S, Græsbøll Koldkjær O, Pedersen C. Procalcitonin, lipopolysaccharide-binding protein, interleukin-6 and C-reactive protein in community-acquired infections and sepsis: a

- prospective study. *Critical Care* 2006; 10:R53.
60. Garnacho-Montero J, Ortiz-Leyba C, Herrera-Melero I, et al. Mortality and morbidity attributable to inadequate empirical antimicrobial therapy in patients admitted to the ICU with sepsis: a matched cohort study. *J Antimicrob Chemother* 2008; 61:436–41.
61. Gilchrist M, Thorsson V, Li B, et al. Systems biology approaches identify ATF3 as a negative regulator of Toll-like receptor 4. *Nature* 2006; 441:173-178.
62. Granucci F, Vizzardelli C, Pavelka N, et al. Inducible IL-2 production by dendritic cells revealed by global gene expression analysis. *Nat Immunol* 2001; 2:882-888.
63. Goldstein B, Giroir B, Randolph A, et al. International pediatric sepsis consensus conference: Definitions for sepsis and organ dysfunction in pediatrics. *Pediatr Crit Care Med* 2005; 6(1):2-8.
64. Gonzalez A, Rebmann V, LeMaoult J, et al. The immunosuppressive molecule HLA-G and its clinical Implications. *Critical Reviews in Clinical Laboratory Sciences* 2012; 49(3):63–84.
65. Guttman M, Amit I, Garber M, et al. Chromatin signature reveals over a thousand highly conserved large non-coding RNAs in mammals. *Nature* 2009; 458:223-227.
- Haas T, Metzger J, Schmitz F, et al. The DNA sugar backbone 2' deoxyribose determines toll-like receptor 9 activation. *Immunity* 2008; 28:315-323.
66. Hack CE, Hart M, van Schijndel RJ, et al. Interleukin-8 in sepsis: relation to shock and inflammatory mediators. *Infect Immun* 1992; 60:2835–2842.
67. Hager M, Cowland JB, Borregaard N. Neutrophil granules in health and disease. *J Intern Med* 2010; 268:25–34.
68. Hajishengaliis G, Lambris JD. Crosstalk pathways between Toll-like receptors and the complement system. *Trends in immunology* 2010; 31:154-163.

69. Hann I, Viscoli C, Paesmans M, et al. A comparison of outcome from febrile neutropenic episodes in children compared with adults; results from four EORTC studies. International Antimicrobial Therapy Cooperative Group (IATCG) of the European Organization for Research and Treatment of Cancer (EORTC). *Br J Haematol* 1997; 99:580-588.
70. Hanley JA, McNeil BJ. A method of comparing the areas under receiver operating characteristic curves derived from the same cases. *Radiology* 1983; 148:839–843.
71. Hatzistilianou M, Rekliti A, Athanassiadou F, et al. Procalcitonin as an early marker of bacterial infection in neutropenic febrile children with acute lymphoblastic leukemia. *Inflamm Res* 2010; 59:339-347.
72. Herrmann JL, Blanchard H, Brunengo P, et al. TNF-alpha, IL-1 beta and IL-6 plasma levels in neutropenic patients after onset of fever and correlation with the C-reactive protein (CRP) kinetic values. *Infection* 1994; 22:309–315.
73. Higienos institutas, Sveikatos informacijos centras. Mirties priežastys 2011. http://www.hi.lt/images/Mirties%20priezastys_2011.pdf
74. Hippenstiel S, Soeth S, Kellas B, et al. Rho proteins and p38-MAPK pathway are important mediators for LPS-induced interleukin-8 expression in human endothelial cells. *Blood* 2000; 95:3044-3051.
75. Hirschfield GM, Pepys MB. C-reactive protein and cardiovascular disease: new insights from an old molecule. *Q J Med* 2003; 96:793–807.
76. Hodgson-Viden H, Grundy PE, Robinson JL. Early discontinuation of intravenous antimicrobial therapy in pediatric oncology patients with febrile neutropenia. *BMC Pediatr* 2005; 5(1):10.
77. Hoebe K, Janssen E, Beutler B. The interface between innate and adaptive immunity. *Nat Immunol* 2004; 5:971-974.
78. Hofmeister V, Weiss EH. HLA-G modulates immune responses by diverse receptor interactions. 2003; *Seminars in Cancer Biology* 13: 317–323.

79. Hynninen M, Valtonen M, Vaara M, et al. Plasma endotoxin and cytokine levels in neutropenic and non-neutropenic bacteremic patients. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1995; 14(12):1039-45.
80. Ishii E, Ohga S, Ueda K, Akazawa K. Serum interleukin-1 and tumor necrosis factor activities in febrile children with acute leukemia. *Int J Hematol* 1991; 54:79–84.
81. Inohara N, Chamaillard M, McDonald C, et al. NOD-LLR proteins: role in host-microbial interactions and inflammatory disease. *Annu Rev Biochem* 2005; 74:355-383.
82. Yamamoto M, Yamazaki S, Uematsu S, et al. Regulation of Toll/IL-1-receptor-mediated gene expression by the inducible nuclear protein I κ B ζ . 2004 *Nature*; 430:218-222.
83. Yentis SM, Soni N, Sheldon J. C reactive protein as an indicator of resolution of sepsis in the intensive care unit. *Care Med* 1995; 21:602-605.
84. Janeway CA Jr. Approaching the asymptote? Evolution and revolution in immunology. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol.* 1989; 54:1-13.
85. Janeway CA Jr, Medzhitov R. Innate immune recognition. *Annu Rev Immunol* 2002; 20:197-216.
86. Jenkins SH. Homogeneous enzyme immunoassay. *J Immunol Meth* 1992; 150:91-97.
87. Jin MS, Kim SE, Heo JY, et al. Crystal structure of the TLR1-TLR2 heterodimer induced by binding of a tri-acylated lipopeptide. *Cell* 2007; 130:1071-1082.
88. Johnson AM. A new international reference preparation for proteins in human serum. *Arch Pathol Lab Med* 1993; 117:29-31.
89. Jones SA. Directing Transition from Innate to Acquired Immunity: Defining a Role for IL-6. *J Immunol* 2005; 175:3463-3468.
90. Kallio R, Bloigu A, Surcel HM, et al. C reactive protein and erythrocyte sedimentation rate in differential diagnosis between

- infections and neoplastic fever in patients with solid tumours and lymphomas. *Support Care Cancer* 2001; 9:124-129.
91. Kang JY, Nan X, Jin MS, et al. Recognition of lipopeptide patterns by Toll-like receptor 2 Toll-like receptor 6 heterodimer. *Immunity* 2009; 31:873-884.
92. Kaplan JM, Wong HR. Biomarker discovery and development in pediatric critical care medicine. *Pediatr Crit Care Med* 2011; 12(2):165-173.
93. Kasiulevičius V, Denapienė G. Statistikos taikymas mokslinių tyrimų analizėje. *Gerontologija* 2008; 9(3):176–180.
94. Kawai T, Akira S. The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: update on Toll-like receptors. *Nat Immunol* 2010; 11(5):373-383.
95. Kawagoe T, Sato S, Matsushita K, et al. Sequential control of Toll-like receptor-dependent responses by IRAK1 and IRAK2. *Nat Immunol* 2008; 9:684-691.
96. Kitanovski L, Jazbec J, Hojker S, et al. Diagnostic accuracy of procalcitonin and interleukin-6 values for predicting bacteremia and clinical sepsis in febrile neutropenic children with cancer. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2006; 25: 413–415.
97. Kimura A, Kishimoto T. IL-6: Regulator of Treg/Th17 balance. *Eur J Immunol* 2010; 40: 1830–1835.
98. Klastersky J, Paesmans M, Rubenstein EB, et al. The Multinational Association for supportive care in cancer risk index: a multinational scoring system for indentifying low-risk febrile neutropenic cancer patients. *J Clin Oncol* 2000; 18:3038-3051.
99. Klastersky J, Ameye L, Maertens J, et al. Bacteraemia in febrile neutropenic cancer patients. *Int J Antimicrob Agents* 2007; 30(suppl 1):S51-S59.

100. Klassen RJ, Goodman TR, Pham B, et al. "Low risk" prediction rule for pediatric oncology patients presenting with fever and neutropenia. *J Clin Oncol* 2000; 18(5):1012-1019.
101. Kobayashi K, Chamaillard M, Ogura Y, et al. Nod2-dependent regulation of innate and adaptive immunity in the intestinal tract. *Science* 2005; 307:731-734.
102. Kolaczowska E, Kubes P. Neutrophil recruitment and function in health and inflammation. *Nat Rev Immunol* 2013; 13:159-175.
103. Krieg C, Letourneau S, Pantaleo G, et al. Improved IL-2 immunotherapy by selective stimulation of IL-2 receptors on lymphocytes and endothelial cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 2010; 107:11906-11911.
104. Lehrnbecher T, Koehl U, Wittekindt B, et al. Changes in host defense induced by malignancies and antineoplastic treatment: implication for immuno-therapeutic strategies. *Lancet Oncol* 2008; 9:269-278.
105. Lehrnbecher T, Fleischhack G, Hanisch M, et al. Circulating levels and promoter polymorphisms of interleukins-6 and 8 in pediatric cancer patients with fever and neutropenia. *Haematologica* 2004; 89:232-236.
106. Lehrnbecher T, Venzon D, de Haas M, et al. Assessment of measuring circulating levels of interleukin-6, interleukin-8, C-reactive protein, soluble Fc gamma receptor type III and mannose-binding protein in febrile children with cancer and neutropenia. *Clin Infect Dis* 1999; 29:414–9.
107. Ley K, Smith E, Stark MA. IL-17A-producing neutrophil-regulatory Tn lymphocytes. *Immunol Res* 2006; 34:229–242.
108. Lieschke GJ. Mice lacking granulocyte colony-stimulating factor have chronic neutropenia, granulocyte and macrophage progenitor cell deficiency, and impaired neutrophil mobilization. *Blood* 1994; 84:1737–1746.

109. Lietuvos vėžio registras 2009. <http://www.vuoi.lt/index.php?-2043095342>
110. Lin WW, Karin M. Cytokine mediated link between innate immunity, inflammation and cancer. *J Clin Invest* 2007; 117:1175-1183.
111. Lindqvist CA, Christiansson LH, Simonsson B, et al. T regulatory cells control T cell proliferation partly by the release of soluble CD25 in patients with B cell malignancies. *Immunology* 2010; 131:371-376.
112. Lovell DP. Commentary: statistics for biomarkers. *Biomarkers* 2012; DOI: 10.3109/1354750X.2012.656287.
113. Liu XL, Du B, Pan JQ, et al. Role of procalcitonin in the differentiation and surveillance of systemic inflammatory response syndrome. *J Infect Chemother* 2005; 11(1):48-52.
114. LR SAM, Higienos instituto SIC. Lietuvos sveikatos statistika 2010. <http://www.hi.lt/images/Lietuvos%20sveikatos%20statistika2010.pdf>
115. Luzzani A, Polati E, Dorizzi R, et al. Comparison of procalcitonin and C-reactive protein as markers of sepsis. *Crit Care Med* 2003; 31(6):1737-1741.
116. Macher E, Dubos F, Garnier N, et al. Predicting the Risk of Severe Bacterial Infection in Children with Chemotherapy-Induced Febrile Neutropenia. *Pediatr Blood Cancer* 2010; 55:662-667.
117. Maher DW, Lieschke GJ, Green M, et al. Filgrastim in patients with chemotherapy-induced febrile neutropenia. A double-blind, placebo-controlled trial. *Ann Intern Med* 1994; 121:492-501.
118. Malek TR. The biology of interleukin-2. *Annu Rev Immunol* 2008; 26:453-479.
119. Mancuso G, Gambuzza M, Midiri A, et al. Bacterial recognition by TLR7 in the lysosomes of conventional dendritic cells. *Nat Immunol* 2009; 10:587-594.
120. Marshall JC, Reinhart K. Biomarkers of sepsis. *Crit Care Med* 2009; 37(7):2290-2298.

121. Marshall JC, Vincent JL, Guyatt G, et al. Outcome measures for clinical research in sepsis: A report of 2nd Cambridge Colloquium of the International Sepsis Forum. *Crit Care Med* 2005; 33(8):1708-1716.
122. Matsushita K, Takeuchi O, Standley DM, et al. Zc3h12a is an RNase essential for controlling immune responses by regulating mRNA decay. *Nature* 2009; 458:1185-1190.
123. McPherson RA, Pincus MR. *Henry's Clinical Diagnosis and Management by Laboratory Methods*. 21st edition. Saunders Elsevier. 2007.
124. Medzhitov R. Recognition of microorganisms and activation of the immune response. *Nature* 2007; 449:819-826.
125. Medzhitov R. Origin and physiological roles of inflammation. *Nature* 2008; 454:428-435.
126. Medzhitov R. Inflammation 2010: New Adventures of an Old Flame. *Cell* 2010; 140:771-776.
127. Medzhitov R. Innate immunity: *quo vadis?* *Nat Immunol* 2010; 11(7):551-553.
128. Meylan E, Tschopp J, Karin M. Intracellular pattern recognition receptors in the host response. *Nature* 2006; 442:39-44.
129. Mian A, Becton D, Saylor R, et al. Biomarkers for Risk Stratification of Febrile Neutropenia Among Children With Malignancy: A Pilot Study. *Pediatr Blood Cancer* 2012; 59:238-245.
130. Miedema KGE, de Bont ES, Elferink RF, et al. The diagnostic value of CRP, IL-8, PCT and sTREM-1 in the detection of bacterial infections in pediatric oncology patients with febrile neutropenia. *Support Care Cancer* 2011; 19:1593-1600.
131. Moreau P, Adrian-Cabestre F, Menier C, et al. IL-10 selectively induces HLA-G expression in human trophoblast and monocytes. *Int Immunol* 1999; 5:803-811.
132. Moore KW, de Waal Malefyt R, Coffman RL, et al. Interleukin-10 and the interleukin-10 receptor. *Annu Rev Immunol* 2001; 19:683-765.

133. Moreau P, Adrian-Cabestre F, Menier C, et al. IL-10 selectively induces HLA-G expression in human trophoblasts and monocytes. *Int Immunol* 1999; 11:803–811.
134. Mukaida N. Pathophysiological roles of interleukin 8/CXCL8 in pulmonary diseases. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2003; 284: L566–L577.
135. Mullen CA, Buchanan GR. Early hospital discharge of children with cancer treated for fever and neutropenia: identification and management of low-risk patient. *J Clin Oncol* 1990; 8(12):1998-2004.
136. Muller F, Christ-Crain M, Bregenzer T, et al. Procalcitonin levels predict bacteremia in patients with community-acquired pneumonia: a prospective cohort trial. *Chest* 2010;138:121-129.
137. Murray PJ. The JAK-STAT Signaling Pathway: Input and Output Integration. *J Immunol* 2007; 178:2623-2629.
138. Naji A, Le Rond S, Durrbach A, et al. CD3⁺CD4^{low} and CD3⁺CD8^{low} are induced by HLA-G: novel human peripheral blood suppressor T-cell subsets involved in transplant acceptance. *Blood* 2007; 110:3936-3948.
139. Naka T, Nishimoto N, Kishimoto T. The paradigm of IL-6: from basic science to medicine. *Arthritis Res* 2002; 4 Suppl 3:S233–S242.
140. Naugler WE, Karin M. The wolf in sheep's clothing: the role of interleukin-6 in immunity, inflammation and cancer. *Trends Mol Med* 2008; 14(3):109–119.
141. Nathan C, Ding A. Nonresolving Inflammation. *Cell* 2010; 140:871-882.
142. Neth OW, Bajaj-Elliott M, Turner MW, et al. Susceptibility to infection in patients with neutropenia: the role of the innate immune system. *British Journal of Haematology* 2005; 129:713-722.
143. Nijsten MW, Olinga P, The TH, et al. Procalcitonin behaves as a fast responding acute phase protein in vivo and in vitro. *Crit Care Med* 2000; 28:458-461.

144. Nijhuis Oude CS, Daenen SM, Vellenga E, et al. Fever and neutropenia in cancer patients: the diagnostic role of cytokines in risk assessment strategies. *Critical Rev Oncol Hematol* 2002; 44:163-174.
145. Nijhuis Oude CS, Kamps WA, Daenen SM, et al. Feasibility of Withholding Antibiotics in Selected Febrile Neutropenic Cancer Patients. *J Clin Oncol* 2005; 23:7437-7444.
146. Nucci M, Spector N, Bueno AP, et al. Risk factors and attributable mortality associated with superinfections in neutropenic patients with cancer. *Clin Infect Dis* 1997; 24:575-579.
147. Oppenheim BA, Hartley JW, Lee W, et al. Outbreak of coagulase negative staphylococcus highly resistant to ciprofloxacin in leukaemia unit. *Br Med J* 1989; 299:294-297.
148. Oppenheim JJ, Zachariae CO, Mukaida N, et al. Properties of the novel proinflammatory supergene "intercrine" cytokine family. *Annu Rev Immunol* 1991; 9: 617-648.
149. Orudjev E, Lange BJ. Evolving concepts of management of febrile neutropenia in children with cancer. *Med Pediatr Oncol* 2002; 39:77-85.
150. O'Shea JJ, Gadina M, Schreiber RD. Cytokine Signaling in 2002: New Surprises in the JAK/STAT Pathway. *Cell* 2002; 109:S121-S131.
151. O'Shea JJ, Murray PJ. Cytokine signaling modules in inflammatory responses. *Immunity* 2008; 28: 477-487.
152. O'Shea JJ, Holland SM, Staudt LM. JAKs and STATs in Immunity, Immunodeficiency and Cancer. *N Engl J Med* 2013; 368:161-170.
153. Palazzi DL. The Use of Antimicrobial Agents in Children with Fever during Chemotherapy-induced Neutropenia. *Pediatr Infect Dis J* 2011; 30:887-890.
154. Palsson-McDermott EM, Doyle SL, McGettrick AF, et al. TAG, a splice variant of the adaptor TRAM, negatively regulates the adaptor Myd88-independent TLR4 pathway. *Nat Immunol* 2009; 10:579-586.

155. Park BS, Song DH, Kim HM, et al. The structural basis of lipopolysaccharide recognition by the TLR4-MD-2 complex. *Nature* 2009; 458:1191-1195.
156. Pritchard-Jones K, Kaatsch P, Steliarova-Foucher E, et al. Cancer in children and adolescents in Europe: developments over 20 years and future challenges. *Eur J Cancer* 2006; 42:2183-2190.
157. Parsa M, Najafi N. Diagnostic Relevance of Interleukin-6 and Tumor Necrosis Factor Alpha in Discriminating High Risk and Low Risk Groups in Febrile Patients with Neutropenia. *Journal of Biological Sciences* 2007; 7(2):338-342.
158. Peat J, Barton B. *Medical Statistics A Guide to Data Analysis and Critical Appraisal*. 1st edition. Blackwell Publishing 2005.
159. Pepys MB, Baltz ML. Acute phase proteins with special reference to C-reactive protein and related proteins (pentaxins) and serum amyloid A protein. *Adv Immunol* 1983; 34:141–212.
160. Persson L, Engervall P, Magnuson A, et al. Use of Inflammatory Markers for Early Detection of Bacteraemia in Patients with Febrile Neutropenia. *Scand J Infect Dis* 2004; 36:365-371.
161. Pestka S, Krause CD, Sarkar D, et al. Interleukin-10 and related cytokines and receptors. *Annu Rev Immunol* 2004; 22:929–979.
- Phillipson M, Kubes P. The neutrophil in vascular inflammation. *Nature Med* 2011; 17: 1381–1390.
162. Pipkin ME, Sacks JA, Cruz-Guilloty F, et al. Interleukin-2 and inflammation induce distinct transcriptional programs that promote the differentiation of effector cytolytic T cells. *Immunity* 2010; 32:79-90.
163. Pistoia V, Morandi F, Wang X, et al. Soluble HLA-G: Are They Clinically Relevant? *Semin Cancer Biol* 2007; 17(6): 469–479.
164. Pizzo PA. Management of fever in patients with cancer and treatment-induced neutropenia. *New Engl J Med* 1993; 328:1323-1332.
165. Philips R, Wade R, Lehrnbecher T, et al. Systematic review and meta-analysis of the value of initial biomarkers in predicting adverse

- outcome in febrile neutropenic episodes in children and young people with cancer. *BMC Medicine* 2012; 10:6.
166. Póvoa P, Coelho L, Almeida E, et al. C-reactive protein as a marker of ventilator-associated pneumonia resolution: a pilot study. *Clin Microbiol Infect* 2005;11(2):101-108.
167. Póvoa P, Coelho L, Almeida E, et al. Early identification of intensive care unit-acquired infections with daily monitoring of C-reactive protein: a prospective observational study. *Crit Care* 2006; 10(2):R63.
168. Povoá P, Almeida E, Moreira P, et al. C-reactive protein as an indicator of sepsis. *Intensive Care Med* 1998; 24:1052–6.
169. Price CP, Trull AK, Berry D, et al. Development and validation of a particle-enhanced turbidimetric immunoassay for C-reactive protein. *J Immunol Methods* 1987; 99:205-211.
170. PSO metodinė medžiaga. Navikiniai susirgimai tarp vaikų 2010. <http://www.who.int/ceh/capacity/cancer.pdf>
171. Puntmann VO. How-to guide on biomarkers: biomarker definitions, validation and applications with examples from cardiovascular disease. *Postgrad Med J* 2009; 85(1008):538–545.
172. Radimerski TM, Grisouard J, Timper K, et al. Role of calcium in lipopolysaccharide-induced calcitonin gene expression in human adipocytes. *Innate Immun* 2011; 17(4):403-413.
173. Rebmann V, Regel J, Stolke D, et al. Secretion of sHLA-G molecules in malignancies. *Semin Cell Biol* 2003;13(5):371–377.
174. Riikonen P, Saarinen UM, Teppo AM, et al. Cytokine and acute phase reactant levels in serum of children with cancer admitted for fever and neutropenia. *J Infect Dis* 1992; 166:432-436.
175. Riteau B, Rouas-Freiss N, Menier C, et al. HLA-G2, -G3, and -G4 isoforms expressed as nonmature cell surface glycoproteins inhibit NK and antigen-specific CTL cytotoxicity. *J Immunol* 2001; 166: 5018–5026.
176. Rongen HA, Hoetelmans RM. Chemiluminescence and

- immunoassays. *J Pharmaceut Biomed Anal* 1994; 12:433-462.
177. Ruokonen E, Nousiainen T, Pulkki K, et al. Procalcitonin concentrations in patients with neutropenic fever. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1999; 18:283-288.
178. Sadik CD, Kim ND, Luster AD. Neutrophils cascading their way to inflammation. *Trends Immunol* 2011; 32: 452–460.
179. Sakr Y, Sponholz F, Tuche F, et al. The Role of Procalcitonin in Febrile Neutropenic Patients: Review of the Literature. *Infection* 2008; 36:396-407.
180. Santolaya ME, Villarroel M, Avendano LF, et al. Discontinuation of antimicrobial therapy for febrile neutropenic children with cancer: a prospective study. *Clin Infect Dis* 1997; 25(1):92-97.
181. Santolaya ME, Alvarez AM, Aviles CL, et al. Prospective evaluation of a model of prediction invasive bacterial infection risk among children with cancer, fever and neutropenia. *Clin Infect Dis* 2002; 35:678-683.
182. Santolaya ME, Alvarez AM, Aviles CL, et al. Admission clinical and laboratory factors associated with death in children with cancer during afebrile neutropenic episode. *Pediatr Infect Dis J* 2007; 26:794-798.
183. Santolaya ME, Alvarez AM, Carmen LA, et al. Predictors of Severe Sepsis not Clinically Apparent During the First Twenty-Four Hours of Hospitalization in Children with Cancer, Neutropenia and Fever. A Prospective, Multicenter Trial. *Pediatr Infect Dis J.* 2008; 27:538-543.
184. Saraiva M, Christensen JR, Veldhoen M, et al. Interleukin-10 production by Th1 cells requires interleukin-12-induced STAT4 transcription factor and ERK MAP kinase activation by high antigen dose. *Immunity* 2009; 31:209–219.
185. Saraiva M, O'Garra A. The regulation of IL-10 production by immune cells. *Nat Rev Immunol* 2010; 10:170-181.

186. Schimpff S, Satterlee W, Young VM, et al. Empiric therapy with carbenicillin and gentamicin for febrile patients with cancer and granulocytopenia. *New Engl J Med* 1971; 284:1061-1065.
187. Schindler C, Levy DE, Decker T. JAK-STAT Signaling: From Interferons to Cytokines. *Journal of Biological Chemistry* 2007; 282(28):20059-20063.
188. Schonbohn H, Schuler M, Kolbe K, et al. Plasma levels of IL-1, TNF alpha, IL-6, IL-8, G-CSF and IL-1RA during febrile neutropenia: results of a prospective study in patients undergoing chemotherapy for acute myelogenous leukemia. *Ann Hematol* 1995; 71:161-168.
189. Schroder NW, Schumann RR. Single nucleotide polymorphisms of Toll-like receptors and susceptibility to infectious disease. *Lancet Infect Dis* 2005; 5:156-164.
190. Schulz O, Sewell HF, Shakib F. Proteolytic cleavage of CD25, the α subunit of the human T cell interleukin 2 receptor, by Der p 1, a major mite allergen with cysteine protease activity. *J Exp Med* 1998; 187: 271-275.
191. Schuetz P, Christ-Crain M, Albrich W, et al. Guidance of antibiotic therapy with procalcitonin in lower respiratory tract infections: insights into the ProHOSP study. *Virulence* 2010, 1:88-92.
192. Schuetz P, Suter-Widmer I, Chaudri A, et al. Prognostic value of procalcitonin in community-acquired pneumonia. *Eur Resp J* 2011, 37:384-392.
193. Schuetz P, Albrich W, Mueller B. Procalcitonin for diagnosis of infection and guide to antibiotic decisions: past, present and future. *BMC Medicine* 2011; 9:107.
194. Sheedy FJ, Palsson-McDermott E, Hennessy EJ, et al. Negative regulation of TLR4 via targeting of the proinflammatory tumor suppressor PDCD4 by the microRNA miR-21. *Nat Immunol* 2009; 11:141-147.
195. Shiroishi M, Tsumoto K, Amano K, et al. Human inhibitory receptors Ig-like transcript 2 (ILT2) and ILT4 compete with CD8 for

- MHC class I binding and bind preferentially to HLA-G. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003; 100: 8856–8861.
196. Sickles EA, Greene WH, Wiernik PH. Clinical presentation of infection in granulocytopenic patients. *Arch Intern Med* 1975; 135(5):715-719.
197. Soker M, Colpan L, Ece A, et al. Serum Levels of IL-1 beta, sIL-2R, IL-6, IL-8, and TNF-alpha in Febrile Children with Cancer and Neutropenia. *Medical Oncology* 2001; 18(1):51-57.
198. Simon L, Gauvin F, Amre DK, et al. Serum procalcitonin and C-reactive protein level as markers of bacterial infection: a systematic review and meta-analysis. *Clin Infect Dis* 2004; 39(2):206-217.
199. Spasova MI, Terzieva DD, Tzvetkova TZ, et al. Interleukin-6, interleukin-8, interleukin-10 and C-reactive protein in febrile neutropenia in children with malignant diseases. *Folia Med (Plovdiv)* 2005; 47(3-4):46-52.
200. Sponholz Ch, Sakr Y. Diagnostic value and prognostic implications of serum procalcitonin after cardiac surgery: a systematic review of the literature. *Critical Care* 2006; 10:R145 doi:10.1186/cc5067.
201. Srinivasan N, Rufino SD. A superfamily of proteins with the lectin fold. *Chemtracts-Biochem Mol Biol* 1996; 6:149–64.
202. Standage SW, Wong HR. Biomarkers for pediatric sepsis and septic shock. *Expert Rev. Anti Infect Ther* 2011; 9(1):71–79.
203. Stark MA, Huo Y, Burcin TL, et al. Phagocytosis of apoptotic neutrophils regulates granulopoiesis via IL-23 and IL-17. *Immunity* 2005; 22:285–294.
204. Stryjewski GR, Nylen ES, Bell MJ, et al. Interleukin-6, interleukin-8 and a rapid and sensitive assay for calcitonin precursors for the determination of bacterial sepsis in febrile neutropenic children. *Pediatr Crit Care Med*. 2005; 6:129-135.
205. Taganov KD, Boldin MP, Chang KJ, et al. NF-kappaB-dependent induction of microRNA miR-146, an inhibitor targeted to signaling

- proteins of innate immune responses. *Proc Natl Acad Sci USA* 2006; 103:12481-12486.
206. Takamatsu Y, Akashi K, Harada M, et al. Cytokine production by peripheral blood monocytes and T cells during haemopoietic recovery after intensive chemotherapy. *Br J Haematol* 1993; 83:21–27.
207. Takeuchi O, Akira S. Pattern Recognition Receptors and Inflammation. *Cell* 2010; 140:805-820.
208. Talcott JA, Finberg R, Mayer RJ, et al. The medical course of cancer patients with fever and neutropenia. Clinical identification of a low-risk subgroup at presentation. *Arch Intern Med* 1988; 148:2561-2568.
209. Taniguchi T, Minami Y. The IL-2/IL-2 receptor system: a current overview. *Cell* 1993; 73:5-8.
210. Tang BMP, Eslick GD, Craig JC, et al. Accuracy of procalcitonin for sepsis diagnosis in critically ill patients: systematic review and meta-analysis. *Lancet Infect Dis* 2007; 7:210-217.
211. Tang Y, Liao C, Xu X, et al. Th1/Th2 cytokine profiles in G+/G- bacteremia in pediatric hematology/oncology patients. *Pediatr Blood Cancer* 2012; 58(1):50-54.
212. Tawara K, Oxford JT, Jorcyk CL. Clinical significance of interleukin (IL)-6 in cancer metastasis to bone: potential of anti-IL-6 therapies. *Cancer Management and Research* 2011; 3:177–189.
213. Te Poele EM, Tissing WJ, Kamps WA, et al. Risk assessment in fever and neutropenia in children with cancer: what did we learn? *Crit Rev Oncol Hematol* 2009; 72:45-55.
214. Thomas L. *Clinical Laboratory Diagnostics Use and Assessment of Clinical Laboratory Results*. First edition. TH Books Verlagsgesellschaft. 1998.
215. Trinchieri G, Sher A. Cooperation of Toll-like receptor signals in innate immune defense. *Nat Rev Immunol* 2007; 7:179-190.

216. Tseng PH, Matsuzawa A, Zhang W, et al. Different modes of ubiquitination of the adaptor TRAF3 selectively activate the expression of type I interferons and proinflammatory cytokines. *Nat Immunol* 2010; 11:70-75.
217. Uematsu S, Fujimoto K, Jang MH, et al. Regulation of humoral and cellular gut immunity by lamina propria dendritic cells expressing Toll-like receptor 5. *Nat Immunol* 2008; 9:769-776.
218. Underhill DM. Collaboration between innate immune receptors dectin-1, TLRs and NODs. *Immunol Rev* 2007; 219:75-87.
219. Uzzan B, Cohen R, Nicolas P, Cucherat M, et al. Procalcitonin as a diagnostic test for sepsis in critically ill adults and after surgery or trauma: a systematic review and meta-analysis. *Crit Care Med* 2006; 34:1996–2003.
220. Van Regenmortel MH. Protein antigenicity. *Mol Biol Reports* 1992; 16:133-138.
221. Van Zee KJ, DeForge LE, Fischer E, et al. IL-8 in septic shock, endotoxemia, and after IL-1 administration. *J Immunol* 1991; 146: 3478–3482.
222. Vassiliadis E, Barascuk N, Didangelos A, et al. Novel Cardiac-Specific Biomarkers and the Cardiovascular Continuum. *Biomarker Insights* 2012; 7:45–57.
223. Vellenga E, Uyl-de Groot CA, de Wit R, et al. Randomized placebo-controlled trial of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor in patients with chemotherapy-related febrile neutropenia. *J Clin Oncol* 1996; 14:619-627.
224. Ventetuolo CE, Levy MM. Biomarkers: Diagnosis and Risk Assessment in Sepsis. *Clin Chest Med* 2008; 591-603.
225. Xia ZP, Sun L, Chen X, et al. Direct activation of protein kinases by unanchored polyubiquitin chains. *Nature* 2009; 461:114-119.
226. Wacker Ch, Prkno A, Brunkhorst FM, et al. Procalcitonin as a diagnostic marker for sepsis: a systematic review and

- meta-analysis. *Lancet Infect Dis* 2013; doi:10.1016/S1473-3099(12)70323-7 [Epub ahead of print].
227. Wan YY, Flavell RA. How Diverse—CD4 Effector T Cells and their Functions. *Journal of Molecular Cell Biology* 2009; 1:20-36.
228. Wang X, Rickert M, Garcia KT. Structure of the quaternary complex of interleukin-2 with its α , β and γ c receptors. *Science* 2005; 310:1159-1163.
229. Warren HS. Strategies for the treatment of sepsis. *N Engl J Med* 1997; 336(13):952-953.
230. Whang K, Steinwald PM, White JC, et al. Serum calcitonin precursors in sepsis and systemic infection. *J Clin Endocrinol Metab* 1998; 83: 3296–3301.
231. Wheeler DS, Zingarelli B, Wheeler WJ, et al. Novel Pharmacologic Approaches to the Management of Sepsis: Targeting the Host Inflammatory Response. *Recent Pat Inflamm Allergy Drug Discov* 2009; 3(2):96–112.
232. Wong HR, Cvijanovich N, Wheeler DS, et al. Interleukin-8 as a stratification tool for interventional trials involving pediatric septic shock. *Am J Res Crit Care Med* 2008; 178:276-282.
233. Zaidi M, Alam ASMT, Shakar VS, et al. Quantitative description of components of *in vitro* morphometric change in the rat osteoclast model. Relationships with cellular function. *Eur Biophys J* 1992; 21: 349–355.
234. Zheng L, Martins-Green M. Molecular mechanisms of thrombin-induced interleukin-8 (IL-8/CXCL8) expression in THP-1-derived and primary human macrophages. *J Leuk Biol* 2007; 82:619-629.
235. Zweig MH, Campbell G. Receiver-Operating Characteristics (ROC) Plots: A Fundamental Evaluation Tool in Clinical Medicine. *Clin Chem* 1993; 39(4):561-577.

9. PUBLIKACIJŲ DISERTACIJOS TEMA SĄRAŠAS, PRANEŠIMAI KONFERENCIJOSE, TEZĖS

1. V. Urbonas, A. Eidukaitė, I. Tamulienė, L. Ragelienė, S. Burokienė, J. Raistenckis, V. Tamošiūnas. **Interleukinų vertė febrilinės neutropenijos metu nustatant vaikų, sergančių onkohematologinėmis ligomis, mažos bakteriemijos rizikos grupę.** *Medicinos teorija ir praktika* 2010; 16(2):117-123.
2. Urbonas V, Eidukaitė A, Tamulienė I. **The Diagnostic Value of Interleukin-6 and Interleukin-8 for Early Prediction of Bacteremia and Sepsis in Children With Febrile Neutropenia and Cancer.** *J Pediatr Hematol Oncol* 2012; 34:122–127.
3. Urbonas V, Eidukaitė A, Tamulienė I. **Increased interleukin-10 levels correlate with bacteremia and sepsis in febrile neutropenia pediatric oncology patients.** *Cytokine* 2012; 57: 313–315.
4. Urbonas V, Eidukaitė A, Tamulienė I. **The predictive value of soluble biomarkers (CD14 subtype, interleukin-2receptor, human leucocyte antigen-G) and procalcitonin in the detection of bacteremia and sepsis in pediatric oncology patients with chemotherapy-induced febrile neutropenia.** *Cytokine* 2013; 62: 34-37.

Pranešimai tarptautinėse konferencijose:

1. Tamulienė I, Urbonas V, Eidukaitė A, Ragelienė L. **Determination a group with low risk of bacterial infection among children with cancer and febrile neutropenia.**
Stendinis pranešimas tarptautinėje konferencijoje “7th Baltic

- Conference of Hematology”**, 2010 m. gegužės 20–22 dienomis, Tartu, Estija.
2. Urbonas V, Eidukaite A, Tamuliene I. **Calprotectin (S100A8/A9) is not predictive of bacteremia and sepsis in febrile neutropenia pediatric oncology patients**. Stendinis pranešimas tarptautinėje konferencijoje “**20th IFCC-EFLM European Congress of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine (EuromedLab)**”, 2013 m. gegužės 19–23 dienomis, Milanai, Italija.

Tezės:

1. Urbonas V, Eidukaite A, Tamulienė I. **Interleukin-8 Values in Pediatric Oncology Patients with Febrile Neutropenia and Bloodstream Infections**. *Pediatric Research* 2011; 70: 490–490; doi:10.1203/01.pdr.0000403893.61640.b6.

10. PADĖKA

Pati nuoširdžiausia ir didžiausia padėka darbo vadovei dr. Audronei Eidukaitei už jos tolerantišką požiūrį, išvalgius patarimus bei komentarus doktorantūrinio darbo klausimais, moralinį palaikymą per visą doktoratūros periodą bei nuolatinį pozityvų skatinimą.

Nuoširdus ačiū gyd. Indrei Tamulienei už tinkamų tyrimui pacientų atranką bei Ilonai Paulauskaitei už ėminių paruošimą.

Dėkoju prof. Vytui Antanui Tamošiūnui ir dr. Mykolui Mauricui už gerus žodžius bei moralinį palaikymą, dr. Almantui Šiauriui ir Natalijai Drapeko už pagalbą atliekant laboratorinius tyrimus, dr. Irenai Dumalakienei bei dr. Jelenai Raskon už kritiškas bei savalaikes pastabas.

Dėkoju Dievui už įkvėpimą, bendradarbiams, kolegoms ir artimiems žmonėms už palaikymą, supratingumą bei saikingą trukdymą.