

ВОЈНОСАНИТЕТСКИ ПРЕГЛЕД

Часопис лекара и фармацеутика Војске Србије

Military Medical and Pharmaceutical Journal of Serbia



Vojnosanitetski pregled

Vojnosanit Pregl 2010; November vol. 67 (No. 11): pp. 877-952.



ВОЈНОСАНИТЕТСКИ ПРЕГЛЕД

Први број *Војносанинетског прегледа* изашао је септембра месеца 1944. године

Часопис наставља традицију *Војно-санинетског гласника*, који је излазио од 1930. до 1941. године

ИЗДАВАЧ

Управа за Војно здравство МО Србије

ИЗДАВАЧКИ САВЕТ

проф. dr sc. pharm. **Мирјана Антуновић**
 проф. dr sc. med. **Бранко Глигић**, пук.
 проф. dr sc. med. **Мирјана Животић-Вановић**
 проф. dr sc. med. **Миодраг Јевтић**, генерал-мајор
 др **Младен Миливојевић**, пук.
 прим. др **Милорад Рабреновић**, пук.
 проф. dr sc. med. **Небојша Станковић**, пук.
 доц. др **Вељко Тодоровић**, бригадни генерал (председник)
 проф. dr sc. med. **Мирољуб Тркулић**, пук.
 проф. dr sc. med. **Никола Филиповић**, пук.

МЕЂУНАРОДНИ УРЕЂИВАЧКИ ОДБОР

Prof. **Andrej Aleksandrov** (Russia)
 Assoc. Prof. **Kiyoshi Ameno** (Japan)
 Prof. **Rocco Bellantone** (Italy)
 Prof. **Hanoch Hod** (Israel)
 Prof. **Abu-Elmagd Kareem** (USA)
 Prof. **Hiroshi Kinoshita** (Japan)
 Prof. **Celestino Pio Lombardi** (Italy)
 Prof. **Philippe Morel** (Switzerland)
 Prof. **Kiyotaka Okuno** (Japan)
 Prof. **Stane Repše** (Slovenia)
 Prof. **Mitchell B. Sheinkop** (USA)
 Prof. **Hitoshi Shiozaki** (Japan)
 Prof. **H. Ralph Schumacher** (USA)
 Prof. **Miodrag Stojković** (UK)
 Assist. Prof. **Tibor Tot** (Sweden)

УРЕЂИВАЧКИ ОДБОР

Главни и одговорни уредник
 проф. dr sc. pharm. **Силва Добрић**

Уредници:

проф. dr sc. med. **Бела Балит**
 проф. dr sc. stom. **Злата Бркић**
 проф. dr sc. med. **Милан Вишњић**
 проф. dr sc. med. **Славица Вучинић**
 проф. dr sc. med. **Александар Ђуровић**, пук.
 доц. др sc. med. **Бранка Ђуровић**
 проф. dr sc. med. **Борисав Јанковић**
 доц. др sc. med. **Лидија Кандолф-Секуловић**
 академик **Владимир Кањух**
 академик **Владимир Костић**
 проф. dr sc. med. **Звонко Магић**
 проф. dr sc. med. **Ђоко Максић**, пук.
 доц. др sc. med. **Гордана Мандић-Гајић**
 проф. dr sc. med. **Драган Микић**, пук.
 проф. dr sc. med. **Дарко Мирковић**
 доц. др sc. med. **Слободан Обрадовић**, мајор
 академик **Миодраг Остојић**
 проф. dr sc. med. **Предраг Пешко**, FACS
 академик **Ђорђе Радак**
 проф. dr sc. med. **Ранко Ранчевић**, пук.
 проф. dr sc. med. **Предраг Ромић**, пук.
 проф. dr sc. med. **Војкан Станић**, пук.
 доц. др sc. med. **Дара Стефановић**
 проф. dr sc. med. **Душан Стефановић**, пук.
 проф. dr sc. stom. **Љубомир Тодоровић**
 проф. dr sc. med. **Снежана Церовић**
 академик **Миодраг Чолић**, пук.
 академик **Радоје Чоловић**
 проф. dr sc. med. **Весна Шуљбагић**

Технички секретар уређивачког одбора
 др Маја Марковић

РЕДАКЦИЈА

mg sc. med. др Соња Андрић-Кривокућа, др Снежана
 Јанковић, др Маја Марковић, др sc. Александра Гогић

Технички уредник: Милан Перовановић

Редактор за српски и енглески језик:
 Драгана Мучибабић, проф.

Коректор: Љиљана Николић, Брана Савић

Компјутерско-графичка обрада:
 Светлана Стајић, Весна Тотих, Јелена Васил



Адреса редакције: Војномедицинска академија, Институт за научне информације, Црнотравска 17, поштански фах 33–55, 11040 Београд, Србија. Телефони: главни и одговорни уредник 3609 311, технички секретар 3608 943, редакција 3609 479 и 3609 179, претплата 3608 997. Факс 2669 689. E-mail: vmainil@EUnet.rs (главни и одговорни уредник) и vmavsp@hotmail.com (редакција).

Радове објављене у „Војносанинетском прегледу“ индексирају: Science Citation Index Expanded (SCIE), Journal Citation Reports/Science Edition, Index Medicus (Medline), Excerpta Medica (EMBASE), EBSCO, Biomedicina Serbica. Садржаје објављују *Giornale di Medicina Militare* и *Revista de Medicina Militara*. Приказе оригиналних радова и извода из садржаја објављује *International Review of the Armed Forces Medical Services*.

Часопис излази дванаест пута годишње. Претплате: жиро рачун код Управе за јавна плаћања у Београду бр. 840-941621-02 – ВМА (за Војносанинетски преглед), ПИБ 102116082. За претплату из иностранства обратити се служби претплате на тел. 3608 997. Годишња претплата: 4 000 динара за грађане Србије, 8 000 динара за установе из Србије и 150 € (у динарској противвредности на дан уплате) за претплатнике из иностранства. Копију уплатнице доставити на горњу адресу.

VOJNOSANITETSKI PREGLED

The first issue of *Vojnosanitetski pregled* was published in September 1944
The Journal continues the tradition of *Vojno-sanitetski glasnik* which was published between 1930 and 1941

PUBLISHER

Military Health Department, Ministry of Defence, Serbia

PUBLISHER'S ADVISORY BOARD

Assoc. Prof. **Mirjana Antunović**, BPharm, PhD
Col. Assoc. Prof. **Nikola Filipović**, MD, PhD
Col. Assoc. Prof. **Branko Gligić**, MD, PhD
Major-General, Prof. **Miodrag Jevtić**, MD, PhD
Col. **Mladen Milivojević**, MD
Col. **Milorad Rabrenović**, MD
Col. Prof. **Nebojša Stanković**, MD, PhD
Brigadier General Assist. Prof. **Veljko Todorović**, MD, PhD
(Chairman)
Col. Assoc. Prof. **Miroljub Trkuljić**, MD, PhD
Prof. **Mirjana Životić-Vanović**, MD, PhD

INTERNATIONAL EDITORIAL BOARD

Prof. **Andrej Aleksandrov** (Russia)
Assoc. Prof. **Kiyoshi Ameno** (Japan)
Prof. **Rocco Bellantone** (Italy)
Prof. **Hanoch Hod** (Israel)
Prof. **Abu-Elmagd Kareem** (USA)
Prof. **Hiroshi Kinoshita** (Japan)
Prof. **Celestino Pio Lombardi** (Italy)
Prof. **Philippe Morel** (Switzerland)
Prof. **Kiyotaka Okuno** (Japan)
Prof. **Stane Repše** (Slovenia)
Prof. **Mitchell B. Sheinkop** (USA)
Prof. **Hitoshi Shiozaki** (Japan)
Prof. **H. Ralph Schumacher** (USA)
Prof. **Miodrag Stojković** (UK)
Assist. Prof. **Tibor Tot** (Sweden)

EDITORIAL BOARD

Editor-in-chief

Prof. **Silva Dobrić**, BPharm, PhD

Co-editors:

Prof. **Bela Balint**, MD, PhD
Assoc. Prof. **Zlata Brkić**, DDM, PhD
Assoc. Prof. **Snežana Cerović**, MD, PhD
Col. Prof. **Miodrag Čolić**, MD, PhD, MSAAS
Prof. **Radoje Čolović**, MD, PhD, MSAAS
Col. Assoc. Prof. **Aleksandar Đurović**, MD, PhD
Assist. Prof. **Branka Đurović**, MD, PhD
Prof. **Borisav Janković**, MD, PhD
Assist. Prof. **Lidija Kandolf-Sekulović**, MD, PhD
Prof. **Vladimir Kanjuh**, MD, PhD, MSAAS
Prof. **Vladimir Kostić**, MD, PhD, MSAAS
Prof. **Zvonko Magić**, MD, PhD
Col. Prof. **Đoko Maksić**, MD, PhD
Assist. Prof. **Gordana Mandić-Gajić**, MD, PhD
Col. Assoc. Prof. **Dragan Mikić**, MD, PhD
Assoc. Prof. **Darko Mirković**, MD, PhD
Major, Assist. Prof. **Slobodan Obradović**, MD, PhD
Prof. **Miodrag Ostojić**, MD, PhD, MSAAS
Prof. **Predrag Peško**, MD, PhD, FACS
Prof. **Đorđe Radak**, MD, PhD, MSAAS
Col. Assoc. Prof. **Ranko Raičević**, MD, PhD
Col. Assoc. Prof. **Predrag Romić**, MD, PhD
Col. Prof. **Vojkan Stanić**, MD, PhD
Assist. Prof. **Dara Stefanović**, MD, PhD
Col. Prof. **Dušan Stefanović**, MD, PhD
Prof. **Milan Višnjjić**, MD, PhD
Assoc. Prof. **Slavica Vučinić**, MD, PhD
Assoc. Prof. **Vesna Šuljagić**, MD, PhD.
Prof. **Ljubomir Todorović**, DDM, PhD

Editorial staff

Sonja Andrić-Krivokuća, MD, MSc; Snežana Janković, MD;
Maja Marković, MD; Dragana Mučibabić, BA,
Aleksandra Gogić, PhD

Technical editor

Milan Perovanović

Proofreading

Ljiljana Nikolić, Brana Savić

Technical editing

Svetlana Stajić, Vesna Totić, Jelena Vasilj



Editorial Office: Military Medical Academy, INI; Crnotravska 17, PO Box 33-55, 11040 Belgrade, Serbia. Phone: +381-11-3608-943; +381-11-3609-479, subscription 3608-997; Fax: +381-11-2669-689; E-mail: vmavsp@hotmail.com

Papers published in the *Vojnosanitetski pregled* are indexed in: Science Citation Index Expanded (SCIE), Journal Citation Reports/Science Edition, Index Medicus (Medline), Excerpta Medica (EMBASE), EBSCO, Biomedicina Serbica. Contents are published in *Giornale di Medicina Militare* and *Revista de Medicina Militara*. Reviews of original papers and abstracts of contents are published in *International Review of the Armed Forces Medical Services*.

The Journal is published monthly. Subscription: account in Uprava za javna plaćanja in Belgrade. Giro Account No. 840-941621-02 – VMA (za Vojnosanitetski pregled), PIB 102116082. To subscribe from abroad phone to +381 11 3608 997. Subscription prices per year: individuals 4 000.00 Din, and institutions 8 000,00 Din in Serbia, and foreign subscribers 150 €.



SADRŽAJ / CONTENTS

UVODNIK / EDITORIAL

Aleksandar Ljubić

Nobelova nagrada za fiziologiju ili medicinu u 2010. godini

The Nobel prize in physiology or medicine 2010 881

SHORT COMMUNICATION / KRATKO SAOPŠTENJE

Mirjana Bogavac, Nataša Simin, Milan Ranisavljević, Ljiljana Budišić

The role of insulin-like growth factor in prediction and prevention of preterm delivery

Određivanje uloge faktora rasta sličnog insulinu u predviđanju i prevenciji prevremenog porođaja 883

ORIGINALNI ČLANCI / ORIGINAL ARTICLES

Biljana Ćirić, Dušan Jandrić, Vesna Kilibarda, Jasmina Jović-Stošić, Viktorija Dragojević-Simić, Slavica Vučinić

Simultano određivanje amoksicilina i klavulanske kiseline u humanoj plazmi metodom tečne hromatografije sa elektrosprej jonizacijom i masenom spektrometrijom (UPLC/MS)

Simultaneous determination of amoxicillin and clavulanic acid in the human plasma by high performance liquid chromatography – mass spectrometry (UPLC/MS) 887

Željko Laušević, Goran Vuković, Biljana Stojimirović, Jasna Trbojević-Stanković, Vladimir Resanović, Mirjana Laušević

Kinetics of C-reactive protein, interleukin-6 and -10, and phospholipase A₂-II in severely traumatized septic patients

Kinetika C-reaktivnog proteina, interleukina 6 i 10 i fosfolipaze A₂II kod bolesnika sa teškim povredama i sepsom 893

Mia Rakić, Ksenija Zelić, Dušan Pavlica, Miloš Hadžimihajlović, Jelena Milašin, Biljana Miličić, Nebojša Nikolić, Novak Stamatović, Smiljana Matić, Zoran Aleksić, Saša Janković

Povezanost kliničkih parametara i prisustva *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* i *Porphyromonas gingivalis* kod pacijenata sa progresivnim parodontalnim lezijama

Association between clinical parameters and the presence of *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* and *Porphyromonas gingivalis* in patients with progressive periodontal lesions 898

Dragan Delić, Nikola Mitrović, Aleksandra Radovanović Spurnić, Neda Stojković Švrtlih, Jasmina Simonović Babić

Epidemiological characteristics and clinical manifestations of acute non-A-E hepatitis

Epidemiološke karakteristike i kliničke manifestacije akutnog hepatitisa ni A-E 903

Miroslav Stojanović, Milan Radojković, Goran Stanojević

Primena linearnog radiofrekventnog noža u resekciji jetre

Use of linear radiofrequency device in liver resection 910

Radojica Stolić, Goran Trajković, Aleksandar Jovanović, Dragica Stolić, Vladan Perić, Saša Sovtić, Gordana Šubarić-Gorgieva

Carotid ultrasonographic parameters as markers of atherogenesis and mortality rate in patients on hemodialysis

Ultrazvučni parametri karotidnih arterija kao markeri ateroskleroze i mortaliteta kod bolesnika na hemodijalizi 916

Nada Kuljić-Kapulica, Dragutin Jovanović, Dejana Savić, Elizabeta Ristanović, Darko Nožić, Radmila Rajić

Terapija hroničnog hepatitisa C – praćenje virusološkog odgovora

Therapy of chronic hepatitis C – virologic response monitoring 923

Ilona Mihajlović, Miroslav Smajić, Jelena Sente

Učestalost deformiteta stopala kod devojčica predškolskog uzrasta

Frequency of foot deformity in preschool girls 928

AKTUELNE TEME / CURRENT TOPIC

Vladan Radosavljević, Ksenija Stojković, Radivoje Anđelković, Marko Andrejić

Agroterorizam kao aktuelni izazov

Agroterrorism as a current challenge 933

KAZUISTIKA / CASE REPORTS

Olivera Šveljo, Katarina Koprivšek, Miloš A. Lučić, Ljubodrag Minić

Funkcionalna magnetna rezonanca u ispitivanju adaptacije moždane kore kod bolesnika sa niskogradusnim gliomom

Functional magnetic resonance imaging of cortical changes in a low-grade glioma patient 941

Djula Djilvesi, Petar Vuleković, Tomislav Cigić, Željko Kojadinović, Vladimir Papić, Igor Horvat

Povezanost posttraumatske komunikacije endokranijuma i nosne šupljine sa recidivnim meningoencefalitisom bez nazolikvoreje

Association of post-traumatic communication of endocranium and nasal cavity with recurrent meningoencephalitis without rhinorrhea 945

UPUTSTVO AUTORIMA / INSTRUCTIONS TO THE AUTHORS 949



Engleski biolog Robert G. Edwards, PhD (27.9.1925, Batley/Manchester, Engleska), dobitnik ovogodišnje Nobelove nagrade za medicinu, za razvoj metoda humane oplodnje *in vitro*, na slici sa dečakom i devojčicom rođenim zahvaljujući njegovim istraživanjima (vidi Uvodnik).

English biologist Robert G. Edwards, PhD (27 September 1925, Batley/Manchester, England), a Nobel Laureate in Physiology or Medicine 2010, for the development of *in vitro* fertilization, in a photo with a boy and a girl born thanks to his research (see Editorial).



Nobelova nagrada za fiziologiju ili medicinu u 2010. godini

The Nobel prize in physiology or medicine 2010

Aleksandar Ljubić*

Klinički centar Srbije, Klinika za ginekologiju i akušerstvo,
Beograd, Srbija

Dodela Nobelove nagrade profesoru Robertu Edwardsu fokusirala je pažnju veoma široke javnosti na dostignuća reproduktivnih tehnologija. Naime, rođenje Louise Brown, 25. jula 1978. godine, prve bebe začete vantelesnim oplodnjem, od strane Roberta Edwardsa i doktora Patricka Steptoea, dovelo je do prave revolucije na polju lečenja poremećaja reprodukcije, ali i velikih kontroverzi na etičkoj i religioznoj osnovi.

Ukoliko bismo želeli da sumiramo promene do kojih je ovo otkriće dovelo, prva i, za sada, najvažnija odnosi se na mogućnosti lečenja steriliteta. Ukoliko se ima u vidu da oko 10% parova ima smanjenu mogućnost reprodukcije, onda je razumljivo u kojoj meri je sterilitet raširen i globalni problem.

Do sada je rođeno preko četiri miliona dece metodom vantelesnog oplodjenja, a u razvijenim zemljama 3% novorođene dece začne se ovim putem. Prvo dete začeto vantelesnim oplodnjem u Srbiji rodilo se 1986. godine. Od tada, ova metoda je u stalnom razvoju, a danas postoji i Nacionalni program vantelesnog oplodjenja, kroz koji je prošlo više od tri hiljade parova i rođeno više od 1000 dece.

Moguće je da bi se jedan broj dece rodio i primenom drugih tehnologija, ali je nesporno da vantelesno oplodjenje danas predstavlja najefikasniji (ne i najjednostavniji) način lečenja steriliteta, koji omogućava velikom broju parova koji bi bili osuđeni na život bez genetskog potomstva, da ostvare roditeljstvo.

Profesor Edwards sa saradnicima od 1950-tih godina dokazao je da humana jajna ćelija ima specifičan životni ciklus, ukazao je na način njene maturacije, kao i na brojne hormonske regulatore njene aktivnosti. Otkrio je period u kome je ćelija spremna za fertilizaciju, što je dovelo do uspešne oplodnje u *in vitro* uslovima i, na kraju, do trudnoće gospođe Lesley Brown sa rođenjem, sada već čuvene, Louise.

Danas je vantelesno oplodjenje standardna terapija steriliteta širom sveta. Prvobitna metodologija značajno je unapređena ultrazvučnim nadzorom rasta folikula i aspiracije jajnih ćelija. Pored toga, mikrohirurške tehnike intracitoplazmatske injekcije spermatozoida usavršile su lečenje muškog etiološkog faktora steriliteta.

Ova metoda pokazala se veoma uspešnom i bezbednom. Uspešna je kod preko trećine slučajeva. Ozbiljnije komplikacije sreću se kod 1–2% parova, a smanjenje broja vraćenih embriona dovodi do sve manjeg broja višestrukih trudnoća.

Razvoj vantelesnog oplodjenja doveo je do velikih prodora u nauci, sa istraživanjima humanih embrionalnih stem ćelija, a ispitivanja regulatornih mehanizama implantacije i razvoja embriona dovela su do brojnih saznanja o humanoj reprodukciji. Veliki broj poremećaja i bolesti koje se javljaju tokom prenatalnog života i posle rođenja može biti posledica nepravilnih regulatornih mehanizama početkom ljudskog života, u embrionalnom obliku. Prava žetva rezultata ovih istraživanja tek predstoji.

Vantelesno oplodjenje dovelo je i do brojnih kontroverzi etičke, pravne, moralne i religiozne prirode. Da pomenem samo surogat materinstvo, IVF u starijoj populaciji, sa porođajem žena sa šezdeset i više godina, roditeljstvo homoseksualne populacije, prodaju gameta i drugo. Ove dileme, kao i briga o potencijalnom uništenju života, dovele su do žestoke reakcije Rimokatoličke crkve. Napredak humane reproduktivne tehnologije izaziva veoma duboku zabrinutost i određeni revolt zbog stavova i tvrdnji da čovek ne sme uzimati ulogu Boga.

Na kraju, moram se osvrnuti i na životnu priču profesora Edwardsa. Više od dvadeset godina rada trebalo je timu profesora Edwardsa, fiziologa koji je najveći deo karijere proveo u Kembridžu u Engleskoj, i dr Steptoea, ginekologa i jednog od pionira laparoskopske hirurgije, da uspe u pokušajima sjedinjavanja jajne ćelije i spermatozoida u *in vitro* uslovima. Dr Steptoe, koji bi verovatno delio nagradu za

* Autor je jedan od vodećih eksperata u oblasti vantelesne oplodnje u Srbiji i trenutno se nalazi na mestu direktora Klinike za ginekologiju i akušerstvo, Kliničkog centra Srbije i predsednika Republičke komisije za vantelesnu oplodnju.

vantelesno oplodjenje, umro je 1988. godine (Nobelova nagrada ne dodeljuje se posle smrti). Profesor Edwards sada ima 85 godina. Penzionisao se kao direktor Istraživačkog centra Bourn Hall klinike u Londonu, jednog od prvih centara za vantelesno oplodjenje u svetu. „Nažalost, profesor Edwards sada nije u stanju da razume i prihvati počast koja mu se ukazuje. Prošlosti se odlično seća, ali ne razume sadašnjost“, navodi dr Michael Macnamee, sadašnji direktor Bourn Hall klinike.

Razlozi i mehanizmi dodele Nobelove nagrade od strane Komiteta u Karolinska institutu nisu za diskusiju, ali nije jasno zbog čega je trebalo toliko vremena da se na pravi način vrednuje dostignuće profesora Edwardsa, imajući u vidu zahtev Alfreda Nobela da se nagrada dodeljuje za dostignuće u prethodnoj godini.

Hvala profesoru Robertu Edwardsu u ime medicine, svih roditelja kojima je pomogao i, pre svega, u ime dece koja su se rodila zahvaljujući njemu.



The role of insulin-like growth factor in prediction and prevention of preterm delivery

Određivanje uloge faktora rasta sličnog insulinu u predviđanju i prevenciji prevremenog porođaja

Mirjana Bogavac*, Nataša Simin†, Milan Ranisavljević*, Ljiljana Budišić‡

*Clinical Center of Vojvodina, Department of Obstetrics and Gynecology, Novi Sad,

Serbia; †Faculty of Sciences, Department of Chemistry, Novi Sad, Serbia;

‡School of Medicine, Novi Sad, Serbia

Abstract

Background/Aim. Prediction and prevention of preterm delivery remain great challenge. It is important to include in everyday medical practice determination of certain markers that could help identifying pregnant women with preterm delivery. Insulin-like growth factor (IGF) is involved in the control mechanism of fetal and placental growth and development. The aim of this study was to examine the presence of insulin-like growth factor binding protein 1 (IGFBP-1) in cervicovaginal secretion of pregnant women with symptoms of preterm labor, but with apparently intact fetal membranes and to point out a possible application of the strip test for detection of phIGFBP-1 in diagnosis of preterm premature rupture of total membranes (PPROM) in everyday medical practice. **Methods.** The study was performed at the Department for Obstetrics and Gynecology, Clinical Center of Vojvodina between October 2008 and May 2009. The study included 54 pregnant women between 20–35 weeks of gestation (WG), divided into two groups: the study group (16 pregnant women with symptoms of preterm delivery that gave birth before 37 WG) and the control group (38 pregnant women with the normal course of pregnancy that gave birth on term). In cervicovaginal secretion of the examined pregnant women the level of IGFBP-1 was determined by the immunochromatographic assay with monoclonal antibodies 6303 as a detecting antibody (Actim PROM test, Medix Biochemica, Kauniainen, Finland). **Results.** Gestational age (GA) at delivery in the study group was 32.6 WG and in the control group it was 38.4 WG. Weight of newborns in the study group was 2,021 g and in the control group 3,430 g. IGFBP test was positive in 15 women (93.75%) of the study group, while in the control group it was positive only in 1 woman (2.63%). **Conclusion.** Test on phIGFBP-1 in cervicovaginal mucus was positive in 93.75% women with preterm delivery, suggesting that this test could be used in diagnosis of silent rupture of fetal membranes and in prediction of preterm delivery.

Key words:

obstetric labor, premature; placenta; rupture; vaginal smears; insulin-like growth factor I.

Apstrakt

Uvod/Cilj. Predikcija i prevencija prevremenog porođaja predstavlja veliki izazov i zato bi bilo veoma važno da se u svakodnevnu praksu uvedu markeri koji bi pomogli u prepoznavanju ovih trudnica. Faktor rasta sličan insulinu (IGFBP-1) uključen je u kontrolni mehanizam fetuskog i placentalnog rasta i razvoja. Cilj rada bio je ispitivanje prisutstva vezujućeg proteina-1 za faktor rasta sličan insulinu (IGFBP-1) u cervikovaginalnom sekretu žena sa simptomima prevremenog porođaja, ali sa naizgled intaktnim fetalnim membranama i ukazivanje na mogućnost primene testa na phIGFBP-1 u dijagnostici preterminske premturane rupture (PPROM) fetusnih membrana u svakodnevnoj praksi. **Metode.** Istraživanje je sprovedeno na Klinici za ginekologiju i akušerstvo Kliničkog centra Vojvodine u periodu od oktobra 2008. do maja 2009. godine. Istraživanjem su bile obuhvaćene 54 trudnice između 20 i 35 nedelja gestacije (NG), podeljene dve grupe: ispitivanu (16 trudnica sa simptomima prevremenog porođaja koje su se porodile pre 37 NG) i kontrolnu (38 trudnica sa urednim tokom trudnoće koje su porođene u terminu). U cervikovaginalnom sekretu ispitivanih trudnica određena je koncentracija phIGFBP-1 imunohromatografskom metodom sa monoklonalnim antitelima 6 303 koji vezuju phIGFBP-1. **Rezultati.** Pri porođaju gestacijska starost u ispitivanoj grupi bila je 32,6 NG, a u kontrolnoj 38,4 NG. Telesna masa novorođenčadi u ispitivanoj grupi iznosila je 2 021 g, dok je u kontrolnoj iznosila 3 430 g. Pozitivan phIGFBP-1 u ispitivanoj grupi imalo je 15 (93,75%) trudnica, a u kontrolnoj grupi jedna (2,63%). **Zaključak.** Kod 93,75% trudnica čija trudnoća se završila prevremenim porođajem, test na phIGFBP-1 u cervikovaginalnom mukusu bio je pozitivan, što ukazuje na mogućnost primene ovog testa u dijagnostikovanju prikrivenih ruptura plodovih ovojaka i u predviđanju prevremenog porođaja.

Ključne reči:

porođaj, prevremeni; placenta; ruptura; vaginalni brisevi; IGF1.

Introduction

Prediction and prevention of preterm delivery remain great challenge in obstetrics. Therefore, it would be very important to point out a possible application in everyday medical practice of certain markers that could help in identifying pregnant women with a silent preterm premature rupture (PPROM) of fetal membranes, who have the highest risk of preterm delivery and who might benefit from timely admission and appropriate treatment.

The insulin-like growth factor (IGF) (including IGF-I and IGF-II, their receptors and the binding proteins) is involved in the control mechanism of fetal and placental growth and development. The insulin-like growth factor binding protein 1 (IGFBP-1) is mainly secreted by the fetal and adult liver. Its concentration in maternal plasma increases as pregnancy advances. It is a major constituent of amniotic fluid from the second trimester to term. Concentration of IGFBP-1 in amniotic fluid is 100–1,000 fold higher than in the serum. Amniotic fluid contains non-phosphorylated and less phosphorylated isoforms of IGFBP-1, whereas the decidua contains phosphorylated isoforms, including a highly phosphorylated isoform (phIGFBP-1) not present in amniotic fluid¹⁻⁵. Because of this difference, the origin of IGFBP-1, decidua or amniotic fluid isoforms of IGFBP-1 can be identified through the use of monoclonal antibodies. The presence of amniotic fluid isoforms of IGFBP-1 in cervical samples has proved to be diagnostic as regards rupture of fetal membranes (Actim PROM test, Medix Biochemica, Kauniainen, Finland) and testing is currently in routine use^{1,6-10}.

The aim of this study was to examine the presence of highly phosphorylated isoform (decidual) of the insulin-like

from 1975, which was revised in 1983, and approved by the Ethical Committee of Clinical Center of Vojvodina (Novi Sad). The investigation included 54 pregnant women between 20 and 35 weeks gestation (WG). Gestational age was based on the last menstrual period and was confirmed by early first trimester ultrasonography. A total of 16 women with symptoms of preterm delivery (presence of contractions or increased tonus of the uterus, but without cervical changes or an evident rupture of membranes) who delivered prematurely (before 37 WG) were enrolled into the study group. The control group (n = 38) included pregnant women without symptoms of preterm delivery, who delivered in term (37–40 WG). Anamnestic data were taken from all patients and obstetrical examination was performed. The concentration of phIGFBP-1 in cervicovaginal secretion of investigated pregnant women was measured by immunochromatographic assay with monoclonal antibodies 6 303 as a detecting antibody (Actim PROM test, Medix Biochemica, Kauniainen, Finland).

The pregnant women with positive results of Actim PROM test were treated with antibiotics from the cephalosporine or penicillin groups to prevent infection, and with dexametason (6 mg four times per day in duration of 48 h) for fetal lung maturation.

The Student's *t*-test was used for statistical analysis. Any *p*-value less than 0.05 was considered significant.

Results and discussion

Table 1 shows maternal demographic characteristics (age, information about previous deliveries as well as spontaneous abortions and preterm deliveries) in both the study

Table 1
Demographic characteristics of pregnant women

Characteristics	Study group	Control group
Age (years), $\bar{x} \pm SD$	29.75 \pm 4.64	29.29 \pm 3.59
Gravidy (n), $\bar{x} \pm SD$	2.13 \pm 1.45	1.58 \pm 0.64
Parity (n), $\bar{x} \pm SD$	1.75 \pm 1.06	1.5 \pm 0.6
Previous preterm deliveries (%)	6.25	5.26
Previous spontaneous abortions (%)	25	7.89

Study group – preterm delivery

Control group – term delivery

growth factor binding protein 1 (phIGFBP-1) in cervicovaginal secretion of pregnant women with symptoms of preterm labor, but with apparently intact fetal membranes, as well as to point out a possible application of the strip test for detection of phIGFBP-1 (Actim PROM test, Medix Biochemica, Kauniainen, Finland) in everyday medical practice for diagnosis of increased risk of preterm delivery.

Methods

The study was performed at the Department of Obstetrics and Gynecology, Clinical Center of Vojvodina between October 2008 and May 2009. The protocol for this study was performed in compliance with the Declaration of Helsinki

and the control groups. Maternal age was between 20 and 38 years in both groups (approximately 29.8 years in the study group and 29.3 years in the control group). Previous preterm deliveries had 6.25% women from the study group and 5.26% women from the control group. Previous spontaneous abortions had 25% women from the study group and 7.89% from the control group.

Table 2 shows obstetric parameters in both investigated groups. The mean GA of pregnant women at the moment Actim PROM test was performed, was 28.2 WG in the study group and 30.3 WG in the control group, while cervical dilatation was 1.9 cm in the study group, and 1.0 cm in the control group. The mean GA at birth was 32.5 WG in the study group and 38.4 WG in the control group.

Table 2

Obstetric parameters in pregnant women

Obstetric parameters	Study group $\bar{x} \pm SD$	Control group $\bar{x} \pm SD$
Gestational age at admission (weeks)	28.19 ± 6.39	30.32 ± 4.81
Gestational age at delivery (weeks)	32.56 ± 2.53	38.38 ± 1.13
Cervix dilatation in the moment of hospitalization (cm)	1.88 ± 1.23	0.99 ± 0.84

Study group – preterm delivery

Control group – term delivery

The modus of delivery is shown in Figure 1. Vaginal delivery had 56.25% women from the study group and 81.58% women from the control group. Cesarean section was performed in 43.75% women in the study group, and in 18.42% women in the control group. No postpartum and postoperative complications were noted in the mothers of both groups.

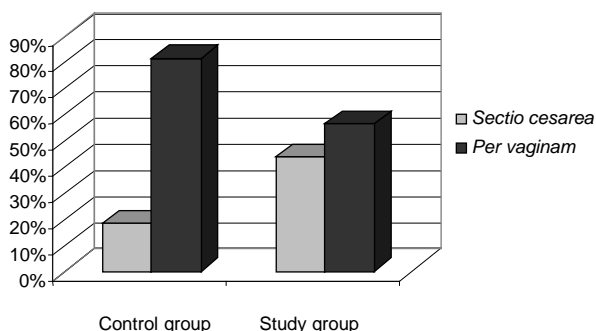


Fig. 1 – The way of the delivery termination

Control group – term delivery

Study group – preterm delivery

The results of Actim PROM test are presented in Figure 2. Positive test for pHIGFBP-1 had 15 (93.75%) patients in the study group, and only 1 (2.63%) in the control group ($p < 0.05$).

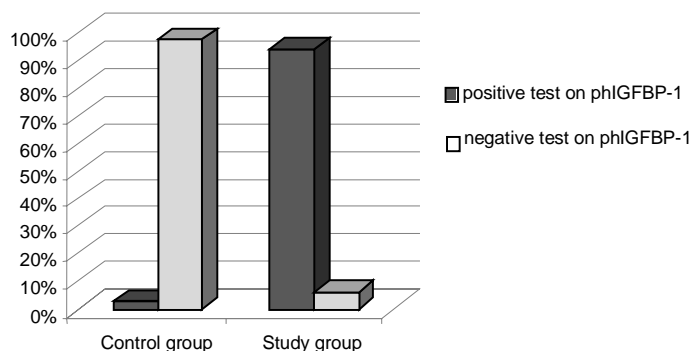


Fig. 2 – Test results on the presence of pHIGFBP-1 in cervical mucus of pregnant women (study group – preterm delivery; control group – term delivery)

In both groups there were 53 live births and one stillbirth (in the study group). Average body weight of the infants in the study group was 2,021 g, and in the control group 3,430 g.

Preterm premature rupture of fetal membranes is very frequent diagnostic and therapeutic dilemma in obstetrics.

The tests previously used for diagnosis of PPRM (the use of litmus paper or nitrazine swabs for detection of vaginal pH, the vaginal prolactin test, tests for alpha-fetoprotein and vaginal fibronectin) are insufficient and frequently give false positive results because of the presence of blood or semen in cervical mucus and vagina.

The Actim PROM test is superior in comparison with the tests mentioned above because it does not react with mucus, blood or semen, and sensitivity of the test is so high that even micro ruptures of fetal membranes can be detected¹¹⁻¹⁸.

The obtained results suggest that 93.75% pregnant women who delivered prematurely (the study group) also had preterm rupture of fetal membranes (positive test for pHIGFBP-1 in cervical mucus). This indicates the possibility of using this test in diagnosis of micro ruptures of fetal membranes. Since the test is very simple and gives a result in a few minutes, it is possible to prescribe antibiotics and corticosteroid therapy for pregnant women in the nick time and to prolong their pregnancy, as well as to suppress infection and avoid respiratory distress in newborns.

Conclusion

Our results suggest that IGFBP-1 test could be used in diagnosis of silent rupture of fetal membranes and in prediction of preterm delivery.

Acknowledgements

The work was supported by the grant of the Provincial Secretariat for Science and Technological Development of Vojvodina (Grant No. 114-451-00592).

R E F E R E N C E S

1. *Kekki M, Kurki T, Paavonen J, Rutanen E-M.* Insulin-like growth factor binding protein-1 in cervix as a marker of infectious complications in pregnant women with bacterial vaginosis. *Lancet* 1999; 353: 1494.
2. *Martina NA, Kim E, Chitkara U, Wathen NC, Chard T, Giudice LC.* Gestational age-dependent expression of insulin-like growth factor-binding protein-1 (IGFBP-1) phosphoisoforms in human extraembryonic cavities, maternal serum, and decidua suggests decidua as the primary source of IGFBP-1 in these fluids during early pregnancy. *J Clin Endocrinol Metab* 1997; 82(6): 1894–8.
3. *Jain K, Morris PG.* A clinical study to evaluate the usefulness of the MAST test in diagnosing pre-labour rupture of membranes. *J Obstet Gynaecol* 1998; 18(1): 33–6.
4. *Giudice LC, de Zegher F, Gargosky SE, Dsupin BA, de las Fuentes L, Crystal RA, et al.* Insulin-like growth factors and their binding proteins in the term and preterm human fetus and neonate with normal and extremes of intrauterine growth. *J Clin Endocrinol Metab* 1995; 80(5): 1548–55.
5. *Verhaeghe J, Van Herck E, Billen J, Moerman P, Van Assche EA, Giudice LC.* Regulation of insulin-like growth factor-I and insulin-like growth factor binding protein-1 concentrations in preterm fetuses. *Am J Obstet Gynecol* 2003;188(2): 485–91.
6. *Lembet A, Eroglu D, Ergin T, Kuscu E, Zeyneloglu H, Batioglu. S, et al.* New rapid bed-side test to predict preterm delivery: phosphorylated insulin-like growth factor binding protein-1 in cervical secretion as a predictor of preterm delivery. *Acta Obstet Gynecol Scand* 2002; 81(8): 706–12.
7. *Kekki M, Kurki T, Kärkkäinen T, Hiilesmaa V, Paavonen J, Rutanen EM.* Insulin-like growth factor-binding protein-1 in cervical secretion as a predictor of preterm delivery. *Acta Obstet Gynecol Scand* 2001; 80: 546–51.
8. *Darj E, Lyrenäs S.* Insulin-like growth factor binding protein-1, a quick way to detect amniotic fluid. *Acta Obstet Gynecol Scand* 1998; 77: 295–7.
9. *Westwood M, Gibson JM, Davies AJ, Young RJ, White A.* The phosphorylation pattern of insulin-like growth factor-binding protein-1 in normal plasma is different from that in amniotic fluid and changes during pregnancy. *J Clin Endocrinol Metab* 1994; 79(6): 1735–41.
10. *Rutanen EM, Pekonen F, Kärkkäinen T.* Measurement of insulin-like growth factor binding protein-1 in cervical/vaginal secretions: comparison with the ROM-check Membrane Immunoassay in the diagnosis of ruptured fetal membranes. *Clin Chim Acta* 1993; 214(1): 73–81.
11. *Bittar RE, da Fonseca EB, de Carvalho MH, Martinelli S, Zugaib M.* Predicting preterm delivery in asymptomatic patients with prior preterm delivery by measurement of cervical length and phosphorylated insulin-like growth factor-binding protein-1. *Ultrasound Obstet Gynecol* 2007; 29(5): 562–7.
12. *Paternoster DM, Muresan D, Vitulo A, Serena A, Battaglini G, Dell'Avanzo M.* Cervical pHIGFBP-1 in the evaluation of the risk of preterm delivery. *Acta Obstet Gynecol Scand* 2007; 86: 151–5.
13. *Elizur SE, Yinon Y, Epstein GS, Seidman DS, Schiff E, Sivan E.* Insulin-like growth factor binding protein-1 detection in preterm labor: evaluation of a bedside test. *Am J Perinatol* 2005; 22: 305–9.
14. *Eroglu D, Yanik F, Oktem M, Zeyneloglu HB, Kuscu E.* Prediction of preterm delivery among women with threatened preterm labor. *Gynecol Obstet Invest* 2007; 64(2): 109–16.
15. *Hills FA, Gunn LK, Hardiman P, Thamaratnam S, Chard T.* IGFBP-1 in the placenta, membranes and fetal circulation: levels at term and preterm delivery. *Early Hum Dev* 1996; 44: 71–6.
16. *Erdemoglu E, Mungan T.* Significance of detecting insulin-like growth factor binding protein-1 in cervicovaginal secretions: Comparison with nitrazine test and amniotic fluid volume assessment. *Acta Obstet Gynecol Scand* 2004; 83: 622–6.
17. *Cvetković M, Ljubić A.* Protocols of high risk pregnancies. Beograd: Medicina moderna; 2002.
18. *Gibbs RS, Karlan BY, Haney AF, Nygaard IE.* Danforth's Obstetrics and Gynecology. Philadelphia, PA: Lippincott Williams and Wilkins; 2008.

Received on January 9, 2009.
Accepted on November 23, 2009.



Simultano određivanje amoksicilina i klavulanske kiseline u humanoj plazmi metodom tečne hromatografije sa elektrosprej jonizacijom i masenom spektrometrijom (UPLC/MS)

Simultaneous determination of amoxicillin and clavulanic acid in the human plasma by high performance liquid chromatography – mass spectrometry (UPLC/MS)

Biljana Ćirić*, Dušan Jandrić†, Vesna Kilibarda*, Jasmina Jović-Stošić*,
Viktorija Dragojević-Simić†, Slavica Vučinić*

Vojnomedicinska akademija, *Centar za kontrolu trovanja,

†Centar za kliničku farmakologiju, Beograd, Srbija

Apstrakt

Uvod/Cilj. Kvantitativna analiza amoksicilina i klavulanske kiseline u biološkom matriksu zahteva osetljive i selektivne metode koje omogućavaju određivanje opsega terapijskih koncentracija u $\mu\text{g/mL}$. Metode koje su opisane u literaturi za određivanje koncentracije ovih lekova u biološkom materijalu su tečna hromatografija sa ultraviolet detekcijom (HPLC–UV) i tečna hromatografija-masena spektrometrija (LC–MS). Cilj ove studije bio je da se razvije osetljiva i specifična metoda tečne hromatografije ultraperformansi u kombinaciji sa elektrosprej jonizacijom i masenom spektrometrijom (UPLC/MS) koja se može primeniti za spektralnu identifikaciju i kvantifikovanje niskih koncentracija amoksicilina i klavulanske kiseline u uzorcima humane plazme. **Metode.** U ovoj studiji razvijena je osetljiva i specifična metoda UPLC/MS. Uzorci plazme uzeti su od zdravih odraslih osoba oba pola, koje su jednokratno *per os* primile tabletu amoksicilina (875 mg) u kombinaciji sa klavulanskom kiselinom (125 mg). **Rezultati.** Primenjena je precipitacija proteina sa perhlornom kiselinom i postignut limit kvantifikacije (*limit of quantification* – LOQ) za amoksicilin i klavulansku kiselinu od $0,01 \mu\text{g/mL}$ koji u toku studije nije pokazivao značajno odstupanje ($\text{RSD} < 7\%$). Prinosi ekstrakcije iz plazme za amoksicilin kretali su se u rasponu od 98,82 do 100,9% (za koncentracije 1, 5 i $20 \mu\text{g/mL}$), dok je prinos za klavulansku kiselinu iznosio 99,89 do 100,1% (za koncentracije 1, 2 i $5 \mu\text{g/mL}$). Izračunati su odgovarajući farmakokinetički parametri amoksicilina i klavulanske kiseline čije su vrednosti odgovarale onima dobijenim pomoću već opisanih metoda (HPLC–UV i LC/MS) za određivanje amoksicilina i klavulanske kiseline u plazmi. **Zaključak.** Metoda UPLC/MS obezbeđuje kraće vreme analize (5 min) i niži LOQ u odnosu na druge metode opisane u literaturi (LC/MS–MS) i može se koristiti za farmakokinetička ispitivanja amoksicilina i klavulanske kiseline.

Ključne reči:

amoksicilin; klavulanska kiselina; plazma; ljudi; hromatografija, tečna; spektrometrija mase.

Abstract

Background/Aim. Quantitative analysis of amoxicillin and clavulanic acid in biological matrices requires sensitive and specific methods which allow determination of therapeutic concentration in $\mu\text{g/mL}$ range. Analytical methods for determination of their concentrations in body fluids described in literature include high performance liquid chromatography coupled to UV detector (HPLC–UV) and liquid chromatography–mass spectrometry (LC–MS). The aim of this study was to develop sensitive and specific ultra performance liquid chromatography/mass spectrometry (UPLC/MS) method which could be used for the spectral identification and quantification of the low concentrations of amoxicillin and clavulanic acid in the human plasma. **Method.** A sensitive and specific UPLC/MS method for amoxicillin and clavulanic acid determination was developed in this study. The samples were taken from the adult healthy volunteers receiving *per os* one tablet of amoxicillin (875 mg) in combination with clavulanic acid (125 mg). **Results.** Plasma samples were pretreated by direct deproteinization with perchloric acid. Quantification limit of $0.01 \mu\text{g/mL}$ for both amoxicillin and clavulanic acid was achieved. The method was reproducible day by day ($\text{RSD} < 7\%$). Analytical recoveries for amoxicillin ranged from 98.82% to 100.9% (for concentrations of 1, 5 and $20 \mu\text{g/mL}$), and recoveries for clavulanic acid were 99.89% to 100.1% (for concentrations of 1, 2 and $5 \mu\text{g/mL}$). This assay was successfully applied to a pilot pharmacokinetic study in healthy volunteers after a single-oral administration of amoxicillin/clavulanic combination. The determined plasma concentrations of both amoxicillin and clavulanic acid were in the range of the expected values upon the literature data for HPLC–UV and LC–MS methods. **Conclusion.** The described method provided a few advantages comparing with LC/MS–MS method. The method is faster using running time of 5 minute, has lower limit of quantification (LOQ) and it could be used in pharmacokinetic studies of both amoxicillin and clavulanic acid.

Key words:

amoxicillin; clavulanic acid; plasma; humans; chromatography, liquid; mass spectrometry.

Uvod

Amoksicilin je dobro poznat polusintetski penicilin, analog ampicilina, sa sličnim širokim spektrom baktericidne aktivnosti protiv mnogih gram pozitivnih i gram negativnih bakterija¹⁻³. *In vitro* ispitivanja pokazala su da je aktivniji protiv *Enterococcus faecalis*, *Helicobacter pylori* i *Salmonella* spp, ali manje aktivan protiv *Shigella* spp, a resorbuje se brže i kompletnije iz gastrointestinalnog trakta nego ampicilin, što je glavna razlika između njih. Koristi se u tretmanu čitavog niza infekcija u koje spadaju i infekcije donjih respiratornih puteva, prvenstveno vanbolničke pneumonije, izazvane osjetljivim sojevima streptokoka, stafilokoka i *H. influenzae*.

Nakon oralne primene lek se dobro resorbuje. Ima visoku bioraspodivnost koja je dozno zavisna i smanjuje se povećanjem doze. Maksimalne koncentracije leka u plazmi postižu se 1 do 2 sata nakon primene. One kod zdravih, odraslih osoba iznose 5 µg/mL nakon oralne primene 250 i 500 mg, a 34–50 µg/mL nakon intravenskog davanja 500 mg^{4,5}.

Oko 20% leka vezuje se za proteine plazme, a poluživot u plazmi iznosi 1 do 1,5 čas, mada može biti produžen kod novorođenčadi, starih osoba i pacijenata sa oštećenjem bubrega. Amoksicilin se široko distribuira u organizmu, ali slabo prodire u cerebrospinalnu tečnost, izuzev kada su moždane opne zahvaćene inflamatornim procesom^{3,4}.

Lek se metaboliše u ograničenoj meri u peniciloičnu kiselinu, koja se izlučuje urinom; 60% oralne doze amoksicilina ekskretuje se nepromenjeno u urinu u roku od šest sati glomerularnom filtracijom i tubularnom sekrecijom. Visoke koncentracije leka nađene su i u žuči. Izvesna količina verovatno se izlučuje i fecesom^{3,4}.

Klavulanska kiselina je inhibitor β-laktamaze koji se kombinuje sa nekim od penicilinskih antibiotika, najčešće amoksicilinom. Ovakve kombinacije primenjuju se u slučajevima infekcija izazvanih sojevima bakterija koje luče β-laktamazu. Zahvaljujući dejstvu klavulanske kiseline, sprečava se razgradnja antibiotika od strane β-laktamaze koja bi delovala protiv samog antibiotika³.

Postoji više metoda opisanih u literaturi za određivanje amoksicilina i klavulanske kiseline u biološkim tečnostima. Metode koje su se do sada koristile za određivanje ovih supstanci u biološkom materijalu bile su tečna hromatografija sa ultraviolet detekcijom (HPLC–UV)⁶ i tečna hromatografija-masena spektrometrija (LC–MS)⁷⁻¹⁵. U svakom slučaju, kvantitativna analiza amoksicilina i klavulanske kiseline u biološkom matriksu (kao što su plazma, serum ili urin) zahteva osjetljive i selektivne metode koje omogućavaju određivanje opsega terapijskih koncentracija u µg/mL.

Cilj ovog rada bio je da se razvije osjetljiva i specifična metoda tečne hromatografije ultra performansi u kombinaciji sa elektrosprej jonizacijom i masenom spektrometrijom (UPLC/MS) koja bi se mogla primeniti za spektralnu identifikaciju i kvantifikovanje niskih koncentracija amoksicilina i klavulanske kiseline u uzorcima humane plazme.

Metode

U radu su korišćeni analitički standardi amoksicilin trihidrata, karbamazepina (Sigma-Aldrich, USA) i litijum klavulanata (USP, Rockville, USA) i hemikalije: metanol, acetonitril, MilliQ water, perhlorna kiselina, mravlja kiselina (Merck, Darmstadt, Germany).

Za određivanje amoksicilina i klavulanske kiseline korišćena je tehnika tečne hromatografije ultra performansi u sprezi sa masenim spektrometrom, sledećih karakteristika:

- UPLC/MS: Waters Acquity SQD UPLC System
- Kolona: Waters, Acquity UPLC BEH C18 column (2,1 × 50 mm, 1,7 µm)
- Temperatura kolone: 20 °C
- Kondicioniranje pumpe: korišćena je mobilna faza A i B u odnosu 95:5
- A: voda (sadrži 0,1% mravlje kiseline) i
- B: acetonitril (sadrži 0,1% mravlje kiseline)
- Ukupno vreme hromatografisanja bilo je 5 min.
- Zapremina injektovanja: 4 µL
- Protok mobilne faze: 0,5 mL/min

Detektor: maseni detektor je bio optimiziran i nalazio se u pozitivnom ESI modu: protonizovani molekulski jon: m/z 365,9→348,9 za amoksicilin; protonizovani molekulski jon: m/z 237,00 za interni standard karbamazepin; protonizovani molekulski jon: m/z 199,00 za klavulansku kiselinu.

Retenciono vremena za amoksicilin, klavulansku kiselinu i interni standard karbamazepin bila su 0,9 ± 0,5 min, 2,5 ± 0,5 min i 2,8 ± 0,5 min, respektivno.

Izrada standardnih rastvora i priprema uzoraka:

Osnovni rastvori svih radnih standarda koncentracije 1,00 mg/mL rastvarani su u mobilnoj fazi.

Priprema uzoraka za analizu

Amoksicilin i klavulanska kiselina određivani su u plazmi 24 zdrave odrasle osobe, oba pola koje su prethodno uzele jednu tabletu preparata na bazi amoksicilina (875 mg) i klavulanske kiseline (125 mg), posle perioda gladovanja od najmanje 18 h.

Uzorci plazme sakupljeni su u sledećim intervalima posle uzimanja leka, izraženo u časovima: 0,0; 0,25; 0,50; 0,75; 1; 1,25; 1,50; 1,75; 2,00; 2,25; 2,50; 2,75; 3,00; 4,00; 5,00; 6,00; 9,00 i 12 sati, a potom zamrznuti i čuvani na – 40 °C do analize.

Nakon otapanja zamrznutih uzoraka plazme na sobnoj temperaturi, za analizu je uzimana zapremina od 200 µL kojoj je dodato 100 µL internog standarda. Posle mešanja na vorteksu u trajanju od 30 sekundi, dodato je 700 µL 0,33 N perhlorne kiseline, mešano na vorteksu 60 sekundi, a potom centrifugirano na 8 000 g u toku 3 minuta. Odvajanje čistog supernatanta izvršeno je posle precipitacije i injektovano je 4 µL u analitičku kolonu.

Priprema uzoraka analitičkih standarda za kalibracionu krivu i uzoraka za kontrolu kvaliteta (validacija)

Osnovni rastvori analitičkih standarda amoksicilina i klavulanske kiseline pripremljeni su rastvaranjem 10 mg u

10 mL mobilne faze. Niže kalibracione koncentracije pripremljene su razblaženjem osnovnih rastvora do nivoa očekivanih koncentracija u plazmi zdravih odraslih ljudi.

Kalibracioni i drugi kontrolni uzorci pripremljeni su dodavanjem odgovarajućih rastvora u „blanko“ humanu plazmu.

Dodate količine odgovarale su koncentracijama amoksisicilina u plazmi zdravih odraslih ljudi u opsegu od 0,01 µg/mL do 40 µg/mL, a za klavulansku kiselinu u opsegu od 0,01 µg/mL do 10 µg/mL.

Kalibracione krive amoksisicilina dobijene su izračunavanjem faktora iz odnosa površina hromatografskih pikova amoksisicilin/interni standard sledeće koncentracije standarda analita: 0,01; 0,10; 1,00; 10,0; 20,0; 40,0 µg/mL. Kalibracione krive klavulanske kiseline dobijene su izračunavanjem faktora iz odnosa površina hromatografskih pikova klavulanska kiselina/interni standard sledeće koncentracije standarda analita: 0,1; 0,50; 1,00; 2,00; 5,00 i 10,0 µg/mL. Njihove jednačine pravih izračunate su primenom linearne regresije. Koncentracije kod nepoznatih uzoraka kvantifikovane su u odnosu na regresionu liniju kalibracione krive.

Rezultati

Za određivanje koncentracije amoksisicilina i klavulanske kiseline u uzorcima razvijena je i primenjena UPLC/MS

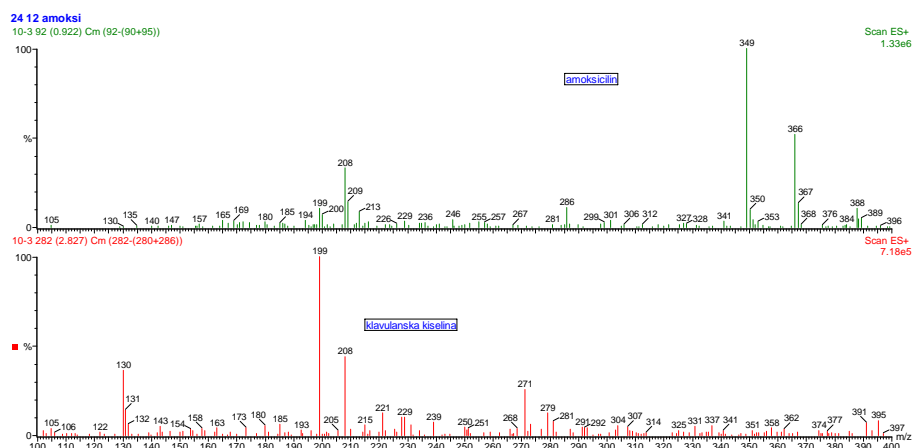
metoda. Analiza uzoraka plazme vršena je u ESI modu za jonske mase m/z 365,9→348,9 za amoksisicilin i m/z 237,00 za karbamazepin, interni standard i 199 za klavulansku kiselinu (slika 1).

Retenciono vreme bilo je: $0,9 \pm 0,5$ min za amoksisicilin, $2,5 \pm 0,5$ min za karbamazepin i $2,8 \pm 0,5$ min za klavulansku kiselinu. Komponente iz matriksa nisu ometale određivanje amoksisicilina. Na slici 2 prikazani su hromatogrami plazme jednog od uzoraka zdrave osobe.

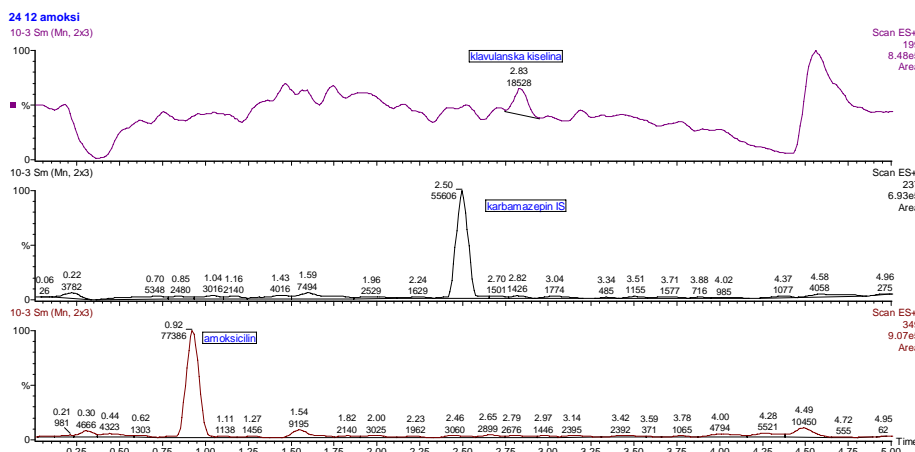
Prinosi ekstrakcije iz plazme za amoksisicilin kretali su se u rasponu od 98,82–100,9% (analiza vršena sa plazmom opterećenom amoksisicilinom u koncentracijama 1, 5 i 20 µg/mL), dok je prinos za klavulansku kiselinu iznosio 99,89–100,1% (analiza vršena sa plazmom opterećenom klavulanskom kiselinom u koncentracijama 1, 2 i 5 µg/mL) (tabela 1).

Izračunavanje koncentracije amoksisicilina i klavulanske kiseline vršeno je na osnovu jednačine kalibracione krive koja je dobijena nakon analize uzoraka plazme opterećenih standardnim rastvorima amoksisicilina, klavulanske kiseline i internog standarda (slike 3 i 4).

Primenom opisane metode za određivanje amoksisicilina i klavulanske kiseline u plazmi određene su njihove koncentracije u plazmi zdravih odraslih osoba posle jednokratne primene tableta sa 875 mg amoksisicilina i 125 mg klavulanske kiseline (slika 5).



Sl. 1 – Maseni spektri amoksisicilina i klavulanske kiseline



Sl. 2 – UPLC/MS hromatogrami plazme uzorka zdrave osobe: retenciono vreme za klavulansku kiselinu je 2,83 min, za karbamazepin (interni standard) je 2,5 min i amoksisicilin 0,92 min

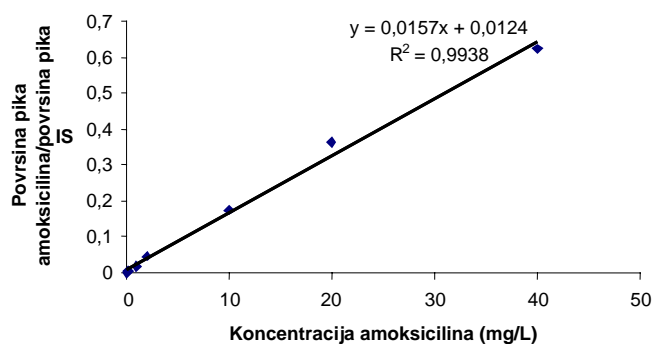
Tabela 1
Limit kvantifikacije (LOQ), preciznost i tačnost UPLC/MS metode za određivanje amoksicilina i klavulanske kiseline u plazmi

Lek (µg/mL)	Koncentracija (µg/mL)	RSD (%)	Recovery (%)
Amoksicilin			
1,0	1,010364	3,6926	101,0
5,0	4,984198	0,3493	99,68
20,0	20,06926	0,6892	100,3
Prosečna vrednost LOQ ((µg/mL)	0,010023		
Prosečna vrednost RSD za LOQ (%)	6,210911		
Klavulanska kiselina			
1,0	0,998979	3,4543	99,89
2,0	1,98419	0,8774	99,20
5,0	5,00093	1,3524	100,1
Prosečna vrednost LOQ ((µg/mL)	0,098023		
Prosečna vrednost RSD za LOQ (%)	6,0741507		

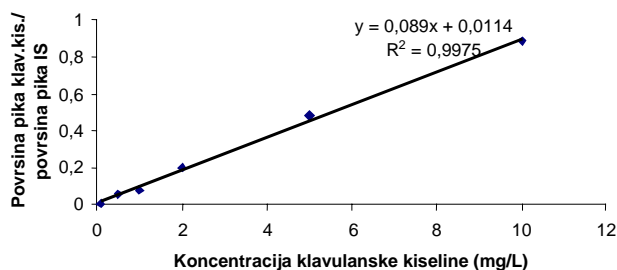
RSD – relativna standardna devijacija

Recovery – prinos

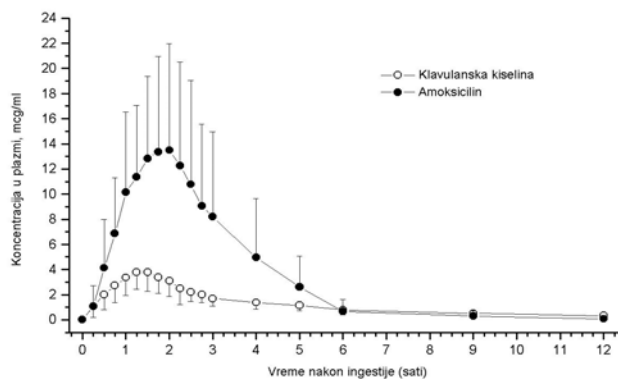
NAPOMENA: Rezultati su predstavljeni kao srednje vrednosti šest merenja u toku tri dana



Sl. 3 – Kalibraciona kriva za amoksicilin u plazmi (raspon od 0,01 do 40 µg/mL)



Sl. 4 – Kalibraciona kriva za klavulansku kiselinu u plazmi (raspon od 0,01 do 10 µg/mL)



Sl. 5 – Koncentracije amoksicilina i klavulanske kiseline u plazmi kod zdravih odraslih osoba oba pola nakon jednokratne oralne primene njihove kombinacije u formi tablete (875 mg + 125 mg)

Na osnovu dobijenih vrednosti bilo je moguće izračunati i osnovne farmakokinetičke parametre amoksicilina i klavulanske kiseline nakon njegove *per os* primene zdravih odraslih osoba (tabela 2).

Takođe, opisana je jednostavna, ekonomična i reproduibilna HPLC-MS metoda za određivanje amoksicilina u humanoj plazmi¹², uz pomoć koje su nakon oralne primene leka od 1 000 mg dobijene vrednosti farmakokinetičkih para-

Tabela 2
Srednje vrednosti farmakokinetičkih parametara amoksicilina i klavulanske kiseline nakon njihove jednokratne *per os* primene kod zdravih odraslih osoba oba pola u formi tablete (875 mg + 125 mg)

Lek	C _{max} (µg/mL)	T _{max} (sati)	K _{el} (h ⁻¹)	t _{1/2} (sati)
Amoksicilin	17,21 ± 8,10	1,57 ± 0,50	1,023 ± 0,829	1,14 ± 0,86
Klavulanska kiselina	5,01 ± 1,59	1,42 ± 0,43	0,301 ± 0,187	2,93 ± 1,15

C_{max} – maksimalna koncentracija u plazmi

T_{max} – vreme postizanja maksimalne koncentracije u plazmi

K_{el} – konstanta eliminacije

t_{1/2} – vreme polueliminacije

Diskusija

Kvantitativna analiza amoksicilina i klavulanske kiseline u biološkom matriksu zahteva osetljive i selektivne metode koje omogućavaju određivanje opsega terapijskih koncentracija u µg/mL.

Prema podacima iz literature, danas se za određivanje koncentracije amoksicilina i klavulanske kiseline u biološkom materijalu koriste HPLC-UV i LC-MS⁶⁻¹⁵.

Pored dosad opisanih metoda, postojala je potreba da se uvede metoda specifičnija, osetljivija i brža, koja se može primeniti za spektralnu analizu ovih jedinjenja kiseline u uzorcima humane plazme. Poznato je da vreme analize HPLC-UV metode traje 10 min¹⁸, a LC-MS/MS metode 6,5 min⁹.

Primena UPLC/MS tehnike omogućila nam je da se za kraći vremenski period analizira veći broj uzoraka, budući da vreme analize traje samo 5min, a da pritom nije smanjena osetljivost metode. Amoksicilin i klavulanska kiselina su termolabilna jedinjenja, pa je primena UPLC/MS tehnike, uz reverznofaznu kolonu C18 kolona (2,1 × 50 mm, 1,7 µm), idealna za analizu ovakvih jedinjenja. Ova metoda do sada nije opisana u literaturi. Primenjena je precipitacija proteina sa perhlornom kiselinom. Prinosi dobijeni posle precipitacije kretali su se u rasponu od 98,82 do 100,9% za amoksicilin, dok je prinos za klavulansku kiselinu iznosio 99,89 do 100,1%. Dobijeni rezultati bili su u rangu LC/MS-MS metode kojom se postiže prinos od 98,7 do 101,9%^{9,12}. U literaturi su opisani i drugi načini ekstrakcije: tečno-tečna i čvrsto-tečna ekstrakcija sa prinosima nižim od metode koju smo primenili i kretali su se u rasponu od 66,3%¹² do 94,38%¹¹.

Wen i sar.⁹ opisali su LC/MS-MS tehniku za određivanje amoksicilina u uzorcima plazme kod zdravih ljudi. Primenjena je precipitacija proteina sa metanolom koja nije odgovarala našoj studiji jer metanol nije pokazao dovoljno dobru selektivnost za oba ispitivana jedinjenja.

Primenom LC/MS-MS metode maksimalne plazmatske koncentracije leka nakon oralne doze amoksicilina od 1 000 mg kretale su se u rasponu od 12,7 do 13,2 µg/mL, nakon 1,54–1,64h (T_{max})¹⁰.

metara C_{max}, T_{max} i t_{1/2} od 13,30 ± 4,52 µg/ml; 1,92 ± 0,76h i 1,54 ± 0,39h, respektivno¹⁵.

Posebno je interesantan rad autora koji su kod zdravih ljudi ispitivali bioraspoloživost dve oralne formulacije amoksicilina (tablete) primenjenog u dozi od 875 mg¹⁶. Plazmatske koncentracije leka određivane su kombinovanom reverznofaznom tečnom hromatografijom i masenom spektrometrijom sa pozitivnom jon elektrosprej jonizacijom, koristeći metodu monitoringa selekcionisanih jona. Dobijene vrednosti za parametre C_{max}, T_{max} i t_{1/2} za obe formulacije bili su: 18,59 ± 6,3 (17,83 ± 5,86), 1,49 ± 1,57 (1,52 ± 1,31) i 2,04 ± 0,75 (2,02 ± 0,87), respektivno, što je u skladu sa našim rezultatima dobijenim nakon oralne primene leka u istoj dozi.

Iz ovoga sledi da se metodom opisanom u ovom radu dobijaju rezultati uporedivi sa onima od LC/MS metode.

Dosadašnja ispitivanja pokazala su da su plazmatske koncentracije amoksicilina koje se postižu nakon primene leka u kombinaciji sa klavulanskom kiselinom iste kao one koje se dobijaju posle peroralne primene ekvivalentnih doza samog amoksicilina¹⁷. Zbog toga smatramo da se i naša metoda može koristiti za određivanje koncentracije amoksicilina primenjenog u obliku monokomponentnih preparata kako za potrebe farmakokinetičkih studija, tako i za potrebe praćenja terapijskih koncentracija leka u plazmi.

Zaključak

Razvijena je osetljiva i specifična metoda tečne hromatografije ultra performansi u kombinaciji sa elektrosprej jonizacijom i masenom spektrometrijom (UPLC/MS) koja je primenjena za spektralnu identifikaciju i kvantifikovanje niskih koncentracija amoksicilina i klavulanske kiseline u uzorcima humane plazme. Ova metoda obezbeđuje kraće vreme analize (5min) i niži LOQ u odnosu na već opisane metode za određivanje amoksicilina (LC/MS-MS), a dobijene koncentracije leka omogućile su izračunavanje odgovarajućih farmakokinetičkih parametara amoksicilina koji su bili uporedivi sa onima dobijenim pomoću HPLC-UV i LC/MS metode.

L I T E R A T U R A

1. *Petri WA*. Penicillins, Cephalosporins and other β -lactam antibiotics. In: *Brunton LL, Lazo JS, Parker KL*, editors. Goodman & Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics. 11th ed. New York: McGraw-Hill; 2006. p. 1127-54.
2. *Katzung BG*. Basic and clinical pharmacology. 10th ed. Boston: McGrawHill Lange; 2007.
3. *Sweetman SC*. Martindale: the complete drug reference. 35th ed. England, London: Pharmaceutical Press; 2007. p. 1818-30.
4. *Höffler D*. The pharmacokinetics of amoxicillin. *Adv Clin Pharmacol* 1974; 7: 28-30. (German)
5. *Sjovall J, Alvan G, Hultfeldt B*. Intra- and inter-individual variation in pharmacokinetics of intravenously infused amoxicillin and ampicillin to elderly volunteers. *Br J Clin Pharmacol* 1986; 21: 171-81.
6. *Foroutan SM, Zarghi A, Shafaati A, Khoddam A, Movahed H*. Simultaneous determination of amoxicillin and clavulanic acid in human plasma by isocratic reversed-phase HPLC using UV detection. *J Pharm Biomed Anal* 2007; 45(3): 531-4.
7. *Reyns T, De Baere S, Croubels S, De Backer P*. Determination of clavulanic acid in calf plasma by liquid chromatography tandem mass spectrometry. *J Mass Spectrom* 2006; 41(11): 1414-20.
8. *Pires de Abreu LR, Ortíz RM, de Castro SC, Pedrazzoli J Jr*. HPLC determination of amoxicillin comparative bioavailability in healthy volunteers after a single dose administration. *J Pharm Pharm Sci* 2003; 6(2): 223-30.
9. *Wen A, Hang T, Chen S, Wang Z, Ding L, Tian Y*, et al. Simultaneous determination of amoxicillin and ambroxol in human plasma by LC-MS/MS: validation and application to pharmacokinetic study. *J Pharm Biomed Anal* 2008; 48: 829-34.
10. *Sailer R, Arnold P, Erenmemişoğlu A, Martin W, Tamur U, Kanzyk I*, et al. Comparative pharmacokinetics of two tablet formulations of amoxicillin: bioequivalence assessment. *Arzneimittelforschung* 2007; 57(4): 227-31.
11. *Gonçalves TM, Bedor DC, de Abreu LR, de Sousa CE, Rolim CM, de Santana DP*. Determination of ampicillin in human plasma by solid-phase extraction-liquid chromatography-tandem mass spectrometry (SPE-LC-MS/MS) and its use in bioequivalence studies. *Arzneimittelforschung* 2008; 58(2): 91-6.
12. *Khuroo AH, Monif T, Verma PR, Gurule S*. Simple, economical, and reproducible LC-MS method for the determination of amoxicillin in human plasma and its application to a pharmacokinetic study. *J Chromatogr Sci* 2008; 46(10): 854-61.
13. *AlGaii E, AlDighithi S, Lockyer M, Hammami MM*. Bioequivalence study of two amoxicillin formulations. *Arzneimittelforschung* 2006; 56(1): 48-51.
14. *Sailer R, Arnold P, Erenmemişoğlu A, Martin W, Tamur U, Kanzyk I*, et al. Comparative pharmacokinetics of two tablet formulations of amoxicillin: bioequivalence assessment. *Arzneimittelforschung* 2007; 57(4): 227-31.
15. *Baglie S, Rosalen PL, Franco LM, Ruenis AP, Baglie RC, Franco GC*, et al. Comparative bioavailability of 875 mg amoxicillin tablets in healthy human volunteers. *Int J Clin Pharmacol Ther* 2005; 43(7): 350-4.
16. Physicians' desk reference. 61st ed. Montvale, NJ: Thomson PDR; 2007 [accepted 2007 August 2]. Available from: https://www.rxlist.com/cgi/generic/propan_ids.htm
17. *Hoizey G, Lamiable D, Frances C, Trenque T, Kaltenbach M, Denis J*, et al. Simultaneous determination of amoxicillin and clavulanic acid in human plasma by HPLC with UV detection. *J Pharm Biomed Anal* 2002; 30(3): 661-6.

Primljen 19. VI 2009.

Revidiran 5. X 2009.

Prihvaćen 1. XII 2009.



Kinetics of C-reactive protein, interleukin-6 and -10, and phospholipase A₂-II in severely traumatized septic patients

Kinetika C-reaktivnog proteina, interleukina 6 i 10 i fosfolipaze A₂II kod bolesnika sa teškim povredama i sepsom

Željko Laušević*, Goran Vuković*, Biljana Stojimirović†,
Jasna Trbojević-Stanković‡, Vladimir Resanović*, Mirjana Laušević†

Clinical Center of Serbia, *Center for Emergency Surgery, †Clinic of Nephrology,
Belgrade, Serbia; ‡Clinical Center „Dr Dragiša Mišović“, Department of Hemodialysis,
Belgrade, Serbia

Abstract

Background/Aim. Injury-induced energy is one of the key factors contributing to trauma victims' high susceptibility to sepsis. This group of patients is mostly of young age and it is therefore essential to be able to predict as accurately as possible the development of septic complications, so appropriate treatment could be provided. The aim of this study was to assess kinetics of interleukin (IL) -6 and -10, phospholipase A₂-II and C-reactive protein (CRP) in severely traumatized patients and explore the possibilities for early detection of potentially septic patients. **Methods.** This prospective study included 65 traumatized patients with injury severity score (ISS) > 18, requiring treatment at surgical intensive care units, divided into two groups: 24 patients without sepsis and 41 patients with sepsis. C-reactive protein, IL-6 and -10 and phospholipase A₂ group II, were determined within the first 24 hours, and on the second, third and seventh day of hospitalization. **Results.** Mean values of IL-6 and phospholipase A₂-II in the patients with and without sepsis did not show a statistically significant difference on any assessed time points. In the septic patients with ISS 29–35 and > 35 on the days two and seven a statistically significantly lower level of IL-10 was found, compared with those without sepsis and with the same ISS. C-reactive protein levels were significantly higher in septic patients with ISS 18–28 on the first day. On the second, third and seventh day CRP levels were significantly lower in the groups of septic patients with ISS 29–35 and > 35, than in those with the same ISS but without sepsis. **Conclusion.** Mean levels of CRP on the first day after the injury may be useful predictor of sepsis development in traumatized patients with ISS score 18–28. Mean levels of CRP on the days two, three and seven after the injury may be a useful predictor of sepsis development in traumatized patients with ISS score more than 28. Mean levels of IL-10 on the second and seventh day after the injury may be a useful predictor of sepsis development in traumatized patients with ISS score > 28.

Key words:

wounds and injuries; trauma severity indices; C-reactive protein; interleukin-6; interleukin-10; group II phospholipases A₂; sensitivity and specificity.

Apstrakt

Uvod/Cilj. Anergija izazvana povredom jedan je od najvažnijih faktora koji uslovljavaju predispoziciju bolesnika sa teškim povredama za nastanak sepse. Grupa povređenih bolesnika najčešće je mlađeg životnog doba, pa je izuzetno važno što ranije predvideti nastanak sepse, kako bi se pravovremeno sprovelo odgovarajuće lečenje. Cilj ove studije bio je da se ispita kinetika interleukina-6 i -10, fosfolipaze A₂-II i C-reaktivnog proteina (CRP) kod teško povređenih bolesnika i mogućnosti ranog otkrivanja bolesnika sa rizikom od nastanka sepse. **Metode.** Sprovedena je prospektivna studija koja je obuhvatila 65 povređenih sa skorom težine povrede > 18 koji su lečeni u hiruškoj jedinici Intenzivne nege Urgentnog centra Kliničkog centra Srbije, podeljenih u dve grupe: 24 povređena kod kojih se tokom hospitalizacije nije razvila sepsa i 41 povređeni kod kojih se razvila sepsa. Koncentracije IL-6 i -10, fosfolipaze A₂-II i CRP u serumu bolesnika određivani su tokom prva 24 h, sa ponavljanim merenjima drugog, trećeg i sedmog dana hospitalizacije. **Rezultati.** Prosečna koncentracija IL-6 i fosfolipaze A₂-II u grupama bolesnika sa i bez sepse nisu se statistički značajno razlikovale na dan prijema, kao ni drugog, trećeg i sedmog dana hospitalizacije. Kod bolesnika sa sepsom i skorom težine povrede 29–35 i > 35, u odnosu na bolesnike bez sepse sa istim skorom težine povrede, drugog, trećeg i sedmog dana registrovana je statistički značajno niža prosečna koncentracija CRP, a drugog i sedmog dana niža prosečna koncentracija IL-10. Prosečne koncentracije CRP bile su značajno više na dan prijema kod bolesnika sa sepsom i sa skorom težine povrede 18–28. **Zaključak.** Koncentracija CRP prvog dana povrede mogući je prediktor razvoja sepse kod povređenih sa skorom težine povrede 18–28. Ukoliko je skor težine povrede veći od 28, koncentracija CRP drugog, trećeg i sedmog dana posle povrede, kao i koncentracija IL-10 drugog i sedmog dana korisna je za identifikovanje bolesnika koji će razviti sepsu.

Ključne reči:

povrede; povrede, indeksi težine; sepsa; C-reaktivni protein; interleukin-6; interleukin-10; fosfolipaze A₂; osetljivost i specifičnost.

Introduction

A cytokine cascade activated in response to injury consists of a complex biochemical network with diverse effects on an injured host. Traumatic injury leads to the systemic inflammatory response syndrome (SIRS) followed by a period of recovery mediated by compensatory anti-inflammatory response (CARS), which may induce a prolonged immunosuppressed state^{1, 2}. Injury-induced energy is one of the key factors contributing to trauma victims' high susceptibility to sepsis^{3, 4}.

Unlike other patients' groups with sepsis, trauma patients are mostly young and with unremarkable past medical history. Studies demonstrate that the degree of an initial injury is important in determining patient's susceptibility to post-traumatic complications, but the issue of secondary surgical procedures acting as additional inflammatory insults (second hit) and a genetic predisposition are suspected to be responsible for different outcomes¹. These factors can explain why some patients develop serious post-traumatic complications and others do not, despite the same injury severity scores.

Numerous studies indicate that development of sepsis begins before clinical manifestations^{1, 5}. In a great number of patients clinically full-blown sepsis is a stage with not much left to be done. It is therefore essential to be able to predict as accurately as possible the development of sepsis and determine early indicators of sepsis, so appropriate treatment could be provided. The aim of this study was to determine kinetics of interleukin (IL)-6, IL-10, phospholipase (PL) A₂-II and C-reactive protein (CRP) in traumatized septic patients and assess the possibility of early detection of patients who will develop sepsis following severe trauma.

Methods

This prospective study included 65 patients with severe trauma treated surgically or conservatively at surgical intensive care units of the Clinical Center of Serbia. Patients with primary neurosurgical injury were not included in the study. The entry criteria were: injury severity score (ISS) > 18 (severe injury), age range 16 to 65, admission to the hospital within the first 24 hours following the injury, survival longer than 48 h. The patients with severe trauma were divided into two groups: 24 patients without sepsis and 41 patients with sepsis.

Markers and mediators of inflammation were determined in all patients within the first 24 hours after the trauma, immediately after admittance to the hospital, and on the second, third and seventh day of hospitalization. Phospholipase A₂-II (PLA₂-II) concentration was determined using enzyme-linked immunoadsorbent assay (ELISA; Boehringer Mannheim GmbH, Germany). Reference range was 0–6 ng/mL. The reference range for PLA₂-II, which is not a routine test, was determined from the samples of 120 healthy control group subjects⁶. C-reactive protein concentration was determined by immunonephelometry (the Behring laser nephelometer; normal value < 9mg/mL). Using immunotech

test based on "sandwich" enzyme immunodetermination, concentration of interleukins was determined. The reference range for IL-6 was 0–8 pg/mL, and for IL-10 was 0–10 pg/mL.

Sepsis was diagnosed according to the American College of Chest Physicians/Society of Critical Care Medicine Consensus Conference Committee⁷.

One-way analysis of variance was applied to compare group mean values. The χ^2 test for contingency tables was used to compare frequencies of injured patients with ISS score above and below 29 (median value) in different groups. Values $p < 0.05$ or $p < 0.01$ were considered significant. Kaplan-Meier diagram was used to illustrate mortality and survival of septic and non-septic patients per hospital days.

Results

Ratio of male to female was 52 : 13, which is common for traumatic injuries. Average age of patients was 47.13 ± 15.03 years. Two thirds of patients ($n = 43$; 66.1%) were surgically treated, while 22 patients (33.9%) were either not operated on or had undergone minor surgical intervention under local anesthesia. Length of stay was 23.85 ± 5.94 days, ranging from 2 days (which was entry criterion) to 131 days. Injury severity score ranged from 18 to 45 in all included patients, mean value being 30.48 ± 6.23 . Ten patients had ISS > 35 defining critical injury, while other 55 patients had severe injury. More than one half of patients ($n = 41$; 63.07%) had sepsis. Overall mortality rate was 50.76% (33 patients died, 32 survived). Mortality rate in the septic patients was 75.6%.

Sepsis was diagnosed between the third and the fourth day of hospitalization. By the day five of hospitalization, it was diagnosed in 56% of patients, reaching 96% by the eleventh day of hospital stay (Figure 1).

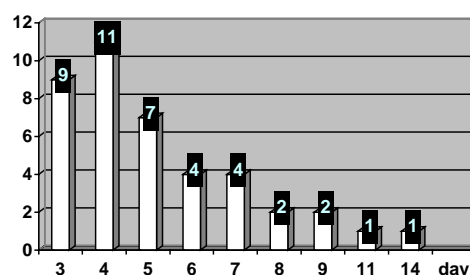


Fig. 1 – Number of patients with development of sepsis per hospital day

Mean values of CRP (mg/L), IL-6, IL-10 and PLA₂ II (ng/L) for both groups per days of hospitalization are shown in Table 1. A statistically significant difference was found in CRP levels between the patients with and without sepsis on the second day (Table 1). A statistically significant difference was found in IL-10 levels in two patient groups on the first and second day (Table 1). Levels of IL-6 and PLA₂-II were not found to be statistically significantly different between the patient groups.

Table 1
C-reactive protein (CRP), interleukin (IL)-6, IL-10 and phospholipase A₂-II (PLA₂-II) daily levels (shown as mean ± SD)

Hospital day	Presence of sepsis	CRP	IL-10	IL-6	PLA ₂ -II
1	+	171.72 ± 13.70	182.09 ± 34.17*	563.70 ± 89.53	82.33 ± 15.29
	-	170.64 ± 24.90	293.25 ± 101.68	517.33 ± 114.4	80.53 ± 18.94
2	+	190.35 ± 16.86*	115.29 ± 20.69†	412.58 ± 76.44	84.66 ± 13.10
	-	223.72 ± 27.66	247.50 ± 98.91	451.33 ± 114.4	87.13 ± 26.70
3	+	186.30 ± 14.94	115.70 ± 39.12	280.00 ± 54.19	82.41 ± 11.09
	-	218.33 ± 28.32	77.46 ± 25.66	252.92 ± 105.0	87.13 ± 26.70
7	+	194.84 ± 15.66	78.14 ± 21.23	208.28 ± 49.90	78.68 ± 14.15
	-	192.56 ± 36.03	185.00 ± 142.74	344.60 ± 289.92	80.32 ± 37.61

**p* < 0.05; †*p* < 0.01; *p* – derived from ANOVA (analysis of variance)

A statistically significant difference was not found in frequencies of injured patients with ISS score above and below 29 (median value) in different groups (Table 2).

The patients were then divided into three groups, according to the severity of injury and ISS level: the group I (ISS 18–28), group II (ISS 29–35) and group III (ISS > 35). Interleukine-6 levels did not differ statistically in the patients with and without sepsis, regardless of the ISS score group. Interleu-

kine-10 levels did not differ statistically in the ISS group 18–28. A statistically significant lower IL-10 was found in the septic patients with ISS 29–35 and > 35, compared with those without sepsis on the days two and seven (Table 3).

No statistical difference was found in PLA₂-II levels among the septic and non septic patients (Table 4). On the first day CRP levels were significantly higher in the septic patients with ISS 18–28. It should be noted that on the sec-

Table 2
Frequencies of injured patients with injury severity score (ISS) above and below 29 (median value) in the groups with and without sepsis

Presence of sepsis	ISS > 29	ISS ≤ 29	Total
+	23	18	41
-	14	10	24
Total	37	28	65

χ² = 0.1893, *p* = ns

Table 3
Interleukin(IL)-6 and IL-10 daily levels (shown as mean ± SE) range in patients with different injury severity score (ISS) values range in the groups with and without sepsis

Interleukins	Hospital day	ISS 18–28		ISS 29–35		ISS 36–45	
		Sepsis		Sepsis		Sepsis	
		Yes (n = 14)	No (n = 9)	Yes (n = 19)	No (n = 12)	Yes (n = 8)	No (n = 3)
IL-6	1	325.80 ± 113.46	180.00 ± 80.71	607.21 ± 142.86	619.28 ± 194.83	816.57 ± 191.62	975.33 ± 261.87
	2	238.90 ± 98.25	222.83 ± 125.25	442.00 ± 123.03	541.86 ± 194.68	650.57 ± 162.17	678.33 ± 165.44
	3	218.60 ± 87.28	65.17 ± 20.21	234.07 ± 75.86	373.83 ± 203.94	459.57 ± 129.59	528.50 ± 125.50
	7	128.25 ± 74.43	24.50 ± 4.50	152.54 ± 38.70	558.00 ± 472.49	363.63 ± 142.58	381.00 ±
IL-10	1	109.20 ± 35.17	120.00 ± 56.05	217.00 ± 67.28	326.37 ± 163.23	216.43 ± 41.55	584.00 ± 286.88
	2	79.40 ± 25.56	63.33 ± 24.16	125.64 ± 36.27*	325.37 ± 174.65	145.86 ± 43.30*	326.00 ± 262.24
	3	52.40 ± 17.81	29.67 ± 12.14	148.93 ± 84.85	125.67 ± 48.54	139.71 ± 24.67	116.00 ± 41.00
	7	20.25 ± 6.50	18.00 ± 13.00	75.00 ± 26.82*	296.33 ± 228.85	122.50 ± 53.04*	143.00 ±

**p* < 0.05

Table 4
C-reactive protein (CRP) and phospholipase A₂II (PLA₂-II) daily levels (shown as mean ± SE) in patients with different injury severity score (ISS) values shown as range in groups with and without sepsis

Parameters	Hospital day	ISS 18–28		ISS 29–35		ISS 36–45	
		Sepsis		Sepsis		Sepsis	
		yes (n = 14)	no (n = 9)	yes (n = 19)	no (n = 12)	yes (n = 8)	no (n = 3)
CRP	1	172.96 ± 19.28*	97.81 ± 24.30	160.23 ± 24.40	218.62 ± 38.12	196.87 ± 22.80	205.33 ± 12.91
	2	178.63 ± 24.90	134.30 ± 15.81	184.15 ± 29.06*	282.75 ± 42.74	225.62 ± 30.59*	249.00 ± 46.50
	3	172.11 ± 25.55	146.19 ± 29.27	174.17 ± 19.94*	267.70 ± 40.51	239.97 ± 38.46*	316.00 ± 58.00
	7	166.34 ± 28.95	105.80 ± 21.42	190.92 ± 21.84*	291.71 ± 52.99	250.50 ± 30.86*	302.00 ±
PLA ₂ -II	1	61.96 ± 18.60	33.20 ± 17.59	70.11 ± 24.35	105.05 ± 30.00	147.02 ± 36.80	128.40 ± 33.34
	2	53.71 ± 18.04	41.34 ± 15.08	85.53 ± 20.81	139.58 ± 37.57	136.80 ± 26.39	155.63 ± 24.14
	3	54.50 ± 15.89	40.39 ± 16.39	79.43 ± 16.13	127.82 ± 48.91	140.75 ± 22.55	110.00 ± 9.00
	7	49.54 ± 16.03	21.55 ± 8.54	82.60 ± 26.00	147.50 ± 74.61	113.09 ± 14.58	104.50 ±

**p* < 0.05

ond, third and seventh day CRP levels were significantly lower in the groups of septic patients with ISS 29–35 and > 35, than in those without sepsis.

Discussion

Traumatized patients typically show increased inflammatory mediators levels early on admission. These levels then gradually normalize within days. If a second rise occurs, this is usually an indicator of complications development (may include systemic infections). Inflammatory mediator level increase or decrease is always present earlier than the clinical symptoms of sepsis⁵.

Mortality rate of the septic patients in our study was rather high (75.6%). Other authors reported mortality rate in such patients ranging from 24% to 80%⁸. The patients included in our study, however, had significantly higher ISS mean value (30.48 ± 6.23). Bearing in mind severity of injuries, high percentage of surgically treated patients, significant number of patients on prolonged mechanical ventilation, it is not surprising. Recently, studies have reported a gender difference in a host defence after trauma, hemorrhage and sepsis⁹. The imbalance in pro- and anti-inflammatory cytokines due to secondary operation after trauma promotes immunological dysfunction that results in a significant morbidity¹⁰.

A group II phospholipase A₂ belongs to a family of acute phase proteins and participates in the host response to inflammation *via* the production of proinflammatory arachidonic acid metabolites. Several authors investigated the role of PLA₂-II in patophysiology of sepsis and multiple trauma^{11–13}. In these studies it was reported that PLA₂-II concentration and kinetics correlate reasonably well with progression and outcome of sepsis. Furthermore, studies report no significant rise in serum concentration of this enzyme 24 hours after trauma or surgery¹¹. This is somewhat different from our results, although mean levels of PLA₂-II in our study are lower on day one of hospitalization than on the following days. It should be emphasized, however, that some patients included in our study (particularly those from remote areas of the country), were admitted to hospital after a longer period of time than in studies done by other authors (always within 24 hours from the injury). This may be the reason for somewhat higher PLA₂-II levels in our patients compared with subjects in other studies. No significant difference in PLA₂-II serum concentration was found between patients with and without sepsis. It may be a result of later development of infectious complications in severely traumatized patients due to immunosuppression (the second hit theory).

Epidemiological data show evidence of a correlation between increased IL-6 levels after trauma and the ISS, the incidence of complications and mortality^{14,15}. Interleukin-6 can be seen as marker for the severity of trauma and a resource in triage, diagnosis and prognosis¹⁵. Most authors agree that an early increased IL-6 level can be marker for a high risk of complications and organ failure^{14,15}. According to previous studies a threshold level of

800 pg/mL on admission might be a good indicator of differentiating between patients with or without organ failure¹⁵. There is a lot of evidence that IL-6 concentration is in a good correlation with severity and outcome of sepsis in humans¹⁵. It was reported that septic patients admitted in intensive care unit had high levels of IL-6, which correlated well with severity of the disease (septic shock) and mortality¹⁵. Several studies reported that IL-6 concentrations correlated well with late development of sepsis and resulting mortality rate in patients urgently admitted to intensive care units^{14,15}.

Mean levels of IL-6 in our patients were very high, especially on the first and second day of hospitalization. Some authors always include cytokine status when stratifying injured patients based on severity of the injury and expected outcome¹⁶. According to these models, cytokine concentrations are classified in four groups with an adequate prognostic significance (number of points)¹⁴. Almost half the patients in our study (45%) fell into the third (IL-6 > 250 pg/L) and fourth (IL-6 > 500 pg/L) group, predicting adverse outcome. Although some authors describe significant IL-6 increase on the first, or even second day after trauma, most report that the window closes after three days, implying that levels of IL-6 have no prognostic value after that point¹⁵. We came to the same conclusions in our study. We found a significant decrease of IL-6 after the second day of hospitalization. Unfortunately, IL-6 level was not particularly useful in early identification of patients who will develop sepsis. Daily values of IL-6 did not differ significantly between the patients with and without sepsis.

Interleukin-10 plays an important role in the anti-inflammatory response. This protein is produced simultaneously with the pro-inflammatory cytokines, but peaks hours later. One of the functions of IL-10 is the negative feedback on the production of TNF- α , IL-6 and IL-8.

Increased levels of IL-10 have been shown to correlate with the development of sepsis or adverse outcome during sepsis. However, IL-10 is unable to discern outcome or severity of illness on an individual level¹⁶. In addition, the biological activity of IL-10 is dependent on the pH and temperature, which is often altered in severely injured or septic patients.

In vitro experiments show that human monocytes produce IL-10 following lipopolysaccharide stimulation, but later than tumor necrosis factor (TNF)- α , IL-1, IL-6, or IL-8. The presence of anti IL-10 antibodies in culture results in an increased production of these cytokines, especially TNF α and IFN- γ , thus implying the regulatory role of IL-10¹⁷.

Our study confirms its protective role. In patients without sepsis mean values of IL-10 are higher on all days except the third one. Statistically significant difference was found in IL-10 levels between two patient groups on the first ($p < 0.05$) and second day ($p < 0.01$). Interleukin-10 has kinetics similar to IL-6.

We did not analyze the ratio between interleukins in question, which was suggested as a predictive factor in some studies¹⁸.

Amongst biomarkers, CRP proved to be useful in the infection diagnosis, infection prediction and monitoring response to antibiotics¹⁹. However, there is still some debate concerning a correlation between its serum concentrations and sepsis severity¹⁹. In our study, all investigated patients had CRP levels higher than normal. The septic patients with less severe trauma (ISS 18–28) had higher CRP levels than those without sepsis. This is an expected finding. The septic patients with ISS over 28 had lower CRP levels than the patients with the same ISS without sepsis. We speculate that these critically injured patients developed anergy, hepatic malfunction, and consequently relatively lower levels of CRP for sepsis.

Conclusion

Mean levels of CRP on the first day after the injury may be useful predictor of sepsis development in traumatized patients with ISS score 18–28. Mean levels of CRP on day two, three and seven after the injury may be useful predictors of sepsis development in traumatized patients with ISS score more than 28.

Mean levels of IL-10 on the second and seventh day after the injury may be a useful predictor of sepsis development in traumatized patients with ISS score > 28.

Interleukin-6 and PLA₂ II kinetics in the first seven days after trauma does not differentiate patients with and without sepsis.

R E F E R E N C E S

1. *Giannoudis PV*. Current concepts of the inflammatory response after major trauma: an update. *Injury* 2003; 34(6): 397–404.
2. *Hildebrand F, Pape HC, Krettek C*. The importance of cytokines in the posttraumatic inflammatory reaction. *Unfallchirurg* 2005; 108(10): 793–4, 796–803.
3. *Keel M, Trentz O*. Pathophysiology of polytrauma. *Injury* 2005; 36: 691–709.
4. *Ni Choileain N, Redmond HP*. The immunological consequences of injury. *Surgeon* 2006; 4(1): 23–31.
5. *Giannoudis PV, Smith RM, Perry SL, Windsor AJ, Dickson RA, Bellamy MC*. Immediate IL-10 expression following major orthopaedic trauma: relationship to antiinflammatory response and subsequent development of sepsis. *Am J Respir Crit Care Med* 2000; 162: 1877–83.
6. *Dajak M, Ignjatović S, Majkić-Singh N, Laušević M, Bukumirović V*. Prognostic value of phospholipase A2 group II, C-reactive protein and Simplified Acute Physiological Score II in intensive care patients. *Clin Lab* 2006; 52: 387–92.
7. *Levy MM, Fink MP, Marshall JC, Abraham E, Angus D, Cook D, et al*. 2001 SCCM/ESICM/ACCP/ATS/SIS International Sepsis Definitions Conference. *Crit Care Med* 2003; 31(4): 1250–6.
8. *Hietbrink F, Koenderman L, Rijkers G, Leenen L*. Trauma: the role of the innate immune system. *World J Emerg Surg* 2006;1: 15.
9. *Frink M, Pape HC, van Griensven M, Krettek C, Chaudry IH, Hildebrand F*. Influence of sex and age on MODS and cytokines after multiple injuries. *Shock* 2007; 27(2):151–6.
10. *Pape HC, van Griensven M, Rice J, Gänsslen A, Hildebrand F, Zech S, et al*. Major secondary surgery in blunt trauma patients and perioperative cytokine liberation: determination of the clinical relevance of biochemical markers. *J Trauma* 2001; 50(6): 989–1000.
11. *Schild A, Pscheidl E, Hintzenstern UV*. Phospholipase A₂—a parameter of sepsis? A comparison of PLA and Stevens' Sepsis Severity Score. *Klin Wochenschr* 1989; 67(3): 207–11.
12. *Grönroos JM, Kuttala K, Nevalainen TJ*. Group II phospholipase A₂ in serum in critically ill surgical patients. *Crit Care Med* 1994; 22(6): 956–9.
13. *Nevalainen TJ*. Serum phospholipases A₂ in inflammatory diseases. *Clin Chem* 1993; 39(12): 2453–9.
14. *Gebhard F, Pfetsch H, Steinbach G, Strecker W, Kinzl L, Brückner UB*. Is interleukin-6 an early marker of injury severity following major trauma in humans? *Arch Surg* 2000; 135(3): 291–5.
15. *Bochicchio GV, Napolitano LM, Joshi M, McCarter RJ, Scalea TM*. Systemic inflammatory response syndrome score at admission independently predicts infection in blunt trauma patients. *J Trauma* 2001; 50(5): 817–20.
16. *Payen D, Faivre V, Lukaszewicz AC, Losser MR*. Assessment of immunological status in the critically ill. *Minerva Anestesiol* 2000; 66(10): 757–63.
17. *Walsh DS, Tharichaiyarn P, Pattanapanyasat K, Siritongtaworn P, Kongcharoen P, Tongtawe P*. Characterization of circulating monocytes expressing HLA-DR or CD71 and related soluble factors for 2 weeks after severe, non-thermal injury. *J Surg Res* 2005; 129(2): 221–30.
18. *Pape HC, Remmers D, Grotz M, Tscherne H*. Reticuloendothelial system activity and organ failure in multiply injured patients. *Arch Surg* 1999;134(4): 421–7.
19. *Silvestre J, Povoia P, Coelho L, Almeida E, Moreira P, Fernandes A, et al*. Is C-reactive protein a good prognostic marker in septic patients? *Intensive Care Med* 2009; 35(5): 909–13.

Received on September 3, 2009.

Revised on January 5, 2010.

Accepted on February 10, 2010.



Povezanost kliničkih parametara i prisustva *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* i *Porphyromonas gingivalis* kod pacijenata sa progresivnim parodontalnim lezijama

Association between clinical parameters and the presence of *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* and *Porphyromonas gingivalis* in patients with progressive periodontal lesions

Mia Rakić*, Ksenija Zelić*, Dušan Pavlica†, Miloš Hadžimihajlović*, Jelena Milašin‡, Biljana Miličić§, Nebojša Nikolić||, Novak Stamatović¶, Smiljana Matic¶, Zoran Aleksić*, Saša Janković*

Univerzitet u Beogradu, Stomatološki fakultet, *Klinika za parodontologiju i oralnu medicinu, †Katedra za mikrobiologiju, ‡Katedra za humanu genetiku, §Katedra za informatiku, Beograd, Srbija; ||Univerzitet u Beogradu, Fakultet organizacionih nauka, Katedra za upravljanje sistemima, Beograd, Srbija; ¶Vojnomedicinska akademija, Klinika za maksilofacijalnu, oralnu hirurgiju i implantologiju, Beograd, Srbija

Apstrakt

Uvod/Cilj. Parodontopatija je hronično inflamatorno oboljenje parodontalnih tkiva koje za krajnji ishod ima gubitak potpornog koštanog tkiva zuba usled imunoloških reakcija izazvanih parodontopatogenim bakterijama. Cilj studije bio je korelisanje kliničkih parametara i prisustva dve najagresivnije parodontopatogene bakterije (*Aggregatibacter actinomycetemcomitans* – A.a. i *Porphyromonas gingivalis* – P.g.) kod bolesnika sa progresivnim parodontalnim lezijama. **Metode.** U studiju su bila uključena 34 sistemski zdrava ispitanika, starost 23–70 godina. Ispitanici su klinički i radiološki pregledani i uzorak je uziman iz reprezentativnog parodontalnog džepa sa najvećom dubinom sondiranja. Od kliničkih parametara mereni su gingivalni indeks, indeks krvarenja gingive, dubina parodontalnog džepa i indeks plaka. Prisustvo parodontopatogena dokazivano je multipleks metodom PCR (*Polymerase Chain Reaction*), a rezultati su korelisani sa klinič-

kim parametrima primenom odgovarajućih statističkih testova. **Rezultati.** Ista procentualna zastupljenost oba mikroorganizma dokazana je u uzorcima, naime i A.a. i P.g. bili su prisutni u po 35,39% uzoraka, a u 29,41% dokazana su oba mikroorganizma. Rezultati su korelisani po grupama formiranim u odnosu na prisustvo bakterija. Vrednosti merenih kliničkih parametara nisu se statistički značajno razlikovale u zavisnosti od prisustva parodontopatogena. Međusobne korelacije kliničkih parametara unutar grupe nisu pokazale statističku značajnost, osim korelacije gingivalnog i plak indeksa u grupi sa A.a. **Zaključak.** Klinički tok uznapredovale faze parodontopatije ne razlikuje se u odnosu na vrstu parodontalnih bakterija kao induktora imunološki posredovanih destruktivnih procesa.

Ključne reči:

periodontalne bolesti; periodontalni džep; periodontalni indeks; infekcija, bakterijska.

Abstract

Background/Aim. Periodontitis is a chronic inflammatory disease of periodontal tissues with consequential is bone loss as a result of host immunological reactions caused by periopathogens. The aim of the study was to investigate if there is a correlation between clinical parameters and the presence of two most aggressive periopathogens (*Aggregatibacter actinomycetemcomitans* – Aa and *Porphyromonas gingivalis* – Pg) in patients with progressive periodontal lesions. **Methods.** A total of 34 systemic healthy people, 23 to 70 years old, were included in the study. The patients were clinically

and radiologically examined, and after that, the representative pocket with greatest pocket depth was chosen and the sample was collected from that place. The measured clinic parameters were: gingival index, index of gingival bleeding, pocket depth and plaque indices. The multiplex Polymerase Chain Reaction (PCR) method was used for detection of periopathogens. After obtaining results, appropriate statistical tests were used to correlate the clinical and microbiological results. **Results.** Aa and Pg were detected in the same percentage of samples. Aa and Pg were detected in 35.29% samples alone, and in 29.41% both were detected. The values of measured clinical parameters did not show a

statistical significance between the groups. In analysis of correlations among clinical parameters inside the groups, a statistical significance was found only between gingival and plaque index in the group with Aa. **Conclusion.** Clinical course of periodontitis in the developed stage does not differ in relation to the presence of different periopathogens as

the major inductors of immunologically guided destructive processes.

Key words:
periodontal diseases; periodontal pocket; periodontal index; bacterial infections.

Uvod

Parodontopatija predstavlja multifaktorsko oboljenje uzrokovano parodontopatogenim mikroorganizmima, čiji su tok i ishod bolesti određeni genskim predispozicijama i imunološkim reakcijama domaćina¹⁻⁴. Savremenom definicijom mikrobiološko težište patogeneze pomeren je na etiološko mesto^{2,5}, a prethodni uspjesi terapije zasnovane na mikrobiološkoj teoriji, rezultat su smanjenja lokalne koncentracije mikroorganizama na račun povećanja imunološke efikasnosti.

Parodontopatogena mikroflora uključuje izvestan broj bakterija iz grupe gram negativnih anaeroba, među kojima se po svom agresivnom potencijalu izdvajaju *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* – A.a. i *Porphyromonas gingivalis* – P.g.^{1,5-9}. Agresivnost ovih mikroorganizama odnosi se, posebno, na njihovu sposobnost da direktnim i indirektnim mehanizmima indukuju specifičnu imunost i modifikuju imunološke mehanizme u destruktivnom smeru, što je, upravo, ključni element ovog oboljenja^{2,10}.

Bakterija A.a. je anaerobni gram negativni nepokretni kokobacil udružen, takođe, sa ekstraoralnim infekcijama, i svojstven agresivnim formama parodontopatije^{8,11,12}. Ovaj mikroorganizam, pored sposobnosti produkcije enzima koji vrše direktna lokalna oštećenja parodontalnog tkiva, raspolaže faktorima virulencije koji značajno ometaju, suprimiraju i usmeravaju u negativnom smeru imunološke faktore i mehanizme⁴. Među njima su leukotoksin, citoletalni toksin rastezanja, faktori imunosupresije koji inhibiraju blastogenezu, produkciju antitela i aktiviraju T-regulatorne ćelije, takođe, inhibitori funkcije polimorfonukleara i elementi koji ih čine otpornim na komplement.

Bakterija P.g. je gram negativni, anaerobni, nesporogeni bacil koji poseduje fimbrije i produkuje mrki pigment porfirin, a više je svojstven hroničnim parodontopatijama¹¹. Ovaj mikroorganizam produkuje metabolite i strukture male molekulske mase, što im omogućava da lako prodiru kroz tkivo. Među njima su enzimi i toksični metaboliti koji dovode do značajne lokalne destrukcije tkiva, ali i imunoaktivne komponente, koje značajno remete imunološke reakcije. Kao najagresivniji mehanizmi izdvajaju se produkcija imunoglobulinskih proteaza i gingipeina, indukcija produkcije interleukina (IL)-6 i matriksnih metaloproteinaza (MMP)¹³.

Obe bakterije imaju karakteristične patogene mehanizme, ali je krajnji efekat zajednički i zasnovan je na aktivaciji osteoklasta pod uticajem citokina i prostanoida¹⁵. Među njima su najznačajniji prostaglandin E₂ (PGE₂), faktor nekroze tumora α (TNF- α), interleukini, IL-1 β , IL-6, IL-17 i ligand receptora aktivatora nuklearnog faktora kapa b (RANKL), kao i na aktivaciji tkivnih matriksnih metaloproteinaza^{7,13-15}.

Polazna hipoteza ovog rada glasi da je kod ispitanika kod kojih su u parodontalnim džepovima istovremeno prisutni A.a. i P.g. izraženija destrukcija parodontalnog tkiva nego kod ispitanika sa pojedinačnim nalazom jedne od njih. Shodno tome, cilj rada bio je ispitivanje povezanosti parodontoloških kliničkih parametara u zavisnosti od prisustva A.a. i P.g. i njihove udruženo- sti kod ispitanika sa progresivnim parodontalnim lezijama.

Metode

Klinička studija sprovedena je na Klinici za parodontologiju i oralnu medicinu Stomatološkog fakulteta Univerziteta u Beogradu, u periodu od marta 2007. do maja 2008. godine. U studiju su bila uključena 34 ispitanika sa agresivnom i uznapređovalom hroničnom parodontopatijom: 13 žena (38%) i 21 muškarac (42%), starosti od 23 do 70 godina, prosečno 47 godina. Mikrobiološka analiza urađena je u laboratoriji za molekularnu genetiku Stomatološkog fakulteta.

Sistemski zdravi ispitanici birani su na osnovu kliničkog pregleda i radiološkog nalaza digitalnog ortopan tomografskog (OPT) snimka, pri čemu je preduslov bio da postoji minimalno četiri koštana defekta sa dubinom džepa (DDŽ) > 4 mm, da ispitanici nisu uzimali antibiotike u prethodna 3 meseca, antiinflamatorne lekove u prethodne dve nedelje od trenutka uzorkovanja i da kod njih nije sprovedena kauzalna terapija parodonticijuma poslednjih godinu dana.

Ispitanicima su mereni gingivalni indeks po Løe-Silness-u, indeks krvarenja gingive, dubina parodontog džepa i plak indeks po Silness-Løe-u. Gingivalni indeks, indeks krvarenja gingive i plak indeks mereni su prema ustaljenom metodu, a dubina parodontalnog džepa merena je na svim zubima osim na trećim molarima. Po određivanju indeksa i izvršenim pregledima, biran je reprezentativni parodontalni džep sa najvećim stepenom destrukcije i sa tog mesta je uzorkovan materijal. Na nivou ovih zuba merena je i beležena dubina parodontalnog džepa u cilju direktnog korelisanja sa prisustvom bakterija u ispitivanom džepu (slika 1).

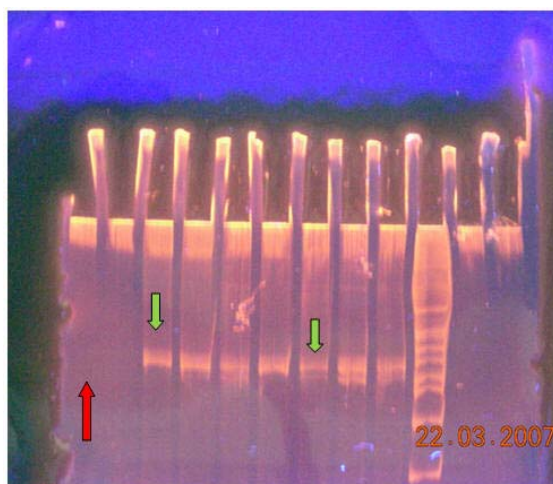
Klinička faza podrazumevala je sakupljanje sadržaja parodontalnog džepa papirnim poenom sa mesta najveće dubine sondiranja. Papirni poen plasiran je u ependorf epruvetu sa puferskim rastvorom i nakon toga zamrzavan na -18 °C do početka obrade.

Laboratorijska faza obuhvatala je analizu uzoraka primenom multiple PCR metode, što podrazumeva simultanu amplifikaciju DNK sekvenci obe bakterijske vrste, primenom prajmera visokospecifičnih za obe bakterije (A.a.: CACTTAA-AGGTCGCCTACGTGC, P.g.: CAATACTCGTATTTC) pojedinačnog, i univerzalnog 16s rDNK „forward“ prajmera E. Coli (AAGGAGGTGATCCAGCCGCA). Uzorci su pripremani pre PCR analize, a nakon toga su aplikovani u odgovarajuću količinu u reakcione smeše. Korišćena je reakciona smeša zapremine 25 μ L koju su činili PCR/Mg⁺⁺ puffer, dezoksiribonukleotidi, po 1,5 μ L svakog prajmera, 1U Taq DNK polimera-



Sl. 1 – Merenje parodontalnog džepa graduisanom sondom

ze i 3 μ L DNK supernatanta. Rađen je PCR na ThermoHybaid aparatu (Thermo, Waltham, MA.) koji je programiran prema predhodno utvrđenim parametrima. Posle amplifikacije usledila je elektroforeza na 8% poliakril-amidnom (PAA) gelu. Amplifikovani fragmenti su vizuelizovani na ultravioletnom transiluminatoru, nakon bojenja etidijum-bromidom (slika 2).



Sl. 2 – Amplifikovani fragmenti

(prvi bunar: odsustvo bakterijskih gena; treći bunar: prisustvo A.a. gena; sedmi bunar: prisustvo gena obe bakterije)

Ispitanici su svrstani u tri grupe na osnovu prisustva parodontopatogenih bakterija: sa prisutnim A.a, sa prisutnim P.g. i sa prisutna oba mikroorganizma.

U okviru svake grupe dat je zbirni pregled parametara deskriptivne statistike: AS – srednja vrednost; Med - medijana; SD - standardna devijacija; Min - minimalna vrednost; Max - maksimalna vrednost i IP – interval poverenja srednje vrednosti. Poređenje prisustva parodontopatogenih bakterija i kliničkih parametara vršeno je unutar formiranih grupa tako što je utvrđen stepen korelacije i njena p -vrednost između svakog kliničkog parametra po grupama. Neparametarski Mann-Withney-ev test korišćen je za poređenje međusobnih odstupanja srednjih vrednosti kliničkih parametara unutar grupa. Korelisanje kliničkih parametara svih grupa bilo je zasnovano na neparametarskom Kruskal-Wallis-ovom testu i jednofaktorskoj analizi varijanse zasnovanoj po pretpostavci na normalnoj raspodeli. Interval poverenja (CI = 95%) služio je kao osnova za sve statističke testove.

Rezultati

Prisustvo obe bakterije dokazano je u podjednakom procentu uzoraka: A.a. prisutan kod 35,29% i P.g. prisutan kod 35,29%, a kod 29,41% dokazano je prisustvo obe bakterije. Vrednosti gingivalnog indeksa, indeksa krvarenja gingive, dubine parodontalnog džepa i plak indeksa, kao i njihove korelacije među grupama, date su tabelarno (tabela 1). Ispitivanje značajnosti razlika u vrednostima indeksa krvarenja između sve tri grupe bakterija izvršeno je primenom Kruskal-Wallis-ovog testa, a dobijene razlike nisu bile statistički značajne ($p = 0,363$). Ovaj zaključak potkrepljen je uporednim testom jednofaktorske analize varijanse

Rezultati međusobnih korelacija kliničkih parametara i prisustva bakterija unutar svake grupe dati su u tabeli 2. Takođe, analizirana je korelacija između kliničkih parametara u okviru svake grupe i utvrđeno je da postoji statistički značajna korelacija ($\rho = 0,769$) jedino između gingivalnog i indeksa plaka kod ispitanika sa prisutnim A.a. ($p = 0,0035$).

Tabela 1

Vrednosti kliničkih parametara								
Grupe bakterija	AS	Med	SD	Min	Max	IP (95%)	Mann Whitney U -test	
Vrednosti gingivalnog indeksa								
A.a.	2,01	2,00	0,37	1,33	3,00	1,78-2,25	A.a.	P.g.
P.g.	1,86	2,00	0,39	1,33	2,75	1,61-2,10	$p = 0,319$	
P.g./A.a.	1,83	2,00	0,22	1,50	2,00	1,67-1,99	$p = 0,283$	$p = 0,923$
Vrednosti indeksa krvarenja gingive								
A.a.	2,50	3,00	0,73	1,16	3,00	2,03-2,96	A.a.	P.g.
P.g.	2,38	3,00	0,89	0,20	3,00	1,81-2,95	$p = 0,977$	
P.g./A.a.	2,56	2,92	0,69	1,50	3,50	2,07-3,06	$p = 0,872$	$p = 0,923$
Vrednosti dubine parodontalnog džepa								
A.a.	6,23	6,00	1,35	4,50	8,50	5,37-7,09	A.a.	P.g.
P.g.	5,33	5,00	1,67	3,50	10,00	4,27-6,39	$p = 0,142$	
P.g./A.a.	6,00	5,75	1,29	4,50	8,50	5,08-6,92	$p = 0,716$	$p = 0,294$
Vrednosti indeksa plaka								
A.a.	1,75	1,83	0,81	0,00	3,00	1,24-2,26	A.a.	P.g.
P.g.	1,59	1,73	0,80	0,00	2,66	1,08-2,10	$p = 0,582$	
P.g./A.a.	1,49	1,72	0,85	0,16	3,00	0,88-2,10	$p = 0,931$	$p = 0,643$

A.a. – *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*; P.g. – *Porphyromonas gingivalis*; AS – srednja vrednost; Med – medijana; SD – standardne devijacije; Min – minimalne vrednosti; Max – maksimalna vrednost; IP – interval poverenja

Tabela 2

Grupe bakterija		Korelacije kliničkih parametara			p (0,95%)		
		GI	IKG	DDŽ	GI	IKG	DDŽ
A.a.	GI	1,000					
	IKG	0,455	1,000		0,1376		
	DDŽ	0,207	-0,508	1,000	0,5191	0,0919	
	PI	0,769	0,533	0,068	0,0035	0,0741	0,8344
P.g.	GI	1,000					
	IK	-0,173	1,000		0,5918		
	DDŽ	0,088	0,380	1,000	0,7858	0,2231	
	PI	-0,232	0,252	0,101	0,4689	0,4303	0,7557
A.a./P.g.	GI	1,000					
	IKG	-0,215	1,000		0,5503		
	DDŽ	0,328	0,387	1,000	0,3555	0,2692	
	PI	0,151	0,194	0,027	0,6764	0,5915	0,9403

GI – gingivalni indeks; IKG – indeks krvarenja gingive; DDŽ – dubina parodontalnog džepa; PI – indeks plaka

A.a. – *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*; P.g. – *Porphyromonas gingivalis*; AS – srednja vrednost; Med – medijana; SD – standardne devijacije;

Diskusija

Motiv ovog istraživanja bio je da se utvrde povezanosti kliničkih parametara bolesti i prisustva parodontopatogenih bakterija kod ispitanika sa progresivnim parodontalnim lezijama, da bi se uz poznavanje savremenih mehanizama delovanja pomenutih bakterija razjasnila i utvrdila patološka događanja tokom bolesti, i da bi se na osnovu toga potencijalno koncipirala ili modifikovala terapija bolesti.

Ispitanici sa progresivnim parodontalnim lezijama obuhvatali su one sa agresivnom parodontopatijom, zbog multifaktorske prirode bolesti, jer oni predstavljaju reprezentativne predstavnike gubitka koštanog tkiva kao parametra imunološke aktivnosti, odnosno punog obima bolesti. Kod njih se očekivalo prisustvo A.a.^{4,8,12}. Ispitanici sa uznapredovalim oblicima hronične parodontopatije uključeni su zbog očekivanog prisustva P.g. i prisutne koštane destrukcije, odnosno mogućnosti varijacije na nivou mikroflore u smeru naknadnog pojavljivanja A.a.

Ispitivane parodontalne bakterije raspolažu veoma agresivnim imunostimulativnim mehanizmima. Od samog početka bakterije prevazilaze nespecifični i imunski odgovor zahvaljujući receptorima patogenih molekularnih obrazaca (PAMP)¹ koji su neprepoznatljivi eukariotskim fagocitima. Na taj način premošćuju opsonizaciju i fagocitozu i usmeravaju reakciju odbrane ka specifičnoj odbrani aktivacijom receptora sličnih *toll*-u, čiji je ishod aktivacija osteoklastne aktivnosti posredstvom transkripcionih signala za sintezu citokina i MMP-a^{14,15}.

A.a. proizvodi limfotoksin koji ubija i suprimira limfocite i monocite, dok citoletalni toksin rastezanja napada hromozom i pravi gracično oštećenje DNK molekula, što sve dovodi do prevremene apoptoze limfocita. Oni, takođe, proizvode faktore imunosupresije koji inhibiraju blastogenezu, produkciju antitela i aktiviraju T-regulatorne i, takođe, proizvode inhibitore funkcije polimorfonukleara i elemenata koji ih čine otpornim na komplement.

Sa druge strane P.g., pored produkcije imunoglobulinskih proteaza, indukuje oslobađanje IL-6, PGE2 i aktiviranje MMP.

Među ispitanicima sa progresivnim parodontalnim lezijama, obuhvaćenih ovom studijom, prisustvo P.g. i A.a.

dokazano je u istom procentu uzoraka (35,4%), dok je prisustvo obe bakterije dokazano u 29,41% uzoraka.

Bakterija A.a. je svojstvena agresivnim parodontopatijama i u našoj studiji je dokazana u preko polovini uzoraka (ukupno 64,81%) što je u pozitivnoj korelaciji sa tvrdnjama Međunarodne radionice o klasifikaciji parodontopatija i podacima iz literature¹⁶⁻¹⁸. Međutim, P.g. je dokazan u značajno visokom procentu, istom kao i A.a. Takeuchi i sar.⁸ utvrdili su prisustvo A.a. u niskom procentu uzoraka, dok je P.g. dominirao kod ispitanika sa agresivnom parodontopatijom. Dobijeni rezultati, takođe, potvrđuju da je P.g. udružen sa težim oblicima parodontalne destrukcije, što su potvrdili svojom drugom studijom Takeuchi i sar.¹⁰, kada je dokazano prisustvo P.g. u 84,2% uzoraka pacijenata sa agresivnom parodontopatijom.

Naši rezultati, koji nisu pokazali statistički značajnu razliku između dubine parodontalnog džepa i prisustva obe bakterije, pokazuju da u trenutku kada je aktivirana imunološka kaskada, prisustvo jedne ili obe bakterije, odnosno zbirnost njihovog efekta najverovatnije nema udela na destrukciju tkiva.

Pored ovih, direktnih imunoinduktivnih mehanizama, oba mikroorganizma destrukcijom tkiva enzimima kao što su: kolagenaze, arisulfataze, proteaze slične tripsinu, fibronektin degradirajući enzim, gingipeini, dovode do indukcije proinflamatornih citokina koji dodatno doprinose povećanju ukupne koncentracije citokina ka kritičnoj vrednosti koja aktivira osteoklastnu aktivnost^{1,15}.

Pomenuti bakterijski enzimi svojim dejstvom dovode i do lokalnih znakova zapaljenja, pa se njima objašnjavaju vrednosti indeksa krvarenja gingive i gingivalnog indeksa. Našom studijom nismo utvrdili statistički značajnu razliku među grupama u nivou pomenutih indeksa, što se razlikuje od rezultata Albandar-a i sar.¹⁶, koji su u svom radu utvrdili pozitivnu korelaciju vrednosti indeksa krvarenja gingive i prisustva P.g.

Korelisanje prisustva plaka i bakterija imalo je za cilj da utvrdi uticaj plaka, kao izvora i uslova patogenosti ispitivanih bakterija na destrukciju kosti. Kako nije utvrđena statistički značajna razlika između dubine parodontalnog džepa i indeksa plaka to, takođe, govori u prilog tome da uz prisustvo bakterija i njima indukovanu imunološku kaskadu, dodatni faktori, kao

što je količina plaka, nema značajnu ulogu, što je jedna od usvojenih karakteristika agresivnih parodontopatija^{1,18} i saglasna je sa istraživanjima Lópeza i sar.¹⁷ U grupi ispitanika sa prisutnim A.a. utvrđena je jedina pozitivna korelacija između gingivalnog indeksa i indeksa plaka, što ukazuje na agresivnost i inflamatorno induktivni potencijal ove bakterije.

Zaključak

Rezultati istraživanja navode na zaključak da parodontalna destrukcija nije u specifičnoj korelaciji sa prisu-

stvom jedne ili obe ispitivane bakterije. Kako indeks plaka, kao patološki uslov parodontopatogena, nije u korelaciji sa dubinom parodontalnog džepa, to dodatno govori da je bakterijska uloga u induktivnoj imunološkoj fazi različita od njihove uloge u agresivnoj destruktivnoj fazi bolesti. Zbog toga, rezultati ove studije mogu dati smernice za dalja ispitivanja imunoloških mehanizama destrukcije parodontalnih struktura, što bi uključivanjem većeg broja ispitanika, takođe, moglo rezultirati izvođenjem novih terapijskih modaliteta.

L I T E R A T U R A

1. Newman M, Takei H, Klokeevold P, Carranza F. Carranza's clinical periodontology. 10th ed. USA, St Louis: Saunders; 2006. p. 550.
2. Kornman KS. Mapping the pathogenesis of periodontitis: a new look. J Periodontol 2008; 79: 1560–8.
3. Cochran D. Inflammation and bone loss in periodontal disease. J Periodontol 2008; 79: 1569–76.
4. Pant VA, Mathur RM. Aggressive periodontitis: need to assess the prevalence and to plan the management strategies in indian scenario. India: Indmedica; 2006. Available from: <http://cyberlectures.indmedica.com/show/42/1/>
5. Choi BK, Moon SY, Cha JH, Kim KW, Yoo YJ. Prostaglandin E(2) is a main mediator in receptor activator of nuclear factor-kappaB ligand-dependent osteoclastogenesis induced by Porphyromonas gingivalis, Treponema denticola, and Treponema socranskii. J Periodontol 200; 76(5): 813–20.
6. Lindhe J, Karring T, Lang NP. Clinical periodontology, and implant dentistry. 5th ed. Oxford, Blackwell: Munksgaard; 2008. pp. 1297–317.
7. Ramseier CA, Kinney JS, Herr AE, Braun T, Sugai JV, Shelburne CA, et al. Identification of pathogen and host-response markers correlated with periodontal disease. J Periodontol 2009; 80(3): 436–46.
8. Takeuchi Y, Umeda M, Ishizuka M, Huang Y, Ishikawa I. Prevalence of periodontopathic bacteria in aggressive periodontitis patients in a Japanese population. J Periodontol 2003; 74(10): 1460–9.
9. van Winkelhoff AJ, Loos BG, van der Reijden WA, van der Velden U. Porphyromonas gingivalis, Bacteroides forsythus and other putative periodontal pathogens in subjects with and without periodontal destruction. J Clin Periodontol 2002; 29(11): 1023–8.
10. Takeuchi Y, Umeda M, Sakamoto M, Benno Y, Huang Y, Ishikawa I. Treponema socranskii, Treponema denticola, and Porphyromonas gingivalis are associated with severity of periodontal tissue destruction. J Periodontol 2001; 72(10): 1354–63.
11. Greenwood D, Slack R, Penhorer J. Medical microbiology. 16th ed. Edinburgh: Churchill Livingstone; 2002.
12. Doğan B, Kıpalev AS, Okte E, Sultan N, Asikainen SE. Consistent intrafamilial transmission of Actinobacillus actinomycetemcomitans despite clonal diversity. J Periodontol 2008; 79(2): 307–15.
13. Graves D. Cytokines that promote periodontal tissue destruction. J Periodontol 2008; 79(8 Suppl): 1585–91.
14. Duarte PM, de Mendonça AC, Máximo MB, Santos VR, Bastos MF, Nociti FH. Effect of anti-infective mechanical therapy on clinical parameters and cytokine levels in human peri-implant diseases. J Periodontol 2009; 80(2): 234–43.
15. Abbas A, Lichtman A. Basic immunology: functions and disorders of the immune system. 2nd ed. Philadelphia: Saunders; 2006.
16. Albandar JM, Olsen I, Gjermo P. Associations between six DNA probe-detected periodontal bacteria and alveolar bone loss and other clinical signs of periodontitis. Acta Odontol Scand 1990; 48(6): 415–23.
17. López R, Frydenberg M, Baelum V. Clinical features of early periodontitis. J Periodontol 2009; 80(5): 749–58.
18. Rogers AH. Molecular oral microbiology. Norfolk, UK: Caister Academic Press; 2008.

Primljen 14. IX 2009.
Revidiran 25. XII 2009.
Prihvaćen 12. IV 2010.



Epidemiological characteristics and clinical manifestations of acute non-A-E hepatitis

Epidemiološke karakteristike i kliničke manifestacije akutnog hepatitisa ni A-E

Dragan Delić, Nikola Mitrović, Aleksandra Radovanović Spurnić,
Neda Stojković Švirtlih, Jasmina Simonović Babić

Clinical Centre of Serbia, Institute of Infectious and Tropical Diseases,
Belgrade, Serbia

Abstract

Background/Aim. Acute non-A, non-B, non-C, non-D, non-E hepatitis (non-A-E AH) is an acute disease of the liver of unknown etiology for which one or more new, so far undetected, hepatotropic viruses may be responsible. The frequency of non-A-E AH ranges from 3.8% to 33.9%, and therefore it has a significant place within current infectology and hepatology. The aim of our study was to establish the frequency, clinical and biochemical characteristics, natural course and outcome of non-A-E AH and compare them with control groups affected by acute viral hepatitis A, B and C. **Methods.** This descriptive-analytic prospective study included 31 patients with non-A-E AH treated at the Institute of Infectious and Tropical Diseases, Clinical Center of Serbia, Belgrade, from 2003 to 2008. They were followed up during the period not less than 6 months. The controls involved randomly selected patients, treated at the same time with a definite diagnosis of acute viral hepatitis A, B and C. Statistical data analysis used Mann-Whitney *U*-test, Student's *t*-test and variance analysis. The value of $p < 0.05$ was considered statistically significant. **Results.** The frequency of non-A-E AH was 7.6%. Almost no dif-

ference was found between sexes (male/female ratio was 1 : 1.07); it was developed in all age groups, with the highest incidence in the middle age (mean age was 38.32 ± 15.3 years). It appeared equally throughout the whole year. Out of risk factors, inoculation risk was predominant (before all, dental interventions), mostly involving urban population living in comfortable conditions. The duration of incubation varied much ranging from 20 to 180 days (median 60 days). By clinical course, moderate and icteric forms were most common, mostly corresponding to acute hepatitis A and C. On the other hand, by duration of the disease (mean duration was 67.1 ± 27.1) and chronic transformation, non-A-E AH resembled to acute hepatitis B. Progression to chronicity was recorded in 9.68% of the patients. There was no fulminant neither cholestatic form of the disease. **Conclusion.** Based on the results obtained in this study, it is probable that there are some so far undetected primary hepatotropic viruses in our environment.

Key words:

hepatitis, viral, human; epidemiology; disease transmission, infectious; disease progression; risk factors; prognosis.

Apstrakt

Uvod/Cilj. Akutni hepatitis ni A, ni B, ni C, ni D, ni E (AH ni A-E) predstavlja akutno zapaljensko oboljenje jetre nepoznate etiologije za koje bi mogao biti odgovoran jedan ili više novih, do sada neotkrivenih, hepatotropnih virusa. Učestalost AH ni A-E kreće se od 3,8% do 33,9%, te, stoga, predstavlja značajno mesto u današnjoj infektologiji i hepatologiji. Cilj rada bio je da se utvrdi učestalost, kliničke i biohemijske karakteristike, prirodni tok i ishod AH ni A-E i da se uporedi sa kontrolnim grupama obolelih od akutnog virusnog hepatitisa A, B i C. **Metode.** Deskriptivnoanalitičkom studijom prospektivnog karaktera bio je obuhvaćen 31 bolesnik sa AH ni A-E koji su lečeni od

2003. do 2008. godine. Praćeni su u vemenskom periodu od najmanje šest meseci. Kontrolne grupe činili su bolesnici izabrani metodom slučajnog izbora, lečeni u istom vremenskom periodu sa postavljenom dijagnozom akutnog virusnog hepatitisa A, B i C. Za statističku obradu podataka korišćeni su Mann-Whitney *U*-test, Studentov *t*-test i analiza varijanse. Vrednost $p < 0,05$ smatrana je statistički značajnom. **Rezultati.** Učestalost AH ni A-E iznosila je 7,6%. Gotovo da nije bilo razlike u zastupljenosti ovog hepatitisa među polovima (odnos muško : žensko bio je 1 : 1,07); javljao se u svim uzrastima, sa najvećom učestalošću u srednjem životnom dobu (prosečna starost bila je $38,32 \pm 15,3$ godine). Podjednako se javljao tokom cele godine. Od faktora rizika bilo je dominantno prisus-

tvo inokulacionih rizika (pre svega stomatoloških intervencija), pri čemu je većinom obolevalo gradsko stanovništvo koje živi u konformnim životnim uslovima. Dužina inkubacije bila je veoma varijabilna i kretala se od 20 do 180 dana (medijana 60 dana). Po kliničkom toku, najčešće bile su blaže i ikterične forme bolesti koje najviše odgovaraju akutnom hepatitisu A i C. S druge strane, po dužini trajanja bolesti (prosečno trajanje bolesti iznosilo je $67,1 \pm 27,1$ dan) i prelasku u hronicitet, AH ni A-E odgovarao je akutnom hepatitisu B. Progresija u hronicitet zabeležena je

kod 9,68% obolelih. Nije bilo fulminantnog, ni holestaznog oblika bolesti. **Zaključak.** Na osnovu rezultata dobijenih u ovoj studiji, vrlo je verovatno postojanje još nekih, do sada neotkrivenih, primarno hepatotropnih virusa u našoj sredini.

Ključne reči:

hepatitis, virusni; epidemiologija; bolest, prenošenje; bolest, progresija; faktori rizika; prognoza.

Introduction

Acute non-A, non-B, non-C, non-D, non-E (hereinafter non-A-E AH) hepatitis is an acute inflammatory disease of the liver of unknown etiology with all clinical and biochemical characteristics of acute viral hepatitis, possibly caused by some new hepatotropic virus. As a term, non-A-E AH was first mentioned in 1995, when it was noted that, in spite of two newly discovered hepatotropic viruses, hepatitis C (HCV) and hepatitis E (HEV), there was still a significant number of patients affected by acute hepatitis of unknown origin¹. In addition, among patients with chronic hepatitis and liver cirrhosis, there have been cases with undetectable etiological factor of disease². For this reason, attempts have been made in view of focusing on identification of new etiological entities. In time, three new hepatotropic viruses were discovered: GB virus (GBV-C) – also named hepatitis G virus (HGV) in 1995, Torque Teno Virus (TTV) in 1997 and SEN virus (SENV) in 2000³⁻⁵. So far, data have indicated that none of these three newly detected viruses had had an important role, although there have been some indications that a small number of the affected patients may have been associated with acute, anicteric hepatitis to a large extent.

Non-A-E AH is an exclusive diagnosis, that is, a diagnosis of exclusion. It involves an acute inflammatory liver disease with unknown origin in spite of thorough examinations. Differential diagnosis should rule out acute infection primarily caused by hepatotropic viruses, namely *de novo* infection HAV, HBC, HCV and HEV, autoimmune liver disease (autoimmune hepatitis, primary biliary cirrhosis), metabolic liver diseases (Wilson's disease, hemochromatosis, alpha-1-antitripsin deficit), as well as toxic liver impairment (alcoholic drinks, drugs, different toxins). Practically, it is necessary to exclude any known etiological factor inducing the picture of the acute hepatitis, in order to make diagnosis of non-A-E AH. There is still very few prospective studies dealing with these problems, requiring lots of time and resources, and such issue holds a significant place in present infectology and hepatology.

The objective of our study was to establish epidemiological and clinical-biochemical characteristics, duration, natural course and outcome of non-A-E AH, and to compare basic characteristics of these patients with the controls affected by acute viral hepatitis A, B and C.

Methods

This descriptive–analytic prospective study included the patients treated in the Institute of Infectious and Tropical Diseases, Clinical Center of Serbia, Belgrade, in the period from 2003 to 2008. The study involved a total of 408 patients with acute hepatitis, out of whom 31 patients (7.6%) had been diagnosed with non-A-E AH. Diagnosis of non-A-E AH was based on no history of chronic liver disease, presence of typical symptoms and signs, alanin aminotransferase level (ALT) at least 8 times higher than the upper limit (*ie.* 41 UI/L) as well as ruling out of known factors of hepatocellular impairment. Actually, these patients had negative markers for viral hepatitis A, B, C, and E (serology included patient's serum tests by ELISA for the presence of IgM and IgG antibodies against above mentioned hepatotropic viruses, followed by PRC technique which verified the absence of HCV RNA and HBV DNA in patient's blood). In addition, the infection by other potential hepatotropic viruses (CMV, EBV, HSV) was ruled out. Hepatitis caused by spirits, medicaments and other potential hepatotoxins was ruled out by obtaining a detailed medical history through interviewing the patients, as well as clinical and biochemical evaluation of patients. Autoimmune hepatitis was excluded by the absence of autoantibodies against nuclear (ANA), smooth muscle (ASMA) and microsomal (anti-LKM1) antigens, while primary biliary cirrhosis was ruled out by verifying the absence of the antimitochondrial autoantibodies (AMA). Metabolic liver diseases were ruled out upon determination of serum ceruloplasmin and copper levels, then 24/hour urine copper level – Wilson's disease, normal serum iron level and a total iron-binding capacity (TIBC) – hemochromatosis, as well as normal serum alpha-1-antitripsin level - alpha-1-antitripsin deficit.

The study included epidemiological analysis and clinical-biochemical monitoring of patients with non-A-E AH, and comparison with the controls affected by acute viral hepatitis A, B and C.

The group non-A-E AH consisted of 31 patients. Out of this number, 24 patients (77.42%) were followed-up during at least 6-month period for determination of possible chronic development, while 7 cases were lost to follow-up after completed hospital treatment or were followed less than 6-month period.

The controls comprised of three groups of patients, also treated in the Institute of Infectious and Tropical Diseases in

Belgrade within the same period of time, which were randomly selected. The group I consisted of 35 patients with hepatitis A. The group II included patients with acute hepatitis B, and the group III involved 19 controls affected by acute hepatitis C. Table 1 shows the basic characteristics of the study patients. All the patients were exclusively treated by symptomatic therapy, so it may be considered they had natural and spontaneous course of the disease.

and disposition of waste material). More than a half, *ie.* 17 cases (55.9%), had secondary school qualifications, 4 (14.8%) had elementary school education, 7 had college/university degree (22.2%) and 3 patients (11.1%) were retired.

Empirically, the disease most frequently appeared in winter – 14 patients (45.2%), in spring and autumn got ill 6 patients (19.4%), respectively and in summer 5 patients

Table 1

Characteristics of the patients involved in the study

Acute viral hepatitis (AVH)	Total number of patients	Male		Female		Average age of the patients (years) ($\bar{x} \pm SD$)	Range of age (years)
		n	%	n	%		
non-A-E AH	31	15	48.4	16	51.6	38.32 \pm 15.30	17–76
AVH A	35	20	57.1	15	42.9	30.03 \pm 10.68	10–51
AVH B	31	15	48.4	16	51.6	36.42 \pm 14.55	17–73
AVH C	19	15	78.9	4	21.1	26.68 \pm 5.72	20–45

Clinical and epidemiological examinations assumed an identification of the incubation period – time period from the contact with an affected person or the existing inoculation risk factors (intravenous or nasal drug abuse, medical and dental interventions, risky sexual intercourse, tattoo and piercing) – to the onset of the initial symptoms and/or signs of the disease, then duration of the disease in days (from the first symptoms and/or signs of the disease to restoration of clinical-biochemical findings to normal), symptomatology and clinical forms of the disease. The patients were followed in time period not less than 6 months with a view to ascertain probable chronic development of the condition. Biochemical analyses included measurement of transaminases – aspartat aminotransferase (AST) and ALT levels, serum bilirubin level (total and direct), alkaline phosphatase, gamma-glutamyl transferase and prothrombin time. The controls underwent the same examinations.

Statistical data analysis used the Mann-Whitney *U*-test, Student's *t*-test and variance analysis with post hoc LSD (Least Significant Difference) test. The initial statistical significance was set at $p < 0.05$. Data processing was done by SPSS package for Windows version 11.0.

Results

During a 6-year period, a total of 408 patients with acute hepatitis was examined and treated; the frequency of non-A-E AH was 7.6% (31 patients). The remaining 377 patients (92.4%) had acute hepatitis of known etiology: 146 (35.7%) had hepatitis A, 150 (36.8%) had acute hepatitis B, 57 (14.0%) acute hepatitis C, while only 1 (0.25%) had hepatitis E. Ten patients (2.5%) were diagnosed with toxic hepatitis and 13 (3.2%) with autoimmune hepatitis.

In the non-A-E AH group, sex ratio was 1 : 1.07 in favor of females, and the patients were mostly middle-aged people. Twenty-four patients (77.4%) lived in urban environment, 3 (9.7%) in suburban and 4 (12.9%) in the country. The majority of patients, 25 (81.4%) had comfortable living conditions (meaning primarily the source of drinking water

(16.1%). In spite of that fact, there was no statistical significance ($p = 0.078$), indicating that non-A-E AH occurred in all seasons, that is, throughout the year.

Regarding risk factors and possible transmission pathways, 15 patients (48.4%) had some of the risk factors of viral hepatitis of known etiology 6 months before the onset of the first symptoms and signs of disease. Figure 1 illustrates the percentage incidence of risk factors. The majority of patients, even 11 (35.5%), had some of the inoculation risk factors, while only one (3.3%) used to travel to the region characterized by endemic viral hepatitis with fecal-oral transmission. The remaining 16 (51.6%) did not mention in their medical history any of possible risk factors.

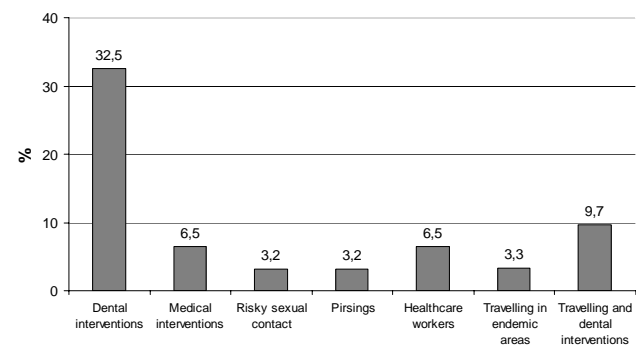


Fig. 1 – Frequency of possible risk factors (%) among patients suffering from acute non A-E hepatitis

The incubation period for the subjects with known risk factors was rather varying and ranged from 20 to 180 days, with median of 60 days. Out of 31 patients, only 1 (3.2%) had asymptomatic form, and his acute hepatitis was detected accidentally by biochemical analyses. Other 30 cases (96.8%) had a manifest form of the disease. Sudden onset of the disease was reported in 29 patients (93.5%) and gradual was manifested in only 1 case (3.2%). The mean time from the onset of the initial symptoms and/or signs to

hospitalization was 13.5 ± 10.6 days (median 10 days), varying from 5-45 days. Icterus was present in 24 patients (77.1%), and others were anicteric. An average duration of the icteric phase (in those having the icterus) was 20.3 ± 15.7 (median 14.5 days), and ranged from 6 to 64 days. Among other symptoms and signs, fatigue and malaise as well as nausea and feel sickened were the most frequent, while other symptoms and signs pathognomonic for acute hepatitis were slightly less frequent. Synovitis and rash as immunologically-mediated manifestations of acute hepatitis B were present in 6 (19.4%) and 5 (16.1%) patients, respectively (Table 2).

Table 2
Symptoms and signs of acute non-A-E hepatitis

Symptoms and signs	Patients	
	n	%
Fatigue and malaise	21	67.8
Nausea and queasiness	21	67.8
Vomiting	16	51.6
Abdominal pain	12	38.7
Anorexia	12	38.7
High fever	10	32.3
Arthralgias	6	19.4
Rash	5	16.1
Diarrhoea	5	16.1

There were no cholestatic or fulminant forms of diseases in our study.

Out of 24 patients followed-up for sufficient period of time, 21 (87.5%) had self-limited disease which resulted in complete recovery. Chronic hepatitis was developed in

three patients (12.5%), what was histopathologically verified by liver bioptic specimen analysis. Mean duration of the disease in cured cases was 67.1 ± 27.1 days, ranging from 29 to 129 days.

Comparison of the non-A-E AH group to the group with acute viral hepatitis of known etiology showed that distribution by sex was similar in the controls, except for the group of acute hepatitis C. Regarding the latter group, a significant difference was found ($p < 0.05$), meaning that males were more frequently affected by the disease.

In relation to age, the majority of cases with non-A-E AH belonged to the middle age group, as well as to the group of acute hepatitis B. On the other hand, acute hepatitis A and C were more frequently reported in younger age and it was statistically significant ($p < 0.05$) (Table 3).

Comparison of biochemical characteristics of the non-A-E AH group and the controls revealed that the patients with acute viral hepatitis B had more manifested icterus (higher bilirubin values) and more impaired hepatic synthesis function. The groups with acute hepatitis A and B presented higher degree of hepatocellular necrosis, manifested by higher serum transaminase levels. According to other biochemical parameters, the non-A-E AH group did not significantly differ from the controls (Table 4).

The mean duration of disease, from the onset of the first symptoms and signs to the normalization of clinical-biochemical findings was significantly longer in the non-A-E AH group in relation to the controls with acute viral hepatitis A and C. Statistically, the duration of the disease was similar between the non-A-E AH and the acute hepatitis B group (Table 5).

Table 3

Age of the patients in the group with acute non-A-E hepatitis and the control groups

Acute viral hepatitis (AVH)	Patients' age (years) $\bar{x} \pm SD$	<i>p</i>
Non-A-E AH	38.3 ± 15.3	–
AVH A	30.0 ± 10.7	0.009
AVH B	36.4 ± 14.5	0.554
AVH C	26.5 ± 5.7	0.002

Table 4

Biochemical characteristics of patients with non-A-E AH and AVH A, B and C

Biochemical parameters	Non-A-E AH $\bar{x} \pm SD$	AVH A $\bar{x} \pm SD$	AVH B $\bar{x} \pm SD$	AVH C $\bar{x} \pm SD$
AST (U/L)	740.9 ± 477.8	$1146.4 \pm 848.4^*$	$1006.1 \pm 570.1^*$	728.9 ± 352.2
ALT (U/L)	1348.3 ± 919.3	2273.9 ± 1143.5	1855.1 ± 1054.9	1521.1 ± 864.1
γ -GT (U/L)	212.9 ± 249.7	324.6 ± 291.3	225.1 ± 223.9	162 ± 101.1
AP (U/L)	245.3 ± 292.5	247.9 ± 98.9	240.6 ± 147.6	172 ± 55.5
Total serum bilirubin ($\mu\text{mol/L}$)	117.9 ± 123.5	121.6 ± 52.2	231.8 ± 120.4	130.9 ± 126.8
Direct serum bilirubin ($\mu\text{mol/L}$)	73.9 ± 93.5	$79.9 \pm 39.8^*$	$153.6 \pm 83.1^*$	71.4 ± 73.0
PT (%)	73.4 ± 16.4	70.9 ± 15.9	$60.7 \pm 15.4^*$	75.2 ± 15

* $p < 0.05$; AVH – acute viral hepatitis; AST – aspartate aminotransferase; ALT – alanine aminotransferase; γ -GT – gamma glutamyltransferase; AP – alkaline phosphatase; PT – prothrombin time

Table 5

Average duration of the acute viral hepatitis		
Acute viral hepatitis (AVH)	Disease duration (days) $\bar{x} \pm SD$	<i>p</i>
Non-A-E AH	67.1 ± 27.1	–
AVH A	52.8 ± 9.0	0.003
AVH B	64.5 ± 16.4	0.10
AVH C	56.3 ± 19.0	0.000

Discussion

The incidence of non-A-E AH in the patients involved in our study accounted for 7.6%. The incidence in studies of other medical centers worldwide ranged from 3.8% in recently completed study in Greece to even 33.9%, as reported in the study from Italy^{6,7}.

In different studies, age of non-A-E AH patients varied to a large extent ranging from 8 up to 83 years^{8,9}, while in our study most commonly diseased patients were younger people, *ie.* the oldest was 51. Similarly, sex ratio was rather disproportional, ranging from 3.8 : 1 in favor of males to 2 : 1 in favor of females^{10,11}. In our study, this ratio was pretty even. These data indicate that there is no specific predomination in contracting this disease either by sex or age.

Clinically, non-A-E AH severity varies between studies. However, we have to emphasize that different researchers use different criteria in defining this condition. The most frequent indicators have been prothrombin time, serum albumin value, bilirubinemia level, the presence of encephalopathy, duration of disease, or any of their specific combination. Generally, the reference data suggest that non-A-E AH is by severity similar to acute hepatitis C and moderate clinical forms are more common⁹⁻¹¹. In our study, non-A-E AH was similar by severity both to acute hepatitis C and A, while on the other hand, the patients with acute hepatitis B mostly had more severe clinical image (given the higher degree of hepatocellular necrosis, more manifested icterus and prolonged prothrombin time). Nevertheless, in relation to the duration of the disease and hospitalization, non-A-E AH corresponded to acute hepatitis B, while in acute hepatitis A and C, the disease duration was significantly shorter. No patient of our study with non-A-E AH developed fulminant or cholestatic form of disease. Contrary to these findings, in the majority of medical centers worldwide, the fulminant hepatitis has occurred in a certain percentage, accounting mostly for 5%^{6,10,12}. Non-A-E AH is usually self-limited disease and most commonly results in a complete recovery. In spite of that fact, chronic transformation has been recorded in varying percentage, from 6.5%¹⁰ to 27.3%⁶, depending on the type of research. In our patients, chronic transformation was recorded in 12.5% that was close to the known fact of chronic transformation from acute hepatitis B and significantly lesser from acute hepatitis C^{13,14}.

Regarding risk factors and possible transmission pathways, the majority of current studies either have not detected possible transmission pathways of non-A-E AH causes or

they have been recorded in a very small percentage. Thus, Chu, et al.¹⁰ reported the information on travelling to endemic region of hepatitis with fecal-oral transmission accounting for only 1.4% of the time, without any fact on parenteral risk, while Rochling et al.¹⁵ detected a parenteral risk factor in 6% of the patients, in association with recent blood transfusions. Some other researchers, such as Tassopoulos et al.⁶, Paraná et al.¹² and He et al.¹⁶ failed to identify any of viral hepatitis transmission pathways of known origin. It would be one of the major reasons for not having found any relevant data on the duration of incubation so far. In distinction from these results, we recorded possible transmission pathway of non-A-E AH in as high as 48.4% of patients. They all were exposed to some of the parenteral risk factors, and almost a half of them had recently undergone a type of dental intervention. The risk of fecal-oral infection was recorded in considerably lower percentage. Considering the significant number of cases with some of the risk factors of the infection, the incubation period was determined in our study and it lasted for 60 days (value of median). In comparison with incubation in the controls, it was established to be similar to that in acute hepatitis B and C groups, and longer in hepatitis A group.

One of the possible causative agents of non-A-E AH may be HBV in the form of occult HBV infection, *ie.* persistent HBV infection in the absence of the serologic markers. This kind of paradox may be accounted for mutations in HBV genome leading to HBV modifications, which cannot be detected by standard serologic analyses. Nevertheless, HBV genome may be, in these cases, identified by more sensitive PCR methods such as fluorescence quantitative PCR (FQ-PCR) and nested PCR (nPCR). Therefore, having researched possible non-A-E AH causes, He et al.¹⁶ found that it was actually acute viral hepatitis B responsible in 41.4% of patients.

The cause may also be an occult HCV infection. Specifically, in the period prior to seroconversion, which may even be absent¹⁷, HCV RNA level is very varying and there is a possibility that it can not be detected by standard diagnostic procedures. These patients, initially diagnosed with non-A-E AH, virtually have an acute HCV infection, which may be established only when stable relation between virus and host is constituted¹⁸.

As far as the newly detected hepatotropic viruses are concerned, HGV/GBV-C, TTV and SENV, their role in development of liver impairment has not been clarified yet. But, HGV/GBV-C is mainly seen in younger people and usually has the form of mild, subclinical or anicteric form of the disease¹⁹. Fulminant forms are very rare. Principal pathway of transmission is *via* blood transfusion, but it usually does not cause hepatitis²⁰. This is supported by the results of the research in the USA showing that even 18%-20% of all blood units prepared for transfusion contain HGV/GBV-C²¹. The virus is ubiquitous and its incidence in non-A-E AH patients ranges from 3% according to research in Italy⁸ and 16% as reported by Brazilian studies¹². In 2000, Delić et al.²² also established the presence of HGV/GBV-C in Serbia, with the incidence rate of 32.9%.

A novel DNA virus TTV, which is currently classified in the family *Circoviridae* and genus *Anellovirus*, was initially detected in patients from Japan who had the acute posttransfusion hepatitis of unknown etiology²³. Since its discovery in 1997, TTV was associated with different diseases including acute and chronic liver disease, kidney and pulmonary diseases, hematological conditions, various tumors, but until these days its actual role as etiological factor has not been elucidated. It is primarily transmitted parenterally, but it has been also detected in feces, thus, fecal-oral transmission cannot be ruled out²⁴. It can be identified in patients with non-A-E AH in high percent, from 21.4% up to even 52.6%⁶ of cases, but whether it is the true causative agent of acute hepatitis remains unclear. Explicitly, in all studies dealing with this issue, there has been almost no difference between these patients and those without TTV infection, or no relation of viremia and hepatocellular damage extent^{25,26}. Moreover, TTV may be identified in a high percentage in healthy blood donors worldwide, so a study from Brazil revealed it in even 62% of such cases²⁷.

Similar situation to TTV is with lately detected hepatotropic virus SENV. It is very variable virus, similar to TTV, and it is assumed they both originated from the common progenitor. So far, eight SENV genotypes have been identified, from which important genotypes for human infectology

and hepatology are genotypes D and H. Its role in the development of chronic liver diseases has not been clearly defined while its participation in acute posttransfusion hepatitis is more expectable²⁸. In patients with serum non-A-E AH, SENV was detected by the PCR technique in high percentage – from 27% as reported by study from Slovakia²⁹ to 53.3% in China³⁰. However, since these patients do not differ considerably from others affected by non-A-E AH without SENV, as well as that SENV may be detected among healthy blood donors in over 20% of the time³¹, its true role is still vague.

Among other non-A-E AH causes, one cannot exclude the possibility of toxic liver damage by other substances which are not primarily identified as hepatotoxic. For example, these will include any parts of different plants which may be used as preparations in herbal medicine³².

Conclusion

There is a highly certified assumption that some other, so far undetected, primary hepatotropic viruses may cause both acute and chronic liver conditions. Such conclusion is corroborated by our study results as well as by findings of studies conducted worldwide. Accordingly, the future research should be focused on their detection and defining their role and significance.

R E F E R E N C E S

1. *Alter HJ, Bradley DW.* Non-A, non-B hepatitis unrelated to the hepatitis C virus (non-ABC). *Semin Liver Dis* 1995; 15(1): 110–20.
2. *Caldwell S, Oelsner D, Iezzoni J, Hespenheide E, Battle E, Driscoll C.* Cryptogenic cirrhosis: Clinical characterization and risk factors for underlying disease. *Hepatology* 1999; 29(3): 664–9.
3. *Linnen J, Wages J Jr, Zhang-Keck ZY, Fry KE, Krawczynski KZ, Alter H, et al.* Molecular cloning and disease association of hepatitis G virus: a transfusion-transmissible agent. *Science* 1996; 271(5248): 505–8.
4. *Nishizawa T, Okamoto H, Konishi K, Yoshizawa H, Miyakawa Y, Mayumi M.* A novel DNA virus (TTV) associated with elevated transaminase levels in posttransfusion hepatitis of unknown etiology. *Biochem Biophys Res Commun* 1997; 241(1): 92–7.
5. *Primi D, Fiordalisi G, Mantero GL, Mattioli S, Sottini A, Bonelli F, et al.* Identification of SENV genotypes. Pb. No.: WO/2000/028039 (published under the World Intellectual Property Organisation). Available from: <http://www.wipo.int/pctdb/en/wo.jsp?wo=2000028039>
6. *Tassopoulos N, Papatheodoridis G, Delladetsima I, Hatzakis A.* Clinicopathological features and natural history of acute sporadic non-(A-E) hepatitis. *J Gastroenterol Hepatol* 2008; 23: 1208–15.
7. *Cacopardo B, Nunnari G, Berger A, Doer HW, Russo R.* Acute non A-E hepatitis in eastern Sicily: the natural history and the role of hepatitis G virus. *Eur Rev Med Pharmacol Sci* 2000; 4(5–6): 117–21.
8. *Romano L, Fabris P, Tanzi E, Tositti G, Mazzotta F, Zanetti AR.* GBV-C/hepatitis G virus in acute non-A-E hepatitis and in acute hepatitis of defined aetiology in Italy. *J Med Virol* 2000; 61(1): 59–64.
9. *Fabris P, Biasin MR, Infantolino D, Tositti G, Venza E, Floreani A, et al.* TTV infection in patients with acute hepatitis of defined aetiology and in acute non-A-E hepatitis. *J Hepatol* 2000; 32(4): 661–5.
10. *Chu CM, Lin DY, Yeh CT, Sheen IS, Liaw YF.* Epidemiological characteristics, risk factors, and clinical manifestations of acute non-A-E hepatitis. *J Med Virol* 2001; 65(2): 296–300.
11. *Navasques CA, Rodriguez M, Sotorrio NG, Leiva P, Martinez A, Perez R, et al.* Epidemiological, clinical and biological characteristics of acute non-A, non-B hepatitis with and without hepatitis C virus infection. *Infection* 1994; 22(4): 252–7.
12. *Paraná R, Vitvitski L, Andrade Z, Trepo C, Cotrim H, Bertillon P, et al.* Acute sporadic non-A, non-B hepatitis in Northeastern Brazil: etiology and natural history. *Hepatology* 1999; 30(1): 289–93.
13. *McMahon BJ.* Epidemiology and natural history of hepatitis B. *Semin Liver Dis* 2005; 25(Suppl 1): 3–8.
14. *Seeff LB.* Natural history of hepatitis C. *Hepatology* 1997; 26(Suppl 1): 21–8.
15. *Rochling F, Jones W, Chau K, Ducharme L, Mimms L, Moore B, et al.* Acute sporadic non-A, non-B, non-C, non-D, non-E hepatitis. *Hepatology* 1997; 25(2): 478–83.
16. *He Z, Zhuang H, Wang X, Song S, Dong Q, Yan J, et al.* Retrospective analysis of non-A–E hepatitis: possible role of hepatitis B and C virus infection. *J Med Virol* 2003; 69: 59–65.
17. *Morand P, Dutertre N, Minazzi H, Burnichon J, Pernollet M, Baud M, et al.* Lack of seroconversion in a health care worker after polymerase chain reaction–documented acute hepatitis C resulting from a needlestick injury. *Clin Infect Dis* 2001; 33: 727–9.
18. *Heller T, Rebermann B.* Acute hepatitis C: a multifaceted disease. *Semin Liver Dis* 2005; 25(1): 7–17.
19. *Reshetnyak IV, Karlovich TI, Ilchenko UL.* Hepatitis G virus. *World J Gastroenterol* 2008; 14(30): 4725–34.

20. *Alter HJ, Nakatsuji Y, Melpolder J, Wages J, Wesley R, Shih JW*, et al. The incidence of transfusion-associated hepatitis G virus infection and its relation to liver disease. *N Engl J Med* 1997; 336(11): 747–54.
21. *Jarvis LM, Davidson F, Hanley JP, Yao PL, Ludlam CA, Simmonds P*. Infection with hepatitis G virus among recipients of plasma products. *Lancet* 1996; 348: 1352–5.
22. *Delić D, Žerjav S, Nešić Z, Pešić I, Jemuović Ij, Nikolić P*. Sero-prevalence of hepatitis G viral infection in Yugoslavia: pilot study. *Acta Infectologica Yugoslavica* 2000; 5(2): 107–11.
23. *Nishizawa TH, Okamoto K, Konishi H, Yoshizawa Y, Miyakawa Y, Mayumi M*. A novel DNA virus (TTV) associated with elevated transaminase levels in posttransfusion hepatitis of unknown etiology. *Biochem Biophys Res Commun* 1997; 241(1): 92–7.
24. *Okamoto H, Akahane Y, Ukita M, Fukuda M, Tsuda F, Miyakawa Y*, et al. Fecal excretion of a nonenveloped DNA virus (TTV) associated with posttransfusion non-A-G hepatitis. *J Med Virol* 1998; 56: 128–32.
25. *Hu ZJ, Lang ZW, Zhou YS, Yan HP, Huang DZ, Chen WR*, et al. Clinicopathological study on TTV infection in hepatitis of unknown etiology. *World J Gastroenterol* 2002; 8(2):288–93.
26. *Irshad M, Sharma Y, Dhar I*. Transfusion transmitted virus: a review on its molecular characteristics and role in medicine. *World J Gastroenterol* 2006; 12(32): 5122–34.
27. *Niel C, De Oliveira JM, Ross RS, Gomes SA, Roggendorf M, Viazov S*. High prevalence of TTV virus infection in Brazilian blood donors. *J Med Virol* 1999; 57: 259–63.
28. *Umemura T, Tanaka E, Ostapowicz G, Brown KE, Heringlake S, Tassopoulos N*, et al. Investigation of SEN virus infection in patients with cryptogenic acute liver failure, hepatitis-associated aplastic anemia, or acute and chronic non-A-E hepatitis. *J Infect Dis* 2003; 188:1545–52.
29. *Schréter I, Kristian P, Jarcuska P, Porubcin S, Siegfried L, Birosová E*, et al. Detection of SEN virus in the general population and different risk groups in Slovakia. *Folia Microbiol* 2006; 51(3): 223–8.
30. *Tang ZH, Chen XH, Yu YS, Zang GQ*. Prevalence and clinical significance of SEN virus infection in patients with non A-E hepatitis and volunteer blood donors in Shanghai. *World J Gastroenterol* 2008; 14(26): 4204–8.
31. *Shibata M, Wang RYH, Yoshida M, Shih JWK, Altet HJ, Mitamura K*. The presence of a newly identified agent (SEN virus) in patients with liver disease and in blood donors in Japan. *J Infect Dis* 2001; 184: 400–4.
32. *Park G, Mann S, Ngu M*. Acute hepatitis induced by Shou-Wu-Pian, a herbal product derived from *Polygonum multiflorum*. *J Gastroenterol Hepatol* 2000; 16(1): 115–7.

Received on September 14, 2009.

Accepted on February 2, 2010.



Primena linearnog radiofrekventnog noža u resekciji jetre

Use of linear radiofrequency device in liver resection

Miroslav Stojanović, Milan Radojković, Goran Stanojević

Klinički centar Niš, Klinika za opštu hirurgiju,
Niš, Srbija

Apstrakt

Uvod/Cilj. Linearni radiofrekventni nož (LRFN) je uređaj za jednokratnu upotrebu koji služi za transekciju jetrinog parenhima primenom kontrolisane radiofrekventne struje, čime se postiže zatvaranje, odnosno „varenje“ krvnih sudova i žučnih vodova što resekciju jetre čini sigurnijom u odnosu na klasične tehnike. Cilj rada bio je da se odredi realna vrednost LRFN u odnosu na standardnu tehniku keliklazije. **Metode.** Ispitivanje je sprovedeno kao prospektivna analiza perioperativnih parametara kod 200 bolesnika kojima je urađena resekcija jetre u Klinici za opštu hirurgiju Kliničkog centra u Nišu u periodu od 1. januara 2001. do 1. januara 2009. godine. Bolesnici su bili podeljeni u dve grupe: Keli grupa sa 144 bolesnika kojima je resekcija jetre urađena tehnikom keliklazije i RF grupa sa 56 bolesnika kojima je je transekcija jetrinog parenhima urađena pomoću LRFN – *Tissue Link – Dissection Sealer* (DS – 3,0). Analizirani su dužina trajanja ishemije jetre, brzina transekcije parenhima, intraoperativni gubitak krvi, procenat značajnih intraoperativnih i postoperativnih komplikacija, dužina hospitalizacije i mortalitet. **Rezultati.** Kod 28% bolesnika sa resekcijom jetre, transekcija je urađena pomoću LNRF. Prosečno vreme ishemije jetre u RF grupi iznosilo je 7 min, a u Keli grupi 22 min. Brzina transekcije parenhima bila je dvostruko manja u RF grupi nego u Keli grupi (2,05 cm²/min prema 4,34 cm²/min). Ukupni gubitak krvi bio je značajno manji u RF grupi, nego u Keli grupi (390 mL prema 420 mL). Nakon primene LRFN registrovane su dve bilijarne fistule i četiri pleuralne efuzije. **Zaključak.** Linearni radiofrekventni nož relativno je jednostavan uređaj koji omogućava bezbednu transekciju parenhima uz smanjenu potrebu za ishemijom jetre i uz značajno smanjenje gubitaka krvi. Negativne strane uređaja su njegova visoka cena za jednokratnu upotrebu i sporija transekcija parenhima.

Ključne reči:

hirurgija, operativne procedure; hepatektomija; lečenje, ishod; intraoperativne komplikacije; postoperativne komplikacije; hirurški instrumenti.

Abstract

Background/Aim. Linear radiofrequency device (LRFN) is disposable tool designed for liver parenchyma transection using controlled radiofrequency to “seal” blood vessels and bile ducts, making liver resection easier and safer compared to classical resectional techniques. The aim of this study was to determine real value of the LRFN compared to the standard “*keliclasia*” technique. **Methods.** This prospective study analyzed the significant intraoperative parameters and postoperative results of the 200 patients who underwent surgery at the Surgery Clinic of Clinical Centre in Niš, between January 1, 2001, and January 1, 2009. The patients were divided into two groups: the control Keli group (144 patients) with the “*keliclasia*” resection technique and the control RF group (with resection performed using LRFN – *Tissue Link / Dissection Sealer* (DS – 3.0) (56 patients). The following parameters were analyzed: duration of liver ischemia, liver parenchyma transection time, intraoperative blood loss, significant intraoperative and postoperative complication rate, duration of hospitalization and mortality. **Results.** LRFN was used in 56 liver resections. The average duration of liver ischemia in the RF group was shorter than in the Keli group (7 versus 22 minutes). Parenchymal liver transection was significantly slower in the RF group than in the Keli group (2.05 versus 4.34 cm²/minutes, respectively). There was less intraoperative bleeding using LRFN “*Keliclasia*” technique than in the control group (390 mL compared to 420 mL, respectively). After the use of LRFN two cases of biliary leak and 4 pleural effusions were registered. **Conclusion.** LRFN is simple device for safe liver transection with decreased need for liver ischemia and significant reducing of the intraoperative blood loss. High price for disposable device and slow parenchyma transection are disadvantages of this device.

Key words:

surgical procedures, operative; hepatectomy; treatment outcome; intraoperative complications; postoperative complications; surgical equipment.

Uvod

Zahvaljujući pomacima u saznanjima o građi i funkciji jetre, razvoju hirurške tehnike i reanimacije, hirurgija jetre je u specijalizovanim centrima postala izuzetno bezbedna oblast hirurgije, sa niskim procentom morbiditeta i mortalitetom koji se kreće ispod 5%¹⁻⁵. Indikacije za resekciju jetre iz dana u dan se proširuju, tako da se operativni zahvati izvode i kod bolesnika u poodmaklom životnom dobu, na terenu cirotične jetre i u prisustvu ekstrahepatičnih oboljenja⁴.

Kompleksna anatomska građa jetre, koja predstavlja splet arterijskih, portalnih i hepatičnih venskih krvnih sudova i žučnih vodova, faktor je koji postupak transekcije parenhima primenom klasičnog hirurškog reza čini izuzetno teškim i gotovo nemogućim⁶. Značajne intraoperativne komplikacije u hirurgiji jetre su hemoragija, povrede velikih krvnih sudova i žučnih vodova, kao i insuficijencija jetre. Krvarenje i insuficijencija jetre su komplikacije koje se češće javljaju kod bolesnika sa cirozom jetre, tako da je neprocenljiv značaj adekvatne preoperativne procene stepena oštećenja jetre i primene intraoperativnih mera zaštite jetre od ishemije i krvarenja¹⁻⁶.

Standardni proces transekcije parenhima postiže se finim drobljenjem jetrinog parenhima hvataljkama za krvne sudove po Péan-u ili Kelly-ju. Na ovaj način, vrši se destrukcija parenhima uz istovremenu disekciju vaskularnih i bilijarnih elemenata koji postaju pristupačni za elektrokoagulaciju ili selektivnu ligaturu⁷. Ovaj postupak se naziva keliklazija.

Današnjem hirurgu koji se bavi hirurgijom jetre na raspolaganju su mnogobrojni postupci kojima se postižu *inflow*, *outflow*, totalna ili selektivna ishemija jetre, kao i terapijska pomagala i hirurški instrumenti (ultrazvučni disektori, disektori vodenim mlazom, harmonični skalpel, uređaji za ligaturu itd.), koji služe za bezbednu transekciju jetre⁷⁻⁹. Iako se većina ovih uređaja sa oduševljenjem prihvata u centrima koji se bave hirurgijom jetre, početni entuzijazam opada sa vremenom njihove upotrebe, zbog toga što je cena izuzetno visoka, oprema komplikovana i nepodesna za manipulaciju, a proces hemostaze i biliostaze još uvek daleko od savršenog⁸⁻¹⁰.

Linearni radiofrekventni nož (LRFN) je uređaj za jednokratnu upotrebu, koji služi za transekciju parenhima jetre primenom kontrolisane radiofrekventne struje^{10,11}. U komercijalnoj upotrebi u SAD je od 2000. godine, a Klinika za hirurgiju Kliničkog centra u Nišu je počela sa njegovim korišćenjem među prvima u Evropi.

Cilj rada bio je da se komparativnom analizom intraoperativnih, postoperativnih i ekonomskih parametara značajnih za hirurgiju jetre, odredi realna vrednost radiofrekventnog noža u procesu transekcije parenhima jetre u odnosu na standardnu tehniku keliklazije.

Metode

Ispitivanje je sprovedeno kao prospektivna analiza perioperativnih parametara kod 200 bolesnika kojima je u periodu od 1. januara 2001. do 1. januara 2009. urađena resekcija jetre. Bolesnici su bili podeljeni u 2 grupe: kontrolna grupa (Kelly) bolesnika kojima je resekcija jetre vršena tehnikom keliklazije i ispitivana grupa (RF) bolesnika kojima je transek-

cija jetrinog parenhima izvršena linearnim radiofrekventnim nožem *Tissue Link-Dissection Sealer* (DS – 3,0) (slika 1).



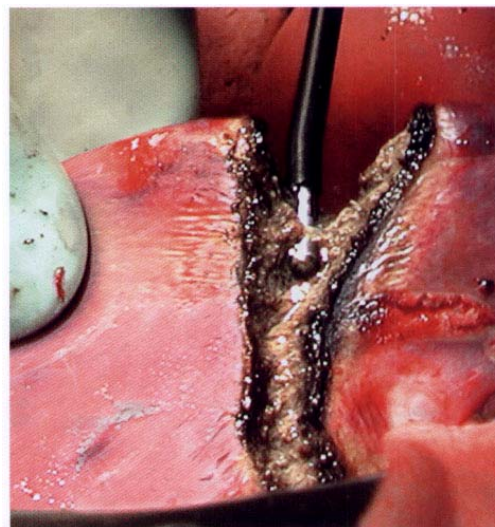
Sl. 1 – Izgled linearnog radiofrekventnog noža (LRFN)

Sve operativne zahvate izveo je isti hirurg. Bolesnici su bili upoznati sa tehnikom i metodom hirurške intervencije i dali su svoj pisani pristanak za operativni zahvat.

Hirurška tehnika

Uređaj LRFN priključivan je na standardni uređaj za elektrokoagulaciju *Aesculap* MD300, koji je podešavan na režim koagulacije, sa snagom od 70 W do 100 W. Protok fiziološkog rastvora iznosio je 3–4 mL/min. U slučaju malignih tumora, operacija je bila rađena po principima R0 resekcije (mikroskopski negativna resekciona linija), sa resekcionom marginom od najmanje 5 mm. Resekcionu liniju održavao je prvi asistent pod određenom trakcijom. Duž planirane linije resekcije vršena je disekcija i koagulacija laganim pokretima uređaja napred-nazad i levo-desno. Dubina koagulacije kretala se od 2 mm do 5 mm. Adekvatna primena uređaja registrovana je promenom boje jetrinog parenhima. U neposrednoj zoni dejstva LRFN koagulirano tkivo sa „zavarenim“ sudovima bilo je braon boje. Sledeća zona bila je beličaste boje, sa koaguliranim parenhimom, ali otvorenim lumenom sudova, dok je na periferiji bila zona hiperemije što predstavlja znak vazodilatacije.

Krvni sudovi i žučni vodovi prečnika od 1 mm do 3 mm ovim uređajem izoluju se i vrši se njihova koagulacija sa gornje i donje strane pre transekcije (slika 2). Iako ima auto-



Sl. 2 – Resekcija jetre uz pomoć linearnog radiofrekventnog noža (LRFN)

ra koji smatraju da se ovim uređajem biliovaskularne strukture do 6 mm mogu sigurno zbrinuti, smatramo da sve strukture veće od 3 mm treba ligirati pre presecanja. Pojedinačna krvareća mesta mogu se zbrinuti i tretiranjem okolnog tkiva koje se skuplja i indirektno zatvara lumen krvnog suda.

U posmatranim grupama bolesnika analizirani su sledeći parametri:

a) parametri vezani za dužinu ishemije jetre i trajanje operativnog zahvata [(površina resekcione linije merena ocrtaivanjem kontura resekcioni površina ostranjenog preparata na milimetarskom papiru (cm^2), brzina transekcije jetrinog parenhima po jedinici površine (min/cm^2), vreme transekcije parenhima/ishemije (min), ukupno vreme trajanja operacije (min)];

b) parametri vezani za intraoperativni gubitak krvi [(gubitak krvi po jedinici površine (mL/cm^2), gubitak krvi u toku akta transekcije (mL), ukupni gubitak krvi (mL), procenat operacija bez transfuzije)];

c) intraoperativne lezije velikih krvnih sudova ili žučnih vodova;

d) procenat značajnih postoperativnih komplikacija;

e) mortalitet.

Statistička analiza obuhvatala je određivanje mere centralne tendencije (\bar{x}) i mere varijabilnosti (min, max i SD). Za testiranje statističke značajnosti korišćeni su Studentov *t*-test za dva mala nezavisna uzorka i Mann-Whitney-ev test za utvrđivanje razlike u prosečnim vrednostima između dva uzorka.

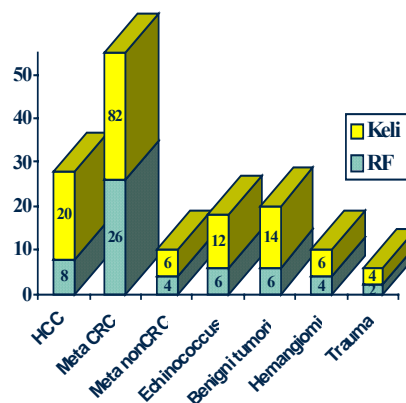
Rezultati

U Hirurškoj klinici Kliničkog centra Niš u periodu od 1. januara 2001. do 1. januara 2009. godine izvršeno je ukupno 308 operacija jetre. Analizirani su statistički podaci prikupljeni u toku 200 resekcioni zahvata.

Kod 56 (28%) bolesnika sa resekcijom jetre primenjen je LRFN, a kod 144 (72%) bolesnika keliklazija. Najčešća indikacija za resekciju jetre bila je metastaza kolorektalnog karcinoma (CRC) (54%). Primarni hepatocelularni i holangiocelularni karcinomi jetre bili su razlog za resekciju jetre kod 14%, adenomi jetre i fokalna nodularna hiperplazija kod 10%, hemangiomi jetre kod 5%, ehinokokne ciste kod 9%, metastaze nekolorektalnih tumora kod 5% i trauma jetre kod 3% bolesnika (slika 3).

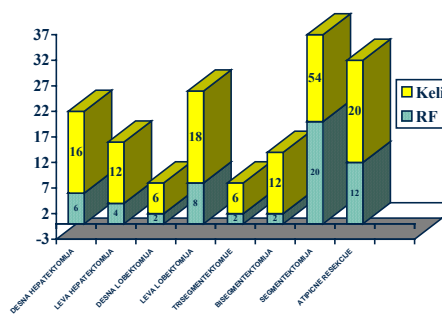
Uz pomoć LRFN urađeno je 22 (27,5%) od 80 *major* resekcija (ostranjenje više od dva anatomski segmenta jetre po Couinaud-u): šest desnih hepatektomija, četiri leve hepatektomije, dve desne lobektomije, osam levih lobektomija, dve trisegmentektomije. *Minor* resekcije (odstranjenje manje

od dva anatomski segmenta jetre po Couinaud-u) pomoću LRFN urađene su u 34 od ukupno urađenih 120 operacija (28,3%): dve bisegmentektomije, 20 segmentektomija i 12 atipičnih resekcija tipa pericistektomije, tumorektomije ili metastazektomije (slika 4).



Sl. 3 – Indikacije za resekciju jetre

RF – grupa operisana linearnim radiofrekventnim nožem; Keli – grupa operisana keliklazijom; HCC – hepatocelularni i holangiocelularni karcinomi; CRC – kolorektalni karcinom



Sl. 4 – Tip resekcije jetre

RF – grupa operisana linearnim radiofrekventnim nožem; Keli – grupa operisana keliklazijom

Prosečna resekciona površina iznosila je $86,4 \text{ cm}^2$ u RF grupi, a u kontrolnoj grupi $92,8 \text{ cm}^2$, što ne predstavlja statistički značajnu razliku. Brzina transekcije po jedinici površine iznosila je $2,05 \text{ cm}^2/\text{min}$ u RF grupi, a $4,29 \text{ cm}^2/\text{min}$ u kontrolnoj grupi. Pringlov manevar nije korišćen, kod bolesnika sa većim krvarenjem i potrebe za preglednijim operativnim poljem. Kod svakog bolesnika korišćena je intermitentna ishemija (ciklus od 15 minuta ishemije sa 5 minuta reperfuzije). Prosečno vreme ishemije jetre u RF grupi iznosilo je sedam minuta, a 22 minuta u kontrolnoj grupi (tabela 1).

Tabela 1

Vrednosti parametara vezanih za dužinu trajanja ishemije i dužinu operativnog zahvata

Parametri	Grupe bolesnika		P
	RF	Keli	
Površina resekcione linije (cm^2)	86,4	92,8	0,04
Brzina transekcije po jedinici površine (min/cm^2)	2,05	4,34	< 0,01*
Vreme ishemije (min)	7	22	< 0,01*
Ukupno vreme trajanja operacije (min)	235	220	0,140

* statistički značajna razlika

RF – bolesnici operisani pomoću linearnog radiofrekventnog noža; Keli – bolesnici operisani keliklazijom

Ukupni gubitak krvi u toku transekcije parenhima bio je značajno manji u grupi bolesnika kod kojih je resekcija rađena pomoću LRFN (390 mL) u odnosu na bolesnike u kontrolnoj grupi (420 mL) (tabela 2).

Nakon primene LRFN komplikacije su registrovane kod šest bolesnika (10,71%) – dve bilijarne fistule i četiri pleuralna izliva rešena perkutanom drenažom, a u kontrolnoj grupi kod (15%) bez statistički značajne razlike ($p > 0,05$) (tabela 3).

Ukupni perioperativni mortalitet iznosio je 3% (šest bolesnika). Svi bolesnici koji su umrli, bili su iz kontrolne grupe. Operacije su rađene na terenu preegzistentne hepatopatije ili su to bili bolesnici sa pratećim komorbiditetom.

govog trostrukog heliksa. Na toplotu posebno su osetljivi kolagen tip I i III, koji ulaze u sastav zidova krvnih sudova i žučnih vodova i raspoređeni su cirkumferencijalno. Denaturacija kolagena nastaje topljenjem hidratiranih kristala, što dovodi do prskanja vodoničnih veza i raspadanja trostrukog heliksa u nasumično organizovane lance. S obzirom na to da se intermolekulske veze održavaju, ovako razoreni dugi lanci kolagena skupljaju se, uz otok, u perpendikularnom pravcu u odnosu na normalnu orijentaciju vlakana, što dovodi do zatvaranja (varenja) lumena koaguliranih krvnih sudova i žučnih vodova, čak do 6 mm¹¹⁻¹³.

Zahvaljujući svojim fizičkim karakteristikama, RF struje su jako pogodne za primenu na parenhimskim organi-

Tabela 2

Gubitak krvi u toku operativnog zahvata

Parametri	Grupa bolesnika		p
	RF	Keli	
Gubitak krvi po jedinici površine (mL/cm ²)	2,31	2,52	0,04
Gubitak krvi u toku akta transekcije (mL)	189,42	233,85	0,0066*
Ukupni gubitak krvi (mL)	390	420	0,145
Operacije bez transfuzije (%)	45	49	

* statistički značajna razlika

RF – bolesnici operisani pomoću linearnog radiofrekventnog noža; Keli – bolesnici operisani keliklazijom

Tabela 3

Komplikacije nakon resekcije jetre

Postoperativne komplikacije	RF [n (%)]	Keli [n (%)]
Bilijarna fistula	2 (3,5)	4 (2,76)
Subfrenični apsces		2 (1,38)
Plućne komplikacije	4 (7)	4 (2,76)
Ascites		2 (1,38)
Insuficijencija jetre		4 (2,76)
PTE		2 (1,38)
Ukupno	6 (10,71)	18 (15)

RF – bolesnici operisani pomoću linearnog radiofrekventnog noža;
Keli – bolesnici operisani keliklazijom

Diskusija

Upotrebu radiofrekventnih (RF) struja u medicini započeli su D'Arsonval i Oudin, ali je Clark prvi, 1910. godine, upotrebio RF za koagulaciju tkiva i destrukciju tumorskih ćelija. Primenu RF struja za hemostazu u hirurgiji popularizovali su Harvey Cushing i Bovie 1926. godine¹¹. Radiofrekventne struje generisane u savremenim uređajima karakterišu se većom talasnom dužinom u odnosu na standardne elektrokatere, pri frekvenciji od 400 do 500 KHz. Veća talasna dužina, uz kontinuirano hlađenje sistema, dovodi do stanja u kome se tkivima isporučuje manja količina toplotne energije, sa temperaturom tkiva koja se kreće ispod 100 °C. Zagrevanje tkiva preko 100 °C dovodi do ključanja intra- i ekstracelularne tečnosti, desikacije isušivanja tkiva i formiranja električne barijere koja predstavlja prepreku za dalju koagulaciju. Održavanje temperature ispod ovog nivoa ne dozvoljava stvaranje eshara, što dovodi do bolje vidljivosti mikrostrukture jetre u toku disekcije. Tkivo koje je koagulirano na taj način mekše je, trošnije i pogodnije za disekciju. Osnovni tkivni efekat RF struja je proces denaturacije kolagena, koji se dešava na nivou nje-

ma¹⁴⁻¹⁷. Upotreba RF struja u hirurgiji jetre je dvojaka, odnosno njima se može postići ablacija tumora ili se mogu koristiti za resekciju zdravog jetrinog parenhima.

Radiofrekventna ablacija tumora je relativno nova terapijska procedura, uvedena 1996, a može se primeniti u toku otvorene hirurgije, laparoskopskim pristupom ili perkutanom putem^{14,15}. Zbog jednostavnosti primene i minimalno invazivnog koncepta, metoda je široko primenjivana u terapiji inoperabilnih tumora jetre, bilo da su oni lokalno neresektibilni, bilobarno distribuirani ili zbog postojanja opštih kontraindikacija i povišenog rizika od operativnog zahvata. Međutim, za primenu RF ablacije postoje određena ograničenja (broj, veličina, lokalizacija tumora), tako da zbog toga, kao i zbog činjenice da je resekcija jetre jedina radikalna terapijska mogućnost u lečenju primarnih i sekundarnih tumora, savremena hirurgija jetre RF ablaciju rezervisala je za odabrane slučajeve i kao dopunu radikalnoj hirurškoj intervenciji^{16,17}.

Dalji napredak u primeni RF struja u hirurgiji jetre predstavlja RF resekcija jetre koju su uveli Weber i Habib 2000–2002. godine^{15,18}. Autori su iskoristili činjenicu da je koagulacija normalnog parenhima jetre daleko brža od koa-

gulacije tumorskog tkiva, tako da je nakon modifikovanja sondi i uz originalni kompjuterski program kojim se regulišu fizički parametri koji određuju dubinu i stepen koagulacije, uz pomoć ovog aparata moguće izvršiti skoro beskrvnu resekciju jetre. I kod ove tehnike postoje ograničenja u primeni RF energije u blizini vene kave inferior, hepatičnih vena ili hilusa jetre, kao i u relativnoj visokoj ceni uređaja^{11,12,18}. U našem radu, nisu registrovana intraoperativna oštećenja velikih krvnih sudova, jer smo nakon njihove identifikacije pomoću intraoperativnog ultrazvuka, disekciju parenhima u njihovoj neposrednoj blizini nastavljali preciznom preparacijom uz pomoć CUSA uređaja ili keliklazijom. Negativna strana ovih uređaja je to što oni zahtevaju specijalni generator RF struje. S druge strane, njihova elektroda ne može se koristiti za simultanu disekciju i koagulaciju, tako da spadaju u grupu neselektivnih uređaja (strukture koje se koagulišu vrlo često se ne mogu razlikovati)¹³. Modifikacija Miličevića i sar.¹⁹, koja podrazumeva sekvencijalnu koagulaciju i resekciju, predstavlja korak dalje u razvoju ove metode, jer može korigovati ove nedostatke.

Linearni radiofrekventni nož je uređaj za jednokratnu upotrebu, koji je razvila američka kompanija Tissue Link početkom 2000. godine. Postoje uređaji za primenu u otvorenoj i laparoskopskoj hirurgiji. Zahvaljujući različitim tipovima sondi LRFN se može koristiti za prekoagulaciju (*floating ball*) ili disekciju (*dissection sealer*). Ne zahteva specifični generator (izvor) RF struje, već se priključuje na standardni generator elektroskalpela, čiju električnu energiju transformiše u RF energiju fokusiranu oko njegovog vrha.

Prve rezultate resekcije jetre LRFN nožem objavili su Espat (2001) i Sturgeon (2003), a uređaj je danas standard za resekciju jetre u mnogobrojnim institucijama u SAD i Evropi^{11,13,19-22}.

Mnogobrojni parametri određuju kvalitet resekcionih zahvata na jetri. Najvažniji od njih su vreme trajanja ishemijske, gubitak krvi, tehničke greške i nastanak komplikacija što, uz adekvatnu resekcionu marginu i ekspoziciju anatomske orijentira, precizno određuje uspešnost hirurgije jetre u jednoj instituciji⁹. Na osnovu ovih parametara može se procenjivati i kvalitet pojedinih uređaja koji se koriste u hirurgiji jetre.

Uobičajena podela resekcija jetre na resekcije većeg (*major*) i manjeg obima (*minor*) ne može pružiti dovoljno preciznu procenu kvaliteta resekcije, jer pojedine *minor* resekcije ili neanatomske operacije mogu po svojoj kompleksnosti, vremenu trajanja i krvarenju, daleko premašiti anatomske resekcije većeg obima. Zbog toga, objektivizacija rezultata u hirurgiji jetre može se postići ukoliko se svi podaci određuju u odnosu na jedinicu resekcionu površinu (po cm^2)¹¹. Jedna od osnovnih prednosti RF uređaja je mogućnost skoro beskrvne resekcije jetrinog parenhima, bez potrebe za primenom Pringle-ovog manevra, što je od posebnog značaja kod resekcija na terenu cirotične jetre i u slučaju transplantacije jetre sa živog davaoca^{11,12}. Na našem mate-

rijalu, trajanje resekcionne faze operacije bilo je dvostruko kraće u grupi bolesnika kod kojih je primenjena metoda keliklazije u odnosu na LRFN (4,34 prema 2,05 cm^2/min). To je posebno bilo izraženo u početnim fazama našeg rada sa navedenim uređajem, što se uklapa u standardnu krivulju učeravanja nove metode¹³. Savladavanjem tehnike rada, brzina transekcije u zadnjim operacijama približava se standardnoj tehnici – keliklaziji. Kombinovani pristup, koji podrazumeva simultani rad dva hirurga, od kojih jedan vrši disekciju pomoću CUSA-a, dok drugi koaguliše biliovaskularne strukture do 3 mm uz pomoć LRFN, izgleda, predstavlja najbržu i najprecizniju tehniku resekcije jetre²⁰. Primena *inflow* ishemije (Pringle-ov manevar) bila je neophodna u kraćem trajanju u RF grupi odnosu na Keli grupu (17 min prema 22 min).

Prosečan gubitak krvi u toku resekcije jetre iznosi od 500 do 1 500 mL, i svaki gubitak preko 1 000 mL predstavlja značajan prediktivni faktor za nastanak postoperativnih komplikacija^{5,6,9}. S obzirom na to da krvarenje u toku mobilizacije jetre i disekcije vaskularnih struktura u pojedinim slučajevima (ciroza, reinterventne operacije, simultane operacije) može biti značajno, pri upoređivanju različitih metoda resekcije jetre neophodno je izdvojiti ih od gubitaka krvi u toku samog akta resekcije^{11,20}. Iako postoje podaci o tome da je metoda primene LRFN apsolutno beskrvna^{11,12} ili gubitkom od 100 mL u proseku (25–500 mL)¹³, u našoj studiji registrovani su veći gubici krvi. Prosečan gubitak krvi u transekcionoj fazi operacije iznosio je 189,4 mL u RF grupi (50–500 mL). Taj gubitak krvi je statistički značajno manji u odnosu na kontrolnu grupu (233,85 mL). Najobjektivniji parametar – gubitak krvi po jedinici resekcionne površine takođe je manji u RF grupi nego u Keli grupi (2,31 mL/cm^2 prema 2,52 mL/cm^2), ali bez statističke značajnosti. Manji gubitak krvi u toku transekcije parenhima i po jedinici resekcionne površine, doveo je do značajnog smanjenja ukupnih perioperativnih gubitaka i smanjio procenat bolesnika koji su zahtevali transfuziju.

Iako pojedini autori navode nešto veći broj bilijarnih i infektivnih komplikacija nakon primene LRFN, u našoj studiji registrovan je manji broj komplikacija u RF grupi nego kontrolnoj grupi (10,71% prema 15%). Smrtnih ishoda u RF grupi nije bilo, dok je u kontrolnoj grupi preminulo šest bolesnika.

Zaključak

Na osnovu analize naših rezultata, možemo zaključiti da je LRFN relativno jednostavan uređaj za jednokratnu upotrebu, koji ne zahteva poseban generator, niti posebnu obuku. Ovaj uređaj omogućava bezbednu transekciju parenhima i zbrinjavanje biliovaskularnih struktura do 3 mm, uz smanjenje potrebe za primenom Pringle-ovog manevra, smanjenje gubitaka krvi i postoperativnih komplikacija. Negativne strane uređaja su visoka cena i značajno sporija transekcija parenhima u odnosu na klasičan metod keliklazije.

L I T E R A T U R A

1. *Mazzioti A, Cavallari A.* Techniques in liver surgery. London: Greenwich Medical Media; 1997. p. 353–61.
2. *Poston GJ, Blumgart LH.* Surgical management of hepatobiliary and pancreatic disorders. London: Martin Dunitz; 2003. pp. 1–18.
3. *Castaing D, Adam R, Azoulay D.* Chirurgie du foie et de l'hypertension portale. Paris: Masson; 2006. pp. 51–4.
4. *Belghiti J, Hiramatsu K, Benoist S, Massault P, Sauvanet A, Farges O.* Seven hundred forty-seven hepatectomies in the 1990s: an update to evaluate the actual risk of liver resection. *J Am Coll Surg* 2000; 191: 38–46.
5. *Imamura H, Seyama Y, Kokudo N, Maehara A, Sugawara Y, Sano K, et al.* One thousand fifty-six hepatectomies without mortality in 8 years. *Arch Surg* 2003; 138: 1198–206.
6. *Hansen PD, Isla AM, Habib NA.* Liver resection using total vascular exclusion, scalpel division of the parenchyma, and a simple compression technique for hemostasis and biliary control. *J Gastrointest Surg* 1999; 3(5): 537–42.
7. *Heriot AG, Karanjia ND.* A review of techniques for liver resection. *Ann R Coll Surg Engl* 2002; 84: 371–80.
8. *Papadimitriou JD, Fotopoulos AC, Prabalias AA.* The impact of new technology on hepatic resection for malignancy. *Arch Surg* 2001; 136: 1307–13.
9. *Takayama T, Makuuchi M, Kubota K, Haribara Y, Hui AM, Sano K.* Randomized comparison of ultrasonic vs clamp transection of the liver. *Arch Surg* 2001; 136: 922–8.
10. *Nakajima Y, Shimamura T, Kamiyama T, Matsushita M, Sato N, Todo S.* Control of intraoperative bleeding during liver resection: analysis of a questionnaire sent to 231 Japanese hospitals. *Surg Today* 2002; 32: 48–52.
11. *Espat NJ, Helton WS.* Tissue Link Floating Ball device assisted colorectal hepatic metastasectomy. *Tissue Link* 2001; Clinical experience N101.
12. *Sturgeon C, Helton WS, Lamba A, Chejfec G, Espat NJ.* Early experience employing a linear hepatic parenchyma coagulation device. *J Hepatobiliary Pancreat Surg* 2003; 10(1): 81–6.
13. *Geller DA, Tsung A, Maheshwari V, Rutstein LA, Fung JJ, Marsb JW.* Hepatic resection in 170 patients using saline-cooled radiofrequency coagulation. *HPB* 2005; 7(3): 208–13.
14. *Ogihara M, Wong LL, Machi J.* Radiofrequency ablation versus surgical resection for single nodule hepatocellular carcinoma: long-term outcomes. *HPB* 2005; 7: 214–21.
15. *Siperstein A, Garland A, Engle K, Rogers S, Berber E, Foroutani A, et al.* Local recurrence after laparoscopic radiofrequency thermal ablation of hepatic tumors. *Ann Surg Oncol* 2000; 7(2): 106–13.
16. *Curley SA, Izzo F, Delrio P, Ellis LM, Granchi J, Vallone P, et al.* Radiofrequency ablation of unresectable primary and metastatic hepatic malignancies: results in 123 patients. *Ann Surg* 1999; 230(1): 1–8.
17. *Wood TF, Rose M, Chung M, Allegra DP, Foshag LJ, Bilchik AJ.* Radiofrequency ablation of 231 unresectable hepatic tumors: indications, limitations, and complications. *Ann Surg Oncol* 2000; 7(8): 593–600.
18. *Weber JC, Navarra G, Jiao LR, Nicholls JP, Jensen SL, Habib NA.* New technique for liver resection using heat coagulative necrosis. *Ann Surg* 2002; 236(5): 560–3.
19. *Miličević M, Bulajić P, Žvela M, Dervenis C, Basarić D, Galun D.* Radiofrequency-Assisted Minimal Blood Loss Liver Parenchyma Dissection Technique. *Dig Surg* 2007; 24: 306–13.
20. *Aloia TA, Zorzi D, Abdalla EK, Vauthey JN.* Two-surgeon technique for hepatic parenchymal transection of the noncirrhotic liver using saline-linked cautery and ultrasonic dissection. *Ann Surg* 2005; 242: 172–7.
21. *Pamecha V, Gurusamy KS, Sharma D, Davidson BR.* Techniques for liver parenchymal transection: a meta-analysis of randomized controlled trials. *HPB* 2009; 11(4): 275–81.
22. *Stojanović M, Jeremić M, Bogičević A, Radojković M, Zlatić A, Jeremić Lj, et al.* The influence of new surgical concept on results of liver resection. *Acta Fac Med Naiss* 2004; 21 (4): 179–84.

Primljen 17. IX 2009.
 Revidiran 9. II 2010.
 Prihvaćen 1. VII 2010.



Carotid ultrasonographic parameters as markers of atherogenesis and mortality rate in patients on hemodialysis

Ultrazvučni parametri karotidnih arterija kao markeri ateroskleroze i mortaliteta kod bolesnika na hemodijalizi

Radojica Stolić*, Goran Trajković†, Aleksandar Jovanović*, Dragica Stolić‡, Vladan Perić*, Saša Sovtić*, Gordana Šubarić-Gorgieva*

University of Priština, Faculty of Medicine, *Internal Clinic, †Institute of Medical Statistics and Informatics, Priština/Kosovska Mitrovica, Serbia; ‡Health Center, Priština/Gračanica, Serbia

Abstract

Background/Aim. Vascular endothelium plays an important role in atherogenesis. The aim of this study was to estimate the correlation of endothelium malfunction and arteriosclerosis in patients on hemodialysis. **Methods.** The investigation was designed as a clinical, non-randomized, five-year study in the “Kragujevac” Clinical Center and included 146 patients. We evaluated demographic characteristics, smoking, duration of dialysis, existence of tissue calcification and duplex ultrasound parameters of the carotid artery. All lethal outcomes, including the cause and time of death were recorded. **Results.** The cumulative survival rate was 57.5%. Survival was short in patients with wider lumen diameter of the carotid arteries. Carotid artery lumen diameter in men was wider than in women. The area cross section was closely correlated with intima media thickness ($r = 0.913$; $p < 0.0001$), as well as with the lumen diameter of the carotid arteries ($r = 0.527$; $p < 0.0001$). Carotid artery lumen diameter was negatively associated with serum cholesterol ($r = -0.278$; $p = 0.019$), while serum triglycerides correlated negatively with the cross section of intima media ($r = -0.261$;

$p = 0.028$). Positive correlations were found between the serum total protein level and carotid artery lumen diameter ($r = 0.235$; $p = 0.047$), cross section intima media ($r = 0.269$; $p = 0.022$) and cholesterol ($r = 0.248$; $p = 0.037$). Time on dialysis showed a negative correlation with carotid artery cross section ($r = -0.241$; $p = 0.04$), while age was positively correlated with intima media ($r = 0.295$; $p = 0.013$), lumen diameter ($r = 0.296$; $p = 0.012$) and intima media cross section ($r = 0.347$; $p = 0.003$). Regression analysis pointed to predictive importance of carotid artery lumen diameter for survival (Beta = 0.437; $p = 0.011$) of the examined patients. The cumulative rate of survival was 57%. **Conclusion.** In our study patient age correlated positively with all parameters of arteriosclerosis. The average duration of dialysis was negatively associated with carotid artery diameter, which was significantly higher in males. Regression correlation analyses indicated that the survival rate of the patients on hemodialysis was lower if the carotid artery diameter was larger.

Key words: arteriosclerosis; hemodialysis; endothelium, vascular; ultrasonography; mortality; carotid artery, common.

Apstrakt

Uvod/Cilj. Endotel krvnih sudova ima veliki značaj u procesu aterogeneze. Cilj ovog rada bio je da se utvrdi korelacija endotelne disfunkcije i ateroskleroze kod bolesnika na hemodijalizi. **Metode.** Studija je organizovana kao klinička i nerandomizirana, u periodu 2004–2008. godine u Centru za hemodijalizu Kliničkog centra „Kragujevac“. Analizirane su demografske karakteristike, pušenje, dužina trajanja hemodijalize, mekotkivne kalcifikacije i dopler ultrazvučni parametri karotidnih arterija. Evidentirani su

svi letalni ishodi, uzrok i vreme smrti. **Rezultati.** Kod muškaraca zabeležen je statistički značajno širi prečnik karotidnih arterija u odnosu na žene. Pozitivna korelacija postignuta je između površine poprečnog preseka i debljine intime medije ($r = 0,913$; $p < 0,0001$), kao i prečnika karotidnih arterija ($r = 0,527$; $p < 0,0001$). Holesterol negativno utiče na prečnik karotidnih arterija ($r = -0,278$; $p = 0,019$). I trigliceridi negativno korelišu sa površinom poprečnog preseka intime medije ($r = -0,261$; $p = 0,028$). Pozitivna korelacija utvrđena je između nivoa ukupnih proteina u serumu i prečnika lumena karotidnih arterija

($r = 0,235$; $p = 0,047$), površine poprečnog preseka intime medije ($r = 0,269$; $p = 0,022$) i holesterola ($r = 0,248$; $p = 0,037$). Dužina dijaliziranja ima negativnu korelaciju sa prečnikom karotidne arterije ($r = -0,241$; $p = 0,04$), a starost pozitivno koreliše sa intimom medijom ($r = 0,295$; $p = 0,013$), dijametrom lumena ($r = 0,296$; $p = 0,012$) i površinom poprečnog preseka intime medije ($r = 0,347$; $p = 0,003$). Regresiona analiza ukazuje na prediktivni značaj prečnika lumena karotidnih arterija za preživljavanje (Beta = 0,437; $p = 0,011$) ispitivanih bolesnika. Kumulati-

vna stopa preživljavanja u našoj studiji bila je 57,5%. **Zaključak.** Starost pacijenata pozitivno koreliše sa svim parametrima ateroskleroze. Prosečno trajanje dijalize negativno koreliše sa prečnikom karotidnih arterija koji je veći kod muškaraca. Što je prečnik karotidnih arterija veći, preživljavanje bolesnika na hemodijalizi je kraći.

Ključne reči:

arterioskleroza; hemodijaliza; krvni sudovi, endotel; ultrasonografija; mortalitet; a. carotis communis.

Introduction

Patients treated by dialysis have 10–20 times higher risk of suffering from cardiovascular diseases and 5–10 times greater incidence of stroke than the population in general. Such a high frequency is a consequence of an atherogenesis process caused by numerous metabolic abnormalities but this can be explained only partially by already known mechanisms¹. The present theory on arteriosclerosis emphasizes that it is initiated by endothelium malfunction primarily caused by increased levels of free radicals, homocysteine and LDL, while among infectious agents cytomegalovirus and *Chlamydia pneumoniae* are important. If an anti-inflammatory response is not sufficiently effective to prevent or amortize these risk factors, then the arteriosclerosis process develops by stimulation, migration and proliferation of smooth muscle cells, which leads to thickening of the artery wall^{2,3}. This is followed by narrowing of the lumen due to gathering of connective tissue in the intima with consequent endothelium malfunction. Evaluation of intima and media thickening of the carotid arteries is a good indicator of coronary arteriosclerosis and an independent predictor of cardiovascular mortality not only in dialysed population but also in population before dialysis⁴.

The aim of this study was to determine the extent of endothelium malfunction and arteriosclerosis and its correlation with clinical and biochemical parameters in patients on chronic hemodialysis.

Methods

Our research included 146 patients, 84 (57.5%) men and 62 (42.5%) women, of average age 58 ± 12.2 years, treated by chronic hemodialysis in the Center for Dialysis of the "Kragujevac" Clinical Center. The patients were monitored from 2004 to 2008 in a clinical and non-randomized study design. Demographic and clinical characteristics of the patients (time of dialysis, soft tissue calcifications identified by X-ray diagnosis of the pelvis, extremities and skull, smoking habits) were analysed. All lethal cases were recorded with the time and cause of death. The study was approved by the Ethics Board of the Clinical Center "Kragujevac", in accordance with the Declaration of Helsinki for Medical Research.

Routine biochemical analyses were carried out by flow cytometry using a Coulter device and spectropho-

tometrically with an Ilab-600 instrument. The blood for biochemical tests was taken in the mid of the week, before the hemodialysis.

Arteriosclerosis was defined by ultrasonography performed with an SDU-220 Shimadzu instrument (Tokio, Japan) using a 7.5-MHz high-resolution probe. The atherogenesis markers were thickness of intima media and lumen diameter of the carotid arteries. Intima media thickness was defined as a low-level echo grey band that did not project into the arterial lumen and was measured during the diastolic phase as a distance between the leading edge of the first and second echogenic line. The average measurement of the obtained values was taken as intima media thickness and was considered abnormal when it exceeded 0.82 mm. Computation of cross section intima media (CSIM) was calculated as follows: $CSIM = 3.14 [(lumen\ diameter/2 + intima\ media\ thickness)^2 - (lumen\ diameter/2)^2]$. Measurements were made 2 cm below and above the carotid bifurcation, three measurements on each side. The carotid arteries are favourable for exploration because their middle layer is distinctly weak, so thickening of intima media is more important in such elastic arteries than in the so-called muscle arteries⁴⁻⁸. Ultrasonic examinations were made once a year, all of them by the first author.

Statistical analysis was made with the Instat program (GraphPad Software Inc, San Diego, USA). The χ^2 test was employed for testing hypotheses. The associations between two variables was analysed by the Pearson's correlation. Kaplan-Meier analysis was used for determination of the cumulative rate of survival. A p value < 0.05 was considered statistically significant.

Results

The average duration of dialysis in our 146 patients was 83 ± 53.25 months. Their mean carotid artery intima media thickness was 0.91 ± 0.198 mm and lumen diameter was 6.96 ± 0.99 mm, while cross section of intima media was 26.81 ± 8.18 mm. Soft tissue calcifications were noticed in 22% of our patients. Almost three quarters of them were either active or passive smokers. A total number of patients with a lethal outcome was 62 (42.5%), out of which 32 (52%) suffered from cardiovascular disease. Infections, diabetes mellitus complications and other causes participated equally at 16% (Table 1).

The cumulative survival rate was 57.5% (Figure 1).

Table 1
Basic characteristics of clinical parameters of the examined patients (n = 146)

Parameters	Volumes
Age (years), (mean \pm SD)	58 \pm 12.2
Gender (M/F)	84/62
Duration of hemodialysis (months), (mean \pm SD)	83 \pm 53.25
Doppler parameters (mean \pm SD)	
intima media (mm)	0.91 \pm 0.198
LD (mm)	6.96 \pm 0.99
CSIM (mm)	26.81 \pm 8.18
Calcifications (yes/no)	32/114
Smoking history (yes/no)	104/42
Exitus lethalis (n/%)	62/42.5
Cause of death (n/%)	
cardiovascular diseases	32/52
infectious disease	10/16
D. mellitus complication	10/16
other	10/16

LD – lumen diameter; CSIM – cross section intima media

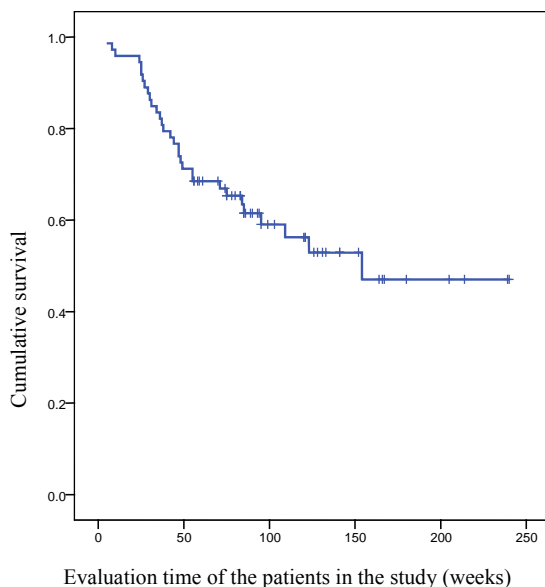


Fig. 1 – Kaplan-Meier survival curve
The cumulative rate of patient survival at the end of the study was 57.5%

The mean lumen diameter of the carotid arteries in men was 7.45 ± 1.03 mm, while in women it was 6.87 ± 0.80 mm, the difference being statistically significant ($p = 0.013$) (Figure 2).

There were positive correlations between the cross section of intima media of the carotid arteries and both the thickness of intima media ($r = 0.913$; $p < 0.0001$) and the lumen diameter ($r = 0.527$; $p < 0.0001$). On the other hand, dialysis length was negatively associated with carotid artery lumen diameter ($r = -0.241$; $p = 0.04$). Negative correlations were also found between serum cholesterol concentration and carotid artery lumen diameter ($r = -0.278$; $p = 0.019$) and between triglyceride level and the cross section intima media ($r = -0.261$; $p = 0.028$), while a positive correlation was identified between

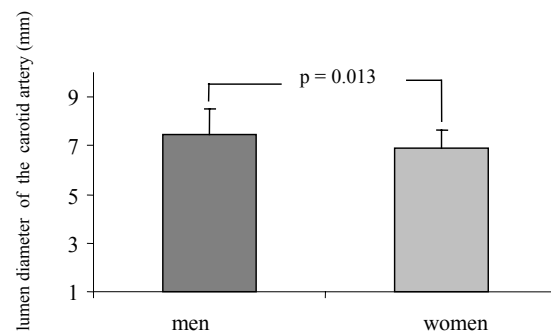


Fig. 2 – Carotid artery diameter in men and women
The mean lumen diameter of the carotid arteries in men was 7.45 ± 1.03 mm and in women 6.87 ± 0.80 mm. The difference was statistically significant ($p = 0.013$)

triglyceride and cholesterol concentrations ($r = 0.617$; $p < 0.0001$). Serum total protein concentration was positively associated with intima media thickness ($r = 0.235$; $p = 0.047$), cross section of intima media surface ($r = 0.269$; $p = 0.022$) and total cholesterol ($r = 0.248$; $p = 0.037$). Serum albumin also showed a similar relation with cholesterol ($r = 0.436$; $p < 0.0001$) and the total protein concentration ($r = 0.634$; $p < 0.0001$). A total calcium concentration was correlated with serum protein level ($r = 0.295$; $p = 0.012$). Inorganic phosphorus negatively correlated with cholesterol ($r = -0.239$; $p = 0.048$) and calcium concentrations ($r = -0.280$; $p < 0.0001$) (Table 2). Age correlated positively with intima media thickness ($r = 0.295$; $p = 0.013$), lumen diameter ($r = 0.296$; $p = 0.012$) and the intima media cross section ($r = 0.347$; $p = 0.003$) (Table 3).

Cox regression analysis showed a statistical significance for the relation between carotid artery lumen diameter and patient survival (Beta = 0.437; $p = 0.011$) (Table 4). Survival was shorter in patients with wider lumen diameter of carotid arteries.

Table 2.

Correlation of Doppler ultrasonic findings with clinical parameters

Parameters	Correlation	IM	LD	CSIM	Cholest.	Trigl.	Tot. prot.	Album.	Ca	P
LD	r	0.198								
	p	0.094								
	n	146								
CSIM	r	0.913	0.527							
	p	0.000*	0.000*							
	n	146	146							
Cholest.	r	0.008	-0.278	-0.097						
	p	0.945	0.019*	0.420						
	n	142	142	142						
Trigl.	r	-0.210	-0.178	-0.261	0.617					
	p	0.079	0.138	0.028*	0.000*					
	n	142	142	142	142					
Tot.prot.	r	0.235	0.170	0.269	0.248	0.004				
	p	0.047*	0.154	0.022*	0.037*	0.976				
	n	144	144	144	142	142				
Album.	r	0.079	0.111	0.098	0.436	0.136	0.634			
	p	0.510	0.353	0.412	0.000*	0.257	0.000*			
	n	144	144	144	142	142	144			
Calcium (Ca)	r	0.059	0.023	-0.006	0.144	0.004	0.295	0.144		
	p	0.625	0.849	0.959	0.232	0.974	0.012*	0.229		
	n	144	144	144	142	142	144	144		
Phosphorus (P)	r	-0.009	0.003	0.023	-0.239	-0.215	-0.077	0.012	-0.280	
	p	0.938	0.983	0.854	0.048*	0.076	0.529	0.921	0.020*	
	n	138	138	138	138	138	138	138	138	
Parathormone	r	0.039	0.121	0.051	-0.132	0.010	-0.153	-0.102	0.254	0.023
	p	0.748	0.313	0.675	0.279	0.938	0.206	0.401	0.034*	0.853
	n	146	146	146	138	138	140	140	140	134

*Statistically significant results; LD – lumen diameter; IM – intima media; CSIM – cross section intima media

Table 3.

Correlation of Doppler parameters with clinical variables for 146 patients

Parameters	Correlation	IM	LD	CSIM	Duration of he- modialysis
LD	r	0.198			
	p	0.094			
CSIM	r	0.913	0.527		
	p	<0.001*	<0.001*		
Duration of hemodialysis	r	0.090	-0.241	0.014	
	p	0.448	0.040*	0.909	
Age	r	0.295	0.296	0.347	-0.248
	p	0.013*	0.012*	0.003*	0.037*

*Statistically significant results; LD – lumen diameter; IM – intima media; CSIM – cross section intima media

Table 4
Cox regression model of the effect of Doppler parameters of the carotid arteries on the survival of patients

Variables	Beta	p
IM	0.799	0.30
LD	0.437	0.011*
CSIM	-0.037	0.12

*Statistically significant result; IM – intima media; LD – lumen diameter; CSIM – cross section intima media

Discussion

Epidemiological data show that more than 400,000 Americans suffer from kidney insufficiency, while 300,000 are treated by chronic dialysis, incurring an annual expenditure of around 23 billion dollars⁹. Despite improved conditions for dialysis and pharmacotherapy

during the last 20 years, the annual death rate of about 20% is still alarmingly high. Although patients with terminal kidney insufficiency may suffer from a number of traditional risk factors which can increase mortality rate, such as hypertension, insulin resistance, dyslipidemia, these cannot fully explain a high mortality rate, which is five times higher than in patients without such risk factors¹⁰. More than a half of those dying suffer from a cardiovascular disease⁹⁻¹¹.

It is known that patients with chronic kidney insufficiency are predisposed for cardiovascular diseases, due to risk factors additional to other causes, such as old age, hypertension, diabetes mellitus, smoking or dyslipidemia¹². It is thought that an intima media thickness of 0.8 mm creates conditions for atherogenesis⁵ but there is no single opinion about a media thickness value that is a risk for cardiovascular mortality in patients on dialysis. The most

frequent assertion is that the measurement must be > 1 mm. Some studies for estimating these factors do not only measure intima media thickness but also whether it is homogenous. Namely, non-homogenous intima media in dialysis patients may predict early changes in artery wall structure leading to arteriosclerotic plaque. Intima media thickness is not just an indicator of atherogenesis, but also a reaction to hemodynamic changes, which are very striking in dialysis patients^{3,13,14}. The mean value of intima media thickness in our patients was 0.91 mm, lumen diameter 6.96 mm and the cross section of intima media 26.8 mm. Our results are not in accordance with data in the available literature pointing to the predictive importance of intima media thickness for cardiovascular mortality. However, techniques for measuring intima media vary and mean values obtained from particular section points can be interpreted in different ways. This is a limiting factor in all studies on intima media, which can be moderated partially by calculating the cross section of intima media thickness. There is a need for identification of all the risk factors that can lead to the development of cardiovascular disease before clinical appearance of the disease. That is why estimation of atherogenesis B-mode ultrasonography is an important step in evaluation of cardiovascular diseases. However, it is not quite clear whether enlargement of the intima media represents a physiological response to a hemodynamic occurrence^{3,14} or whether it is the environment in which the process of atherogenesis is initiated. On the other hand, it is very difficult to separate intima and media. Other factors also contributed to enlargement of the artery diameter, such as old age, primary vascular diseases and hypertension. Although intima media represents an important marker of arteriosclerosis in epidemiological and clinical studies, other alternative procedures should be considered for predictive importance, because traditional risk factors are only partially confirmed. Namely, some epidemiological studies indicate that B-mode ultrasonic examination is not sufficiently accurate and that the difference ranges from 0.00067, which is confirmed by a mathematical method. Endothelium malfunction should be estimated in asymptomatic people as well, as it is clear that the strategy of optimal risk reduction for its appearance is an important procedure in disease prevention¹⁵.

Apart from the so-called classical risk factors for cardiovascular mortality, other contributing factors which lead to vascular calcification are also important. Those are, primarily, an increased level of inorganic phosphate, parathyroid hormones and the calcium phosphate product. However, close attention must be paid to metastatic calcifications in patients with hypoparathyroidism, who often show signs of adynamic bone disease, due to an inability to store calcium surpluses¹⁶⁻¹⁹. There are some contradictory findings which indicate that increased levels of inorganic phosphate and calcium phosphate product, do not necessarily lead to soft tissue calcification *in vivo*, even though high phosphate concentration induces calcification *in vitro*. This suggests that hyperphosphatemia may cause calcification but the effect is annulled due to the existence of homeostatic mechanisms. One

factor protecting against vascular calcification is the smooth muscle cell of blood vessel endothelium. Under experimental conditions, using an animal model, an analogue of vitamin D which indirectly causes hyperphosphatemia, was found to have a negative effect on the endogenous protective mechanism, leading to vascular calcification. This demonstrates a complex mechanism in an *in vivo* environment, which cannot be easily reproduced under *in vitro* and *ex vivo* conditions. However, it is clear that hyperphosphate represents a changed medium creating conditions for vascular calcification²⁰⁻²². All these complex mechanisms are probably reasons why our results do not point to joint activity of Doppler ultrasonic markers of atherogenesis and the imbalance of calcium and phosphate metabolism, together with the level of parathyroid hormone. Thus, only 22% of our patients had calcifications, which is lower than other data stating that 27% of patients on dialysis and 29% on peritoneal dialysis^{23,24} had a clear picture of soft tissue calcifications.

There are findings that relate the increase of intima media thickness to a high risk for vascular calcification in patients with diagnosed vascular calcifications. It is obvious that the thickness of intima media can be seen as a cause-consequence connection between vascular risk factors and the clinical appearance of arterial occlusive disease symptoms²⁵. An increase of intima media is related to death from myocardial stroke. Hypertrophy of the intima media of 0.1 mm increases the risk of coronary morbidity by 11%. It is estimated that in symptomatic individuals, enlargement of intima media thickness by 0.03 mm per evaluation year represents a valid indicator for cardiovascular morbidity. Periodical evaluation of Doppler parameters of carotid arteries provides important information on possible progression of arteriosclerosis and can be a valid sign of successful therapy in arteriosclerosis^{26,27}. Some studies, however, point to a less solid relation between intima media thickness of the carotid artery and coronary arteriosclerosis²⁸. These doubts reduce the importance of carotid artery intima media, as a predictive factor of cardiovascular morbidity²⁹. Nevertheless, it has been confirmed that older individuals have hypertrophic intima media³⁰ and all the ultrasonic arteriosclerosis markers are in interrelated correlation with conventional atherogenic risk factors, the duration of dialysis and age^{4,31} in the first place. The results of our study also show positive correlations of all morphological indices of carotid artery arteriosclerosis with age, while the duration on dialysis correlates negatively with carotid artery lumen diameter. We also showed a statistically significant difference in carotid artery diameter in relation to sex of the examined patients. An increase of lumen diameter of the carotid arteries was significantly more apparent in males of dialysis, which is in accordance with the known conventional atherogenic risk factors. Regression analysis of the effect of Doppler parameters of the carotid arteries on a patient survival indicated lumen diameter as a statistically significant independent variable. Namely, a higher value of this parameter was associated with shorter patient survival, which shows that noninvasive quantification of arteriosclerosis is an important predictor of cardiovascular mortality.

Cardiovascular diseases are the main cause of death of patients on dialysis, as they represent 43–52% of the total mortality index^{32–36}. Out of the general mortality rate in our patients, which was 42.5%, a cardiovascular cause of death was confirmed in 52%. The cumulative survival rate was 57.5% which matches the trend of patient survival in other studies.

Conclusion

In our study patient age correlated positively with all parameters of arteriosclerosis. The average duration of dialysis was negatively associated with carotid artery diameter, which was significantly higher in males. Regression correlation analysis indicated that the survival rate of the patients was lower if the carotid artery diameter was larger.

R E F E R E N C E S

1. *Segura J, Campo C, Roldán C, Christiansen H, Vigil L, García-Robles R, et al.* Hypertensive renal damage in metabolic syndrome is associated with glucose metabolism disturbances. *J Am Soc Nephrol* 2004; 15 Suppl 1: S37–42.
2. *Qureshi AR, Alvestrand A, Divino-Filho JC, Gutierrez A, Heimburger O, Lindholm B, et al.* Inflammation, malnutrition, and cardiac disease as predictors of mortality in hemodialysis patients. *J Am Soc Nephrol* 2002; 13: 28–36.
3. *Stolić R, Trajković G, Subarić-Gorgieva G.* Ultrasound diagnostics of atherosclerosis in chronic renal insufficiency. *Med Pregl* 2006; 59(5–6): 270–2. [Serbian].
4. *Stolić R, Trajković G, Perić V, Jovanović A, Subarić-Gorgieva G.* Impact of arteriosclerosis on the functioning of arteriovenous fistula for hemodialysis. *Vojnosanit Pregl* 2007; 64(1): 13–8. (Serbian)
5. *Szeto CC, Chow KM, Woo KS, Chook P, Ching-Ha Kwan B, Leung CB, et al.* Carotid intima media thickness predicts cardiovascular diseases in Chinese predialysis patients with chronic kidney disease. *J Am Soc Nephrol* 2007; 18(6): 1966–72.
6. *Papagianni A, Kalouvalos M, Kirmizis D, Vainas A, Belebri AM, Alexopoulos E, et al.* Carotid atherosclerosis is associated with inflammation and endothelial cell adhesion molecules in chronic haemodialysis patients. *Nephrol Dial Transplant* 2003; 18: 113–9.
7. *Handa N, Matsumoto M, Maeda H, Hongaku H, Kamada T.* Ischemic stroke events and carotid atherosclerosis. Results of the Osaka Follow-up Study for Ultrasonographic Assessment of Carotid Atherosclerosis (the OSACA Study). *Stroke* 1995; 26(10): 1781–6.
8. *Sasaki T, Watanabe M, Nagai Y, Hoshi T, Takasawa M, Nukata M, et al.* Association of plasma homocysteine concentration with atherosclerotic carotid plaques and lacunar infarction. *Stroke* 2002; 33: 1493–6.
9. *Stolić RV, Trajković GZ, Perić VM, Jovanović AN, Marković SR, Sotić SR, et al.* The influence of atherosclerosis and plasma D-dimer concentration in patients with a functioning arteriovenous fistula for maintenance hemodialysis. *Int Urol Nephrol* 2008; 40(2): 503–8.
10. *Wang AYM, Ho SSY, Wang M, Liu EKH, Ho S, Li PKT, et al.* Cardiac valvular calcification as a marker of atherosclerosis and arterial calcification in end-stage renal disease. *Arch Intern Med* 2005; 165: 327–32.
11. *Go AS, Chertow GM, Fan D, McCulloch CE, Hsu CY.* Chronic kidney disease and the risks of death, cardiovascular events, and hospitalization. *N Engl J Med* 2004; 351(13): 1296–305.
12. *de Zeeuw R, Grootendorst DC, Axelsson J, Boeschoten EW, Krediet RT, Dekker FW.* NECOSAD Study Group. Excess mortality due to interaction between protein-energy wasting, inflammation and cardiovascular disease in chronic dialysis patients. *Nephrol Dial Transplant* 2008; 23: 2957–64.
13. *Keltikangas-Järvinen L, Pulkki-Räback L, Puttonen S, Viikari J, Raitakari OT.* Childhood hyperactivity as a predictor of carotid artery intima media thickness over a period of 21 years: the cardiovascular risk in young Finns study. *Psychosom Med* 2006; 68: 509–16.
14. *Nanayakkara PW, van Guldener C, ter Wee PM, Scheffer PG, van Littersum FJ, Twisk JW, et al.* Effect of a treatment strategy consisting of pravastatin, vitamin E, and homocysteine lowering on carotid intima-media thickness, endothelial function, and renal function in patients with mild to moderate chronic kidney disease: results from the Anti-Oxidant Therapy in Chronic Renal Insufficiency (ATIC) Study. *Arch Intern Med* 2007; 167(12): 1262–70.
15. *Hermans MM, Kooman JP, Brandenburg V, Ketteler M, Damoiseaux JG, Tervaert JW, et al.* Spatial inhomogeneity of common carotid artery intima-media is increased in dialysis patients. *Nephrol Dial Transplant* 2007; 22(4): 1205–12.
16. *Eigenbrodt ML, Bursac Z, Eigenbrodt EP, Couper DJ, Tracy RE, Mehta JL.* Mathematical estimation of the potential effect of vascular remodeling/dilatation on B-mode ultrasound intima-media thickness. *QJM* 2004; 97(11): 729–37.
17. *Yamada K, Fujimoto S, Nishiura R, Komatsu H, Tatsumoto M, Sato Y, et al.* Risk factors of the progression of abdominal aortic calcification in patients on chronic haemodialysis. *Nephrol Dial Transplant* 2007; 22(7): 2032–7.
18. *Toussaint ND, Lau KK, Polkinghorne KR, Kerr PG.* Measurement of vascular calcification using CT fistulograms. *Nephrol Dial Transplant* 2007; 22: 484–90.
19. *Johnson RC, Leopold JA, Loscalzo J.* Vascular calcification pathobiological mechanisms and clinical implications. *Circ Res* 2006; 99(10): 1044–59.
20. *Giacbelli CM.* Vascular calcification mechanisms. *J Am Soc Nephrol* 2004; 15: 2959–64.
21. *Moe SM, Chen NX.* Pathophysiology of vascular calcification in chronic kidney disease. *Circ Res* 2004; 95: 560–7.
22. *Wu-Wong JR, Noonan W, Ma J, Dixon D, Nakane M, Bolin AL, et al.* Role of phosphorus and vitamin D analogs in the pathogenesis of vascular calcification. *J Pharmacol Exp Ther* 2006; 318(1): 90–8.
23. *Shanahan CM.* Vascular calcification—a matter of damage limitation? *Nephrol Dial Transplant* 2006; 21(5): 1166–9.
24. *Sigrist M, Bungay P, Taal MW, McIntyre CW.* Vascular calcification and cardiovascular function in chronic kidney disease. *Nephrol Dial Transplant* 2006; 21(3): 707–14.
25. *Higgins CL, Marvel SA, Morrisett JD.* Quantification of calcification in atherosclerotic lesions. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2005; 25(8): 1567–76.
26. *Dijk JM, van der Graaf Y, Bots ML, Grobbee DE, Algra A.* Carotid intima-media thickness and the risk of new vascular events in patients with manifest atherosclerotic disease: the SMART study. *Eur Heart J* 2006; 27(16): 1971–8.
27. *Kullo IJ, Malik AR.* Arterial ultrasonography and tonometry as adjuncts to cardiovascular risk stratification. *J Am Coll Cardiol* 2007; 49(13): 1413–26.
28. *Stern S.* Are we getting nearer to screening for atherosclerosis? *Circulation* 2008; 117(1): 122–6.

29. *Bots ML, Baldassarre D, Simon A, de Groot E, O'Leary DH, Riley W*, et al. Carotid intima-media thickness and coronary atherosclerosis: weak or strong relations? *Eur Heart J* 2007; 28(4): 398–406.
30. *Bots ML, Evans GW, Riley WA, Grobbee DE*. Carotid intima-media thickness measurements in intervention studies: design options, progression rates, and sample size considerations: a point of view. *Stroke* 2003; 34(12): 2985–94.
31. *Kato A, Takita T, Maruyama Y, Kumagai H, Hisbida A*. Impact of carotid atherosclerosis on long-term mortality in chronic hemodialysis patients. *Kidney Int* 2003; 64(4): 1472–9.
32. *Nasri H, Baradaran A*. Association of early atherosclerotic vascular changes with serum lipoprotein (a) in predialysis chronic renal failure and maintenance hemodialysis patients. *Saudi J Kidney Dis Transpl* 2005; 16(2): 154–60.
33. *Makita S, Nakamura M, Hiramori K*. The association of C-reactive protein levels with carotid intima-media complex thickness and plaque formation in the general population. *Stroke* 2005; 36: 2138–42.
34. *Günel AI, Karaca I, Ozağaç G, Oztürk A, Dogukan A, Celiker H*. Strict volume control can improve structure and function of common carotid artery in hemodialysis patients. *J Nephrol* 2006; 19(3): 334–40.
35. *Modi N, Kapoor A, Kumar S, Tewari S, Garg N, Sinha N*. Utility of carotid intimal medial thickness as a screening tool for evaluation of coronary artery disease in pre-transplant end stage renal disease. *J Postgrad Med* 2006; 52(4): 266–70.
36. *Wang AYM*. Cardiovascular risk factors in end-stage renal disease: Beyond Framingham. *The Hong Kong Med Diary* 2008; 13(4): 17–8.

Received on October 1, 2009.

Revised on March 30, 2010.

Accepted on April 12, 2010.



Terapija hroničnog hepatitisa C – praćenje virusološkog odgovora

Therapy of chronic hepatitis C – virologic response monitoring

Nada Kuljić-Kapulica*, Dragutin Jovanović*, Dejana Savić*,
Elizabeta Ristanović†, Darko Nožić‡, Radmila Rajić‡

Vojnomedicinska akademija, *Institut za mikrobiologiju, †Odeljenje za moral i odnose sa
javnošću, ‡Klinika za infektivne i tropske bolesti, Beograd, Srbija

Apstrakt

Uvod/Cilj. Virusološka dijagnostika je neophodna u otkrivanju i praćenju hepatitisa C, ali je mnogo značajnija u praćenju uspeha antivirusne terapije. Cilj ovog ispitivanja bio je da se odredi stabilan virusološki odgovor (SVO) i ostali faktori povezani sa hroničnim hepatitisom C kod bolesnika koji su lečeni kombinovanom terapijom pegilovanim interferonom alfa i ribavirinom. **Metode.** Ispitivano je 34 bolesnika lečenih kombinovanom terapijom. Određivana je serumska hepatitis C virusna nukleinska kiselina (HCV RNK) pre terapije, 12 nedelja posle početka terapije i šest meseci posle kraja terapije. Stabilan virusološki odgovor (SVO) definisan je kao nedetektibilna HCV RNK šest meseci posle kraja terapije, a virusološki relaps kao pojava HCV RNK šest meseci posle završetka terapije. Hepatitis C virusna RNK određivana je Cobas Amplicor testom. **Rezultati.** Stabilan virusološki odgovor dokazan je kod 19 (55,8%) bolesnika. Genotipizacijom dokazan je genotip 1 kod 27, genotip 3 kod pet i genotip 4 kod dva bolesnika. Kod šest bolesnika dokazan je virusološki relaps šest meseci posle terapije. Kod devet bolesnika HCV RNK bila je pozitivna posle 12 nedelja. **Zaključak.** Dokazana je uspešnost kombinovane terapije u lečenju hroničnog hepatitisa C, kao i značaj praćenja koncentracije HCV RNK za monitoring uspeha terapije. Praćenje HCV RNK posle završene terapije, važno je, takođe, zbog moguće pojave virusološkog relapsa.

Ključne reči:

hepatitis c; hepatitis c, virus; virologija; rnk; genotip; ribavirin; interferon-alfa.

Abstract

Background/Aim. Virological testing is considered to be essential in the management of hepatitis C virus (HCV) infection in order to diagnose infection, and, most importantly, as a guide for treatment decisions and assess the virological response to antiviral therapy. The aim of this study was to determine the rate of a sustained virological response (SVR) and various factors associated with response rates in chronic hepatitis C infected patients treated with pegylated interferon alpha (PEG-IFN) and ribavirin (RBV) combination therapy. **Methods.** A total of 34 patients, treated with PEG-IFN and RBV were studied. Serum HCV-RNA was measured before the treatment, 12 weeks following the start of the therapy and 6 weeks after the treatment cessation. SVR was defined as undetectable serum HCV-RNA 6 months of post-treatment follow-up, virologic relapse (VR) as relapse of HCV-RNA during the post-treatment follow-up. Serum HCV-RNA was measured with the Cobas Amplicor test. **Results.** At the end of post-treatment follow-up 19 (55.8%) patients demonstrated a SVR. The majority of the patients were genotype 1 (27), and the other were genotype 3 (5 patients) and genotype 4 (2 patients). There was VR in 6 patients 6 months after the therapy. In 9 patients HCV-RNA was positive after 12 weeks. **Conclusion.** We demonstrated that patients with chronic HCV infection can be successfully treated with combination of PEG-IFN and RBV. This result emphasizes also that post-treatment follow-up to identify patients with SVR or VR could be important.

Key words:

hepatitis c; hepatitis c, virus; virology; rna; genotype; ribavirin; interferon-alpha.

Uvod

Virusni hepatitis C obuhvata oko 3% svetske populacije i značajan je medicinski problem svuda u svetu. Akutna faza bolesti prolazi često asimptomatski. Komplikacije su hronič-

na infekcija kod velikog broja bolesnika (70–80%), ciroza jetre i hepatocelularni karcinom.

Posle infekcije u periodu od 20 godina kod oko 20–30% bolesnika nastaje ciroza jetre, a kod 1–2% hepatocelularni karcinom. Kod nekih bolesnika ciroza jetre može nastati za nekoliko godina.

Ne postoji specifična profilaksa, odnosno vakcina, i to dodatno komplikuje ovaj problem.

Kod hepatitisa C simptomi su nekarakteristični i bolest se često slučajno otkriva. Kod malog broja bolesnika javlja se žutica i/ili hepatomegalija ili, ređe, splenomegalija^{1,2}. Poseban problem predstavlja hronična faza bolesti.

Terapija hroničnog hepatitisa C (CHC) danas se izvodi kombinovanom terapijom: pegilovanim interferonom alfa2 (PEG-IFN) i ribavirinom. Dužina terapije i doza zavise od genotipa hepatitisa C virusa. Bolesnici sa genotipom 1 i 4 leče se 48 nedelja; ako je kod ovih bolesnika postignut brzi virusološki odgovor (što znači da je PCR negativan četiri nedelje od početka terapije), terapija traje 24 nedelje. Bolesnici sa genotipom 2 i 3 leče se 24 nedelje, a ako je postignut brzi virusološki odgovor, mogu se lečiti i 16 nedelja³⁻⁵. Kod nekih bolesnika, koji u početku dobro reaguju na terapiju (negativan nalaz virusa), kasnije dolazi do ponovne pojave virusa za vreme terapije ili posle prekida terapije. Iz tih razloga, ukupni uspeh terapije sa PEG-IFN alfa2 i ribavirinom je oko 50%.

Kraće trajanje terapije prati manja učestalost neželjenih efekata. Monoterapija PEG-IFN alfa2 primenjuje se kod bolesnika koji ne podnose ili je kod njih kontraindikovana primena ribavirina: bolesnici na hemodijalizi, bolesnici sa anemijom, težim kardiovaskularnim bolestima ili trudnice^{5,6}.

Za praćenje uspeha terapije radi se kvantitativno određivanje hepatitisa C virusne nukleinske kiseline (HCV RNK) u krvi. Virusna nukleinska kiselina dokazuje se testom PCR.

Koncentracija HCV RNK izražava se kao broj kopija/mL ili kao broj internacionalnih jedinica/mL. Infektivnost HCV obično je niska i retko dostiže koncentraciju od 10⁶ kopija/mL.

Parametar uspeha terapije su rani i stabilni virusološki odgovor (SVO) koji se definišu na osnovu određivanja koncentracije virusne nukleinske kiseline.

Stabilan virusološki odgovor definiše se kao odsustvo detektibilne HCV RNK u serumu, što se procenjuje na osnovu testa za određivanje HCV RNK sa limitom detekcije 50 IU/mL ili manje, 24 nedelje od završetka terapije. On je najbolji pokazatelj uspeha lečenja jer ukazuje na eradikaciju virusa. Dobar predskazivač SVO je rani virusološki odgovor na terapiju. Rani virusološki odgovor definiše se odsustvom HCV RNK u serumu ili smanjenjem za 2 ili više loga u odnosu na početnu vrednost, posle 12 nedelja od početka terapije. Stabilan virusološki odgovor postiže se kod većine bolesnika sa ranim virusološkim odgovorom.

Cilj rada bio je određivanje koncentracije HCV RNK kod bolesnika na antivirusnoj terapiji radi praćenja uspeha terapije.

Metode

Praćena su 34 bolesnika sa CHC koji su lečeni u Klinici za infektivne i tropske bolesti VMA u periodu 2006–2008. godine. Dijagnoza bolesti postavljena je na osnovu kliničkih, hematoloških, biohemijskih, virusoloških parametara, kao i histopatološkim pregledom tkiva jetre dobijenog slepom aspiracionom biopsijom. Pored uobičajenih analiza, kod svih naših bolesnika pre terapije određeni su nivoi alfa-feto proteina,

gvožđa, hormona štitaste žlezde, kao i titar autoantitela (ANA, ASMA, AMA, LKM1) u serumu. Kod svih bolesnika urađena je slepa aspiraciona biopsija jetre i određen stepen nekroinflamatorne aktivnosti i stepen fibroze jetre. Ove analize rade se po zahtevu kliničara koji postavlja definitivnu dijagnozu bolesti i kriterijume za uključivanje antivirusne terapije.

Kod bolesnika sa CHC određivana je HCV RNK u serumu pre terapije, posle 12 nedelja i šest meseci posle završetka terapije, s ciljem da se utvrdi efikasnost terapije. Koncentracija virusne RNK određivana je PCR Cobas Amplicor testom⁷.

Genotipizacija HCV rađena je posle amplifikacije nukleinske kiseline virusa komercijalnim testovima.

Bolesnici sa negativnim HCV RNK na kraju terapije definisani su kao responderi, odnosno oni koji su odgovorili na terapiju.

Stabilan virusološki odgovor definisan je kao negativan nalaz HCV RNK kod bolesnika šest meseci posle završene terapije.

Non-responderi su bile osobe kod kojih se mogla dokazati HCV RNK 12 nedelja od početka terapije, što znači da nisu odgovorili na terapiju.

Bolesnici sa relapsom na kraju terapije bili su HCV RNK negativni, ali su postali ponovo HCV RNK pozitivni u periodu od šest meseci posle završene terapije.

Rani virusološki odgovor definisan je kao negativan nalaz HCV RNK 12 nedelja od početka terapije.

U toku terapije praćena je kompletna krvna slika, kao i funkcija jetre.

Bolesnici su lečeni kombinovanom terapijom (PEG INF alfa2 i ribavirin). Doza pegilovanog IFN (180 mg nedeljno, supkutano) kod svih bolesnika u početku terapije bila je ista, a doza ribavirina zavisila je od genotipa HCV. Kod genotipa 1 doza ribavirina iznosila je 1 000 ili 1 200 mg dnevno, zavisno od telesne mase. Kod ostalih bolesnika doza ribavirina bila je 800 mg dnevno, peroralno. Terapija je trajala 48 nedelja kod bolesnika sa genotipom 1 i 4, a 24 nedelje kod onih sa genotipom 3.

Rezultati

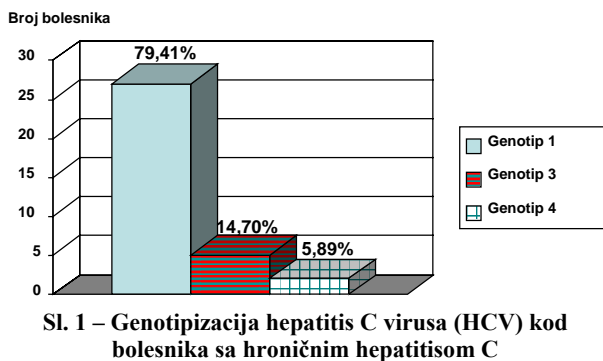
Praćeno je 34 bolesnika sa CHC koji su dobijali kombinovanu antivirusnu terapiju shodno principima ove terapije.

Životno doba naših bolesnika kretalo se od 18 do 65 godina. Svi ispitivani bolesnici ispunjavali su kriterijume za lečenje. Prema polu češće su bili zastupljeni muškarci (n = 22 ; 64,70%), nego žene (n = 12 ; 35,30%).

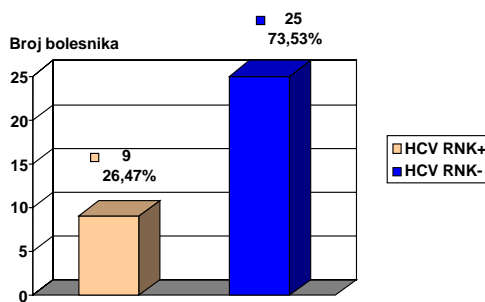
Biopsijom jetre potvrđena je ciroza kod osam od 34 (23,52%) bolesnika.

Zastupljenost genotipova HCV u ispitivanoj grupi bolesnika prikazana je na slici 1. Najčešće je dokazivan genotip 1 (79,41%).

Rani virusološki odgovor (negativan nalaz HCV RNK posle 12 nedelja) postignut je kod 25 ispitivanih bolesnika (73,53%). Bolesnici kod kojih je HCV RNK bila nedetektibilna posle ovog testiranja označeni su kao responderi. Kod devet bolesnika HCV RNK bila je pozitivna posle 12 nedelja od početka terapije (non-responderi) (slika 2).



Sl. 1 – Genotipizacija hepatitisa C virusa (HCV) kod bolesnika sa hroničnim hepatitisom C



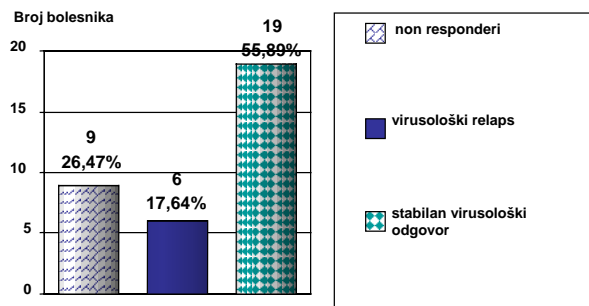
Sl. 2 – Rezultati PCR testa kod bolesnika sa hroničnim hepatitisom C posle 12 nedelja od početka terapije kombinacijom pegilovanog interferona i ribavirina

Efikasnost terapije hepatitisa C pokazuje SVO koji se definiše odsustvom detektabilne HCV RNK u serumu procenjenih na osnovu testa za dokazivanje HCV RNK sa limitom detekcije 50 IU/mL ili manje posle 24 nedelje od kraja terapije. Prema podacima iz literature, kod bolesnika sa genotipom 1 SVO iznosi 40–50%, a sa genotipovima 2 i 3 70–80%⁸.

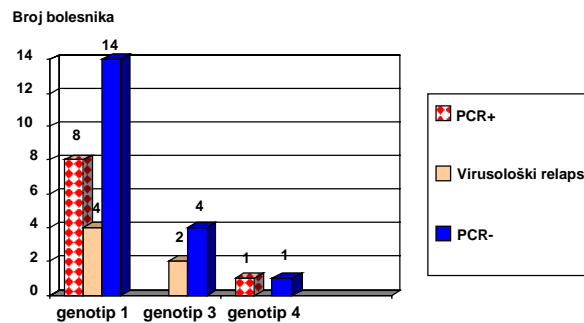
U skladu sa tim kod 19 (55,89%) bolesnika šest meseci posle završetka terapije HCV RNK bila je negativna, što znači da je kod njih postignut SVO.

U našem ispitivanju kod šest bolesnika došlo je do virusološkog relapsa (VR) posle šest meseci od završetka terapije (odnosno bio je pozitivan nalaz HCV RNK). Bolesnici sa virusološkim relapsom pripadali su genotipu 1, izuzev dva koji su bili genotip 3.

Rezultate virusološkog odgovora šest meseci posle prestanka terapije, kao i prisustvo genotipova HCV u odnosu na virusološki odgovor dati su na slikama 3 i 4.



Sl. 3 – Virusološki odgovor kod bolesnika sa hroničnim hepatitisom C šest meseci posle završetka terapije kombinacijom pegilovanog interferona i ribavirina



Sl. 4 – Prisustvo genotipa hepatitisa C virusa (HCV) u odnosu na virusološki odgovor kod bolesnika sa hroničnim hepatitisom C lečenih kombinacijom pegilovanog interferona i ribavirina

Diskusija

Poslednjih godina terapija hroničnog hepatitisa C značajno je poboljšana. Savremena antivirusna kombinovana terapija sa PEG-INF alfa 2 i ribavirinom značajno je efikasnija od ranije monoterapije interferonom alfa2 kod svih bolesnika, uključujući i one koje je teško lečiti, a to su: bolesnici sa CHC uzrokovanim HCV genotipom 1, bolesnici sa cirozom jetre i sa višim koncentracijama virusa^{2,3}.

Pegilovani INF hemijski je modifikovani IFN koji je dobijen kovalentnim vezivanjem polietilen glikola (PEG) na IFN. Na taj način produžava se poluživot IFN u odnosu na standardni IFN, lek je duže aktivan u cirkulaciji, tako da se rede primenjuje (jednom nedeljno)⁴.

Standardna terapija hroničnih hepatitisa C traje 24 nedelje za genotip 2 i 3, i 48 nedelja za genotipove 1 i 4. Bolesnicima sa genotipom 2 i 3 daje se manja doza ribavirina, nego bolesnicima sa genotipom 1 i 4.

Glavni kriterijum za primenu terapije je koncentracija virusne nukleinske kiseline, ali i drugi kriterijumi kao što su: životno doba, koinfekcije sa hepatitis B virusom (HBV), HIV-om, stadijum ciroze jetre, aktivnost transaminaza, prisustvo ekstrahepatičnih manifestacija (krioglobulinemija, glomerulonefritis, vaskulitis).

Lečenjem hroničnog hepatitisa C želi se postići eradicacija virusa hepatitisa C, normalizacija transaminaza, histološko poboljšanje (smanjenje nekroinflamatorne aktivnosti i fibroze), progresija bolesti u cirozu, prevencija dekompenzacije jetre i nastanka hepatocelularnog karcinoma, poboljšanje kvaliteta života i sprečavanje širenja HCV infekcije.

Uspeh terapije zavisi i od faktora vezanih za virus (genotip, koncentracija virusa, osetljivost soja virusa na interferon) kao i od faktora domaćina (pol, životno doba, telesna masa i dr).

Protokoli praćenja uspeha terapije HCV infekcije usklađavaju se u odnosu na antivirusnu terapiju, kao i genotip virusa.

Procena uspeha terapije meri se na osnovu sledećih parametara: virusološkog odgovora (prisustvo HCV RNK u serumu), biohemijskog odgovora (normalizacija aktivnosti ALT), histopatološkog odgovora (smanjenje stepena nekroinflamatorne aktivnosti i fibroze).

Biopsija jetre nije neophodna kod svih bolesnika ni pre, ni posle terapije^{2,6}.

Kod bolesnika na terapiji moguće je već posle 12 nedelja, na osnovu koncentracije virusa u krvi, napraviti prognozu ishoda u odnosu na terapijski odgovor (rani virusološki odgovor). Šanse za izlečenje, odnosno eradikaciju virusa, male su (manje od 2%) kod bolesnika kod kojih nije dokazano smanjenje koncentracije virusa (smanjenje viremije za 2 log tokom prvih 12 nedelja).

Indikator uspeha terapije je negativan nalaz HCV RNA šest meseci nakon završene terapije što se označuje kao stabilan virusološki odgovor. Kod bolesnika kod kojih se ne postigne SVO predlaže se veća doza ili duži period lečenja samim pegilovanim interferonom posle kombinovane terapije.

Našom studijom bila su obuhvaćena 34 bolesnika sa hroničnim hepatitisom C koji su lečeni kombinovanom terapijom. Veća učestalost muškaraca nego žena verovatno je u vezi sa činjenicom da se CHC češće javlja kod muškaraca. Primenjena je kombinovana terapija sa pegilovanim IFN alfa2 i ribavirinom.

Praćenjem terapijskih efekata kombinovane antivirusne terapije kod naših bolesnika dokazan je rani virusološki odgovor (posle 12 nedelja), odnosno negativizacija HCV RNK kod 25 (73,53%) bolesnika.

Za uspešnu terapiju potrebno je postizanje stabilnog virusološkog odgovora (odustvo HCV RNK posle šest meseci od prestanka terapije). Kod naših bolesnika SVO postignut je kod 55,89%. Biohemijski odgovor (normalizacija ALT) postignut je kod 100% ispitivanih bolesnika što je u skladu sa podacima iz literature^{9,10}.

Identifikacija genotipa značajna je za procenu ishoda bolesti kao i uspeha terapije, ali i u epidemiološkim istraživanjima za dokazivanje porekla infekcije, puta i transmisije virusa. Bolesnici sa genotipom 1 imaju slabiji odgovor na terapiju, dok bolesnici sa genotipovima 2 i 3 bolje reaguju na terapiju interferonom.

Za tipizaciju virusa najčešće se koriste komercijalni hibridizacioni testovi na principu „blottinga“, posle predhodno izvedene amplifikacije PCR testom. Ovim testovima mogu se identifikovati najčešći genotipovi: 1, 2, 3, 4, 5, 6¹¹.

U našem ispitivanju genotipizacijom utvrđeno je da 27 (79,41%) bolesnika pripada genotipu 1, pet (14,70%) bolesnika genotipu 3 i 2 (5,89%) bolesnika genotipu 4. U skladu sa ovim nalazom, kod bolesnika sa virusološkim relapsom dokazan je genotip 1 kod četiri bolesnika, dok je kod preostala dva bolesnika dokazan genotip 3.

Prognoza hepatitisa C i uspeh terapije zavisi su od genotipa virusa i koncentracije virusne RNK. Međutim, kod bolesnika sa istim genotipom prognoza je lošija i terapija manje uspešna kod onih koji imaju veću koncentraciju virusa.

Dosadašnja ispitivanja pokazuju da je terapija hronične HCV infekcije efikasna kod manje od 50% bolesnika sa genotipom 1. U određenim ispitivanjima pokazano je da telaprevir, inhibitor proteaze, specifičan za HCV nestrukturnu 3/4 A serin proteazu, znatno redukuje HCV RNK¹².

Postoje brojna istraživanja vezana za efikasnost terapije hepatitisa C. Dokazano je da SVO kod bolesnika sa genotipom 1 iznosi 40–50%, a sa genotipom 2 i 3 oko 70–80%^{8,13–16}.

U novijoj studiji pokazano je da je od 400 lečenih bolesnika sa hroničnim hepatitisom C, 268 (67%) pokazalo odgovor posle terapije i da je kod 202 (50,5%) postignut SVO. Na kraju terapije 66 (16,5%) bolesnika bilo je HCV RNK negativno, ali je kod jednog broja bolesnika došlo do virusološkog relapsa. Na kraju terapije 133 (33%) bolesnika imali su detektibilnu HCV RNK i nisu odgovorili na terapiju. Brzi virusološki odgovor dokazan je kod 186 (46,5%) bolesnika⁹.

Matsura i sar.¹⁰ pomoću dva komercijalna *real-time* PCR testa pratili su bolesnike sa hroničnom HCV infekcijom koji su dobijali kombinovanu terapiju. Od 60 bolesnika sa HCV koji su praćeni, kod 26 (43,3%) dokazan je SVO, 16 (26,7%) bolesnika relapsiralo je, 15 (25%) nije odgovorilo na terapiju, a kod 3 (5%) prekinuta je terapija zbog neželjenih efekata.

Postoje studije o virusološkoj efikasnosti kombinovane terapije i kod bolesnika sa koinfekcijom¹⁷.

Virusni kvazispicijesi mogu biti značajni prediktor virusološkog odgovora u kombinovanoj terapiji kod bolesnika sa hroničnim hepatitisom C. Kompleks kvazispicijesa i rezistentnih sojeva može dovesti do visoke koncentracije virusa za vreme terapije i uticati na efekte težine bolesti.

Evolucija virusnih kvazispicijesa kod bolesnika povećava patogenost HCV.

Od 41 bolesnika na terapiji zbog HCV infekcije, kod 30 je dokazan SVO, a 11 bolesnika nije odgovorilo na terapiju. Kod 21 ispitivanog bolesnika dokazani su kvazispicijesi^{18,19}.

Kod bolesnika bez virusološkog odgovora (non-responder) preporučuje se ponovni tretman ili produženje terapije samo pegilovanim interferonom u manjim dozama.

Pegilovani IFN primenjen u vidu monoterapije ili u kombinaciji sa ribavirinom, u poređenju sa ranijom primenom IFN alfa ili kombinacijom IFN alfa+RBV, bolje se podnosi, lakši je za primenu (samo jedanput nedeljno supkutano), a učestalost neželjenih efekata (depresija i *flu-like* sindroma) je manja.

Zaključak

Određivanja HCV RNK pomoću PCR testa neophodno je za praćenje uspeha terapije, dokazivanje non-respondera na terapiju ili virusološkog relapsa posle terapije.

L I T E R A T U R A

1. Zoulim F, Chevallier M, Maynard M, Trepo C. Clinical consequences of hepatitis C virus infection. *Rev Med Virol*. 2003; 13(1):57-68.
2. Strader DB, Wright T, Thomas DL, Seeff LB. Diagnosis, management, and treatment of hepatitis C. *Hepatology* 2004; 39: 1147-71.

3. *Francesco R, Migliaccio G.* Challenges and successes in developing new therapies for hepatitis C. *Nature* 2005; 436: 953–60.
4. *Feld JJ, Hoofnagle JH.* Mechanism of action of interferon and ribavirin in treatment of hepatitis C. *Nature* 2005; 436: 967–72.
5. *Berg T, von Wagner M, Nasser S, Sarrazin C, Heintges T, Gerlach T, et al.* Extended treatment duration for hepatitis C virus type 1: comparing 48 versus 72 weeks of peginterferon-alfa-2a plus ribavirin. *Gastroenterology* 2006; 130: 1086–97.
6. *Wittöft T.* Review of consensus interferon in the treatment of chronic hepatitis C. *Biologics* 2008; 2(4): 635–43.
7. *Gourlain K, Soulier A, Pellegrin B, Bouvier-Alias M, Hézode C, Dartigny F, et al.* Dynamic range of hepatitis C virus RNA quantification with the Cobas Ampliprep-Cobas Amplicor HCV Monitor v2.0 assay. *J Clin Microbiol* 2005; 43(4): 1669–73.
8. *Chevaliez S, Pawlotsky JM.* Hepatitis C Virus Serologic and Virologic Tests and Clinical Diagnosis of HCV-Related Liver Disease. *Int J Med Sci* 2006; 3: 35–40.
9. *Idrees M, Riazuddin S.* A study of best positive predictors for sustained virologic response to interferon alpha plus ribavirin therapy in naïve chronic hepatitis C patients. *BMC Gastroenterol* 2009; 9: 5.
10. *Matsuura K, Tanaka Y, Hasegawa I, Ohno T, Tokuda H, Kurbanov F, et al.* Abbott RealTime hepatitis C virus (HCV) and Roche Cobas AmpliPrep/Cobas TaqMan HCV assays for prediction of sustained virological response to pegylated interferon and ribavirin in chronic hepatitis C patients. *J Clin Microbiol* 2009; 47(2): 385–9.
11. *Simmonds P, Bukh J, Combet C, Delage G, Enomoto N, Feinstone S, et al.* Consensus proposals for a unified system of nomenclature of hepatitis C virus genotypes. *Hepatology* 2005; 42(4): 962–73.
12. *Reesink HW, Weegink CJ.* New hope for a cure for chronic hepatitis C. *J Hepatol* 2009; 51(4): 835–7.
13. *Zeuzem S.* Heterogeneous virologic response rates to interferon-based therapy in patients with chronic hepatitis C: who responds less well? *Ann Intern Med* 2004; 140: 370–81.
14. *Shiffman ML, Suter F, Bacon BR, Nelson D, Harley H, Solá R, et al.* Peginterferon alfa-2a and ribavirin for 16 or 24 weeks in HCV genotype 2 or 3. *N Engl J Med* 2007; 357(2): 124–34.
15. *Hadziyannis SJ, Sette H Jr, Morgan TR, Balan V, Diago M, Marcelin P, et al.* Peginterferon-alpha2a and ribavirin combination therapy in chronic hepatitis C: a randomized study of treatment duration and ribavirin dose. *Ann Intern Med* 2004; 140(5): 346–55.
16. *Nikolić P, Jemuović Lj, Delić D, Korać M, Boričić I.* Treatment of chronic hepatitis C with interferon alpha – our results. *Acta Infectologica Yugoslavica* 2000; 5: 1–9.
17. *Chung RT, Andersen J, Volberding P, Robbins GK, Liu T, Sberman KE, et al.* Peginterferon Alfa-2a plus ribavirin versus interferon alfa-2a plus ribavirin for chronic hepatitis C in HIV-coinfected persons. *N Engl J Med* 2004; 351(5): 451–9.
18. *Kumar D, Malik A, Asim M, Chakravarti A, Das RH, Kar P.* Influence of quasispecies on virological responses and disease severity in patients with chronic hepatitis C. *World J Gastroenterol* 2008; 14(5): 701–8.
19. *Rothman AL, Morishima C, Bonkovsky HL, Polyak SJ, Ray R, Di Bisceglie AM, et al.* Associations among clinical, immunological, and viral quasispecies measurements in advanced chronic hepatitis C. *Hepatology* 2005; 41(3): 617–25.

Primljen 6. X 2009.
Revidiran 29. XII 2009.
Prihvaćen 21. I 2010.



Učestalost deformiteta stopala kod devojčica predškolskog uzrasta

Frequency of foot deformity in preschool girls

Ilona Mihajlović*, Miroslav Smajić*, Jelena Sente†

*Fakultet sporta i fizičkog vaspitanja, Novi Sad, Srbija; †Klub podvodnih aktivnosti „Sirmium“, Sremska Mitrovica, Srbija

Apstrakt

Uvod/Cilj. Da bi se odredilo tačno vreme nastanka posturalnog poremećaja, bez obzira na njegov uzrok, potrebno je ispitivanje od momenta ulaska dece u novu sredinu, tj. u vrtić ili školu. Cilj ovog rada bio je da se ustanovi odnos pojave deformiteta stopala sa uzrasnih karakteristika devojčica, jer postoje nejasnoće o tome u kom uzrasnom periodu se pojavljuju deformiteti stopala i koje su oni vrste. **Metode.** Istraživanje je izvršeno u predškolskim ustanovama „Radosno detinjstvo“ na teritoriji grada Novog Sada, metodom slučajnog izbora, na uzorku od 272 devojčice uzrasta od četiri do sedam godina, svrstanom u četiri stratuma u odnosu na kalendarsku godinu rođenja. Za utvrđivanje deformiteta stopala korišćena je tehnika merenja putem kompjuterizovane digitalizovane podografije (KDP). **Rezultati.** Utvrđeno je da su u predškolskoj populaciji devojčica deformiteti *pes transversoplanus* i *calcaneo valgi* bili zastupljeni u veoma visokom procentu (preko 90%). Poremećen uzdužni svod stopala tj. ravna stopala utvrđen je, takođe, kod visokog procenta devojčica, ali je utvrđeno i poboljšanje sa godinama života. Naime, postoji statistički značajna povezanost između životnog doba dece i ovog deformiteta (što je dete starije, to je ovaj deformitet ređi). **Zaključak.** Ovim istraživanjem potvrđeno je da se formiranje svodova stopala najverovatnije ne završava od 3. do 4. godine, već traje sve do školskog uzrasta.

Ključne reči:

stopalo, deformacije; deca, predškolska; dijagnoza; medicina, sportska.

Abstract

Background/Aim. In order to determine the moment of creation of postural disorders, regardless of the causes of this problem, it is necessary to examine the moment of entry of children into a new environment, ie. in kindergarten or school. There is a weak evidence about the age period when foot deformity occurs, and the type of these deformities. The aim of this study was to establish the relationship between the occurrence of foot deformities and age characteristics of girls. **Methods.** The research was conducted in preschools „Radosno detinjstvo“ in the region of Novi Sad, using the method of random selection, on the sample of 272 girls, 4–7 years of age, classified into four strata according to the year of birth. To determine the foot deformities measurement technique using computerized digitized pedography (CDP) was applied. **Results.** In preschool population girls *pes transversoplanus* and *calcanei valga* deformities occurred in a very high percentage (over 90%). Disturbed longitudinal instep ie flat feet also appeared in a high percentage, but we noted the improvement of this deformity according to increasing age. Namely, there was a statistically significant correlation between the age and this deformity. As a child grows older, the deformity is lower. **Conclusion.** This study confirmed that the formation of foot arches probably does not end at the age of 3–4 years but lasts until school age.

Key words:

foot deformities; child preschool; diagnosis; sports medicine.

Uvod

Da bi se utvrdio momenat nastanka posturalnog poremećaja, bez obzira na uzrok njegovog nastanka, ovaj problem potrebno je ispitati od momenta ulaska dece u novu sredinu, tj. u vrtić ili školu.

U razvijenim zemljama postoje instituti za preventivni rad sa decom koji su opremljeni savremenim dijagnostičkim instrumentima čiji je zadatak da na vreme otkriju deformitete i izrade terapijske i preventivne programe.

Nažalost, kod nas otežavajuću okolnost predstavlja nedostatak preventivnih centara i savremenih dijagnostičkih aparata, zbog čega nije moguće objektivizirati deformitet na brz i efikasan način. U dijagnostici posturalnog statusa kod dece, između ostalog, neophodno je utvrditi i status stopala.

Stopalo je jedan od najkomplikovanijih anatomskih segmenata organizma. Koštani deo sastoji se od 26 kostiju i 32 zglobova koji obezbeđuju dve važne funkcije stopala: stajanje (statička funkcija) i hodanje (dinamička funkcija)¹.

Pregled stopala vrši se na više načina i primenom različitih metoda. Svakako, najinformativniji je podoskopski pregled putem kompjuterizovane digitalizovane podografije (KDP) koji je i primenjen u ovom istraživanju. Na taj način mogu se uspešno detektovati deformiteti stopala, između ostalih, i ravno stopalo (spušten uzdužni svod stopala). Po definiciji, ravno stopalo je lako prepoznatljiv klinički deformitet određen malpozicijom nekoliko delova stopala. Lukovi – svodovi stopala počinju da se formiraju sa prvim opterećenjem deteta, tj. hodom, i sa tri godine života formiranje bi trebalo da bude završeno. Međutim, ne postoje jasne granice završetka formiranja svoda stopala, kao ni jasne granice između normalnog svoda i deformiteta². Istraživanja su pokazala da se uzdužni svod spontano razvija tokom prve decenije života i da dolazi do njegovog podizanja^{3,4}.

Za nastajanje deformiteta stopala, pored ostalih, odgovorni su nasledni faktori, konstitucija, slabost mišića i ligamenata. Deca koja ranije prohodaju, ona koja su fizički neaktivna i gojazna imaju povećan rizik od nastanka deformiteta stopala⁵.

Cilj ovog istraživanja bio je da se utvrdi vreme nastanka deformiteta stopala kod devojčica, odnosno u kom uzrasnom periodu se pojavljuju deformiteti stopala i koje su oni vrste.

Metode

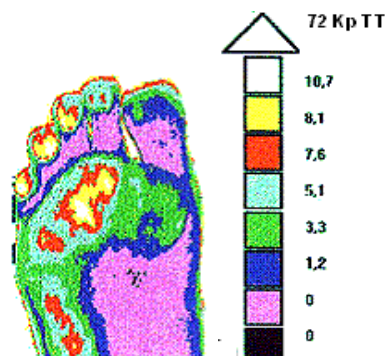
Istraživanje je izvršeno na teritoriji grada Novog Sada u predškolskim ustanovama „Radosno detinjstvo“ koje su odabrane u odnosu na naseljenost, metodom slučajnog izbora. Projekat je predviđao 300 ispitanika, ali su pisanu saglasnost dali roditelji 272 devojčice, i te devojčice bile su uzorak našeg istraživanja. S obzirom na to da se intenzivno formiranje svoda stopala završava oko 4. godine, odabran je uzrast od 4. do 7. godine. Uzrasne grupe dece u predškolskim ustanovama nisu bile podjednako zastupljene po broju, te shodno tome, ni u našem istraživanju.

Istraživanje je odobrio Fakultet sporta i fizičkog vaspitanja Univerziteta u Novom Sadu, uz pisanu saglasnost direktora predškolskih ustanova. Pre sprovođenja istraživanja vaspitačice i roditelji dobili su verbalne i pisane informacije i uputstva.

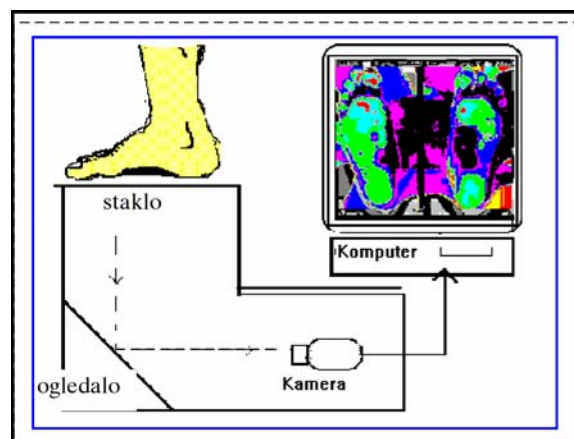
Celokupan uzorak varijabli, u odnosu na utvrđivanje deformiteta, sačinjavali su: spušten poprečni svod (*pestran*), spuštene gležnjevi (*calval*), izdubljeno stopalo (*pes cavus*) i ravno stopalo (*pes planus*), podeljeno u četiri stepena po težini deformiteta, od najlakšeg do najtežeg: *pes planus* 1 (PP1), *pes planus* 2 (PP2), *pes planus* 3 (PP3) i *pes planus* 4 (PP4). Ova četiri stepena deformiteta ravno stopalo nazvana su tip deformiteta. Stopalo bez deformiteta („bez oboljenja“ – BO) činili su rezultati dece koja nisu imala nikakav deformitet stopala, dok su rezultati dece koja nisu imala ravno stopalo (*pes planus*), ali su imala neki drugi od navedenih deformiteta (*pes cavus*, *pes transversoplanus*, *calcaneo valgi*) činili kategoriju „bez PP deformiteta“.

Za utvrđivanje deformiteta stopala korišćena je tehnika merenja putem kompjuterizovane digitalizovane podografije (aparata marke Pedikom), čiji se princip rada zasniva na podografu, sa specijalnim osvetljenim staklom, na koje ispitanik staje, a videodigitalizovana kamera snimi otisak stopala koji se prenosi u kompjuter sa specijalnom softverom koji

prikazuje otisak stopala u odnosu na jačinu pritiska stopala na staklo. Tako se dobije izohromatska mapa (slika 1). Po jačini pritiska određenih delova stopala (u odnosu na tri fiziološke tačke oslonca), kompjuter određuje stepen i vrstu deformiteta (slika 2).



Sl. 1 – Izohromatska mapa



Sl. 2 – Način rada kompjuterizovane digitalizovane podografije

Dobijeni podaci podvrgnuti su statističkoj obradi podataka. Deformiteti imaju svojstvo nominalne i ordinalne skale. Korišćeni su neparametrijski postupci – χ^2 test, Roy-ev test. Podaci su analizirani pomoću MANOVA-e i diskriminativne analize. Na taj način određene su karakteristike svake grupe, homogenost unutar grupa kao i distanca između grupa. Podaci su interpretirani tabelarno i tekstualno.

Rezultati

U tabelama je prikazana brojčana i procentualna zastupljenost procena deformiteta kod devojčica za četiri uzrasta i četiri obeležja: *pes cavus*, *pes transversoplanus*, *calcaneo valgi* i jedno obeležje (*pes planus*) definisano kao „tip deformiteta“ koje su činili PP1, PP2, PP3 i PP4. Ukazano je na značajne razlike između i unutar nivoa. Deskriptivnim postupkom moguće je samo nagovestiti neke karakteristike pojedinih nivoa procena deformiteta, dok se značajnost razlika između uzrasta kasnije analizira.

Pregledom dobijenih rezultata u tabeli 1 konstatovano je da su devojčice od četiri godine grupa sa najmanjom zas-

tupljenošću deformiteta *pes cavus*, tj. bez ovog deformiteta bilo je 90,6% devojčica, dok su devojčice u grupi od šest i sedam godina imale najviše izražen deformitet (21,4% i 18,2%). Kako je $p = 0,305$ (tabela 2) može se reći da χ^2 testom nije utvrđena povezanost između uzrasta i *pes cavus*.

Rezultati u posmatranom obeležju – *pes transversoplanus* (tabela 3) ukazuju na to da su, procentualno, sve grupe devojčica imale ovaj deformitet, od 86,4% kod sedmogodišnjakinja, pa do 96,2% kod najmlađih devojčica, odnosno četvorogodišnjakinja. Ovako visok procenat zastupljenosti deformiteta verovatno je posledica nezavršenog biološkog razvoja.

Kako je $p = 0,451$ (tabela 2) može se zaključiti da metodom χ^2 testa nije utvrđena povezanost između uzrasta i obeležja *pes transversoplanus*.

U tabeli 4 prikazani su rezultati devojčica sa deformitetima i bez deformiteta u odnosu na obeležje – *calcaneo valgi*. Može se konstatovati da su brojčane vrednosti deformiteta bile najmanje izražene kod starijih devojčica, a najučestalije kod najmlađih, tj. četvorogodišnjakinja. Međutim, procentualno iskazane vrednosti bile su jako visoke, od 86,4 do 96,2%, što nas upućuje na zaključak da je ovo obeležje bilo dominantno kod svih uzrasta devojčica.

Kako je $p = 0,386$ (tabela 2) može se konstatovati da χ^2 testom nije utvrđena povezanost između uzrasta i deformiteta *calcaneo valgi*.

U tabeli 5 integralno su prikazana obeležja deformiteta spuštenog uzdužnog svoda stopala. Devojčice od 4 godine načešće su imale PP3 (32,1%). Kod devojčica od pet godina

Tabela 1

Uzrast ispitanika (god)	Devojčice			
	bez deformiteta (n = 228)		sa deformitetom (n = 44)	
	n	%	n	%
4	48,0	90,6	5,0	9,4
5	96,0	85,0	17,0	15,0
6	66,0	78,6	18,0	21,4
7	18,0	81,8	4,0	18,2

Tabela 2

Značajnost razlika između uzrasta devojčica u odnosu na procenu deformiteta				
Obeležja	χ	R	F	p
<i>Pes cavus</i>	0,115	0,116	1,213	0,305
<i>Pes transversoplanus</i>	0,099	0,099	0,887	0,451
<i>Calcaneo valgi</i>	0,106	0,106	1,018	0,386
Tip deformiteta	0,259	0,223	4,637	0,004

Tabela 3

Uzrast ispitanika (god)	Devojčice			
	bez deformiteta (n = 19)		sa deformitetom (n = 253)	
	n	%	n	%
4	2,0	3,8	51,0	96,2
5	7,0	6,2	106,0	93,8
6	7,0	8,3	77,0	91,7
7	3,0	13,6	19,0	86,4

Tabela 4

Uzrast (god)	Devojčice			
	bez deformiteta (n = 20)		sa deformitetom (n = 253)	
	n	%	n	%
4	2,0	3,8	51,0	96,2
5	7,0	6,2	106,0	93,8
6	8,0	9,5	76,0	90,5
7	3,0	13,6	19,0	86,4

Tabela 5

Uzrast (god)	Devojčice sa obeležjem deformiteta											
	bez PP deformiteta		PP1		PP2		PP3		PP4		BO	
	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%
4	5,0	9,4	8,0	15,1	11,0	20,8	17,0	32,1	10,0	18,9	2,0	3,8
5	14,0	12,4	24,0	21,2	28,0	24,8	24,0	21,2	16,0	14,2	7,0	6,2
6	17,0	20,2	13,0	15,5	26,0	31,0	16,0	19,0	5,0	6,0	7,0	8,3
7	4,0	18,2	6,0	27,3	3,0	13,6	5,0	22,7	1,0	4,5	3,0	13,6

PP1, PP2, PP3, PP4 – stepen težine deformiteta „ravno stopalo“; BO – deca bez bilo kojeg deformiteta stopala

učestalost deformiteta PP4 imalo je 14,2%, a PP2 24,8%. Isto tako, deformitet PP2 bio je najizraženiji kod devojčica od šest godina (31%). Najstarije devojčice bile su u grupi ispitanica sa najmanje deformiteta, a izraženi deformitet zastupljen kod njih 27,3% bio je deformitet prvog stepena tj. najblaži deformitet. Kako je $p = 0,004$ χ^2 testa, a vrednost $\chi = 0,259$ (tabela 2), može se reći da postoji povezanost između uzrasta i tipa ovog deformiteta.

Na osnovu sprovedene analize ($F = 1,353$, $p = 0,185$), može se zaključiti da nije dobijena statistički značajna razlika između razmatranih uzrasta devojčica u odnosu na procenu deformiteta.

U tabeli 6 prikazana je definisanost karakteristika deformiteta po stratumima, pa se može konstatovati da u uzrasnoj grupaciji od četiri godine, 27 od 53 devojčice ima definisane karakteristike (homogenost 50,94%), što znači da 26 devojčica ima druge karakteristike, a ne karakteristike svoje grupe. Definisane karakteristike petogodišnjakinja ima 40 od 113 devojčica, homogenost je 35,4% (manja), jer 73 devojčice ima druge karakteristike. U grupaciji devojčica od šest godina najveća je homogenost – 75%, jer 63 od 84 devojčice imaju definisane karakteristike svoje uzrasne grupe. U uzrasnoj grupaciji od sedam godina definisane karakteristike ima sedam od 22 devojčica, te je homogenost u ovoj grupaciji najmanja (31,8%).

Računanjem Mahalanobisove distance između uzrasta devojčica dobija se još jedan pokazatelj sličnosti ili razlika. Mogu se upoređivati distance različitih prostora. Rezultati iz tabele 7 ukazuju na to da je najmanje rastojanje između uzrasta: 5 godina i od 4 godine – 0,27, a najudaljenije za uzrast devojčica: 6 godina i 4 godine – 0,63 (umerena).

Poremećen uzdužni svod stopala (ravna stopala), pojavljuje se, takođe, u visokom procentu, ali i kod ovog deformiteta uočavamo poboljšanje u odnosu na godine života. U ovom slučaju postoji, čak, i statistički značajna povezanost između uzrasta i deformiteta. Ovi rezultati potvrđeni su i od strane drugih autora^{3, 4, 6} koji su zaključili da formiranje fizioloških svodova stopala traje u toku prve decenije života. Znači, što je dete starije, to je pojava deformiteta ređa, što nas upućuje na zaključak da formiranje svodova stopala u ovom uzrastu još nije završeno, te možda i ne možemo govoriti o pojavi deformiteta u svim slučajevima.

Zastupljenost deformiteta spušenog uzdužnog svoda stopala je u odnosu na uzrast dosta heterogena. Logički posmatrano, kod devojčica od četiri godine izraženi su deformiteti koji se svrstavaju u teže oblike, PP3 i PP4. Najblaži oblik (PP1) izražen je kod starijih uzrasnih kategorija, čime ukazujemo na raniju konstataciju da se formiranje svoda stopala ne završava potpuno do treće-četvrtle godine života, već se nastavlja. Zbog toga je u mlađem predškolskom uzrastu izraženiji teži deformitet stopala – PP4 i PP3. U ovom uzrastu verovatno još traje fiziološko formiranje svoda stopala.

Veoma slični rezultati dobijeni su novijim istraživanjem autora na subuzorku predškolskih dečaka, gde je učestalost deformiteta na isti način raspoređena, te je zaključeno da ni kod njih još nije završeno fiziološko formiranje svoda stopala⁷. Visoki procenat spušenog uzdužnog svoda kod mlađih uzrasnih kategorija nađen je i u drugim istraživanjima gde je konstatovano da je taj procenat niži kod starije uzrasne populacije⁸.

Tabela 6
Homogenost uzrasta devojčica u odnosu na procenu deformiteta

Uzrast (god)	m/n	%
4	27/53	50,94
5	40/113	35,40
6	63/84	75,00
7	7/22	31,82

Tabela 7
Distanca (Mahalanobisova) između uzrasta devojčica u odnosu na procenu deformiteta

Uzrast (god)	4 godine	5 godina	6 godina	7 godina
4	0,00	0,61	0,37	0,30
5	0,27	0,00	0,38	0,37
6	0,63	0,38	0,00	0,30
7	0,61	0,37	0,30	0,00

Diskusija

Na osnovu dobijenih podataka može se videti da su u predškolskoj populaciji devojčica *pes transversoplanus* i *calcaneo valgi* deformiteti zastupljeni u veoma visokom procentu (preko 90%). Međutim, može se primetiti da sa povećanjem uzrasta devojčica dolazi i do smanjenja broja ovih deformiteta. Iako nema povezanosti ovih deformiteta sa uzrastom, uočava se blago poboljšanje u starijem predškolskom uzrastu.

Istraživanje posturalnog statusa predškolske i školske dece, koje je sprovedeno na teritoriji beogradske opštine Savski venac u toku 2007/2008. godine, dalo je, takođe, slične rezultate, pa je konstatovano da predškolska deca u mnogo većem procentu imaju izražene deformitete u odnosu na školsku decu, čak 83%, dok se deformiteti stopala pojavljuju kod 35% školske dece⁹. Ispitivanjem statusa stopala školske dece naše populacije utvrđeno je da 33% ispitanika ima deformitet stopala¹⁰.

Zaključak

Na osnovu dobijenih rezultata zaključeno je da je deformitet *pes cavus* najviše izražen kod devojčica starijeg uzrasnog doba (6 i 7 godina). Deformiteti *pes transversoplanus* i *calcaneo valgi* u skoro istom, visokom, procentualnom od-

nosu izraženi su kod svih devojčica. Deformitet „ravna stopala“ povezan je sa uzrastom, tj. što je dete starije to je pojava deformiteta reda, što nas upućuje na zaključak da formiranje svoda stopala doseže čak do školskog uzrasta, pa moramo biti vrlo obazrivi u pristupu deci sa deformitetima u predškolskom uzrastu.

L I T E R A T U R A

1. Jovičić M. Flexible flat foot in children: problem or not? Sport Med 2007; 7(1): 9–13 (Serbian)
2. Mosca VS. Flexible flatfoot and skewfoot. J Bone Joint Surg 1995; 77A: 1937–45.
3. Stabeli LT, Chew DE, Corbett M. The longitudinal arch. A survey of eight hundred and eighty-two feet in normal children and adults. J Bone Joint Surg 1987; 69: 426–8.
4. Taussig G, Pillard D. Pied plat statique de l'enfant In: Dimeglio H, Claustic J Eds. Monographies de podologie. Masson 1987; 8: 136–42.
5. Pfeiffer M, Koty R, Ledl T, Hauser G, Sluga M. Prevalence of flat foot in percolated children. Pediatrics 2006; 118(2): 634–9.
6. Volpon JB. Footprint analysis during the growth period. J Pediatr Orthop 1994; 14: 83–5.
7. Mihajlović I, Tončev I, Hrnjeloec I. Prevalence of flatfoot deformity in boys depending on their age. Acta Kinesiol 2008; 2: 103–6.
8. Forriol F, Pascual J. Footprint analysis between three and seventeen years of age. Foot Ankle 1990; 11: 101–4.
9. Mišković I. Data to arouse the public. [cited 2009 January 22]. Available from: www.roditeljportal.com/vest/opste/podaci-za-opstu-uzbunu.htm (Serbian)
10. Bokan B, Borković S. Frequency of foot deformity in school children. Timočki medicinski glasnik 2006; 31(1): 21–30. (Serbian)

Primljen 28. X 2009.
Revidiran 8. XII 2009.
Prihvaćen 3. II 2010.



Agroterorizam kao aktuelni izazov

Agroterrorism as a current challenge

Vladan Radosavljević^{**‡}, Ksenija Stojković[‡], Radivoje Anđelković^{**‡},
Marko Andrejić[‡]

Ministarstvo odbrane, *Uprava za vojno zdravstvo, †Vojni zavod za preventivnu medicinu,

[‡]Vojna akademija, Beograd, Srbija

Ključne reči:

bioterrorizam; poljoprivreda; herbicidi; zoonoze.

Key words:

bioterrorism; agriculture; herbicides; zoonoses.

Uvod

Agroterorizam se može definisati kao oblik bioterorizma^{1,2}, koji namernom indukcijom bolesti biljaka ili životinja ima za ciljeve stvaranje ekonomskih gubitaka, straha i narušavanje unutrašnje stabilnosti napadnute zemlje³⁻⁸. Podrazumeva namerno ili preteće korišćenje virusa, bakterija, gljivica ili toksina živih organizama (prirodnih ili genetski modifikovanih) u svrhu izazivanja smrti ili oboljenja životinja ili biljaka⁹. U širem smislu, sredstva za izvođenje agroterorističkih napada mogu biti hemijska sredstva ili bilo koji namerno izazvani uticaj koji ugrožava poljoprivrednu proizvodnju. Kao oružje agroterorizma pominje se i mogućnost kontrolisanog uticaja na klimatske promene, odnosno na atmosferske prilike koje su posebno značajne u pojedinim fazama razvoja biljnih kultura (klijanje, cvetanje, zrenje itd.). Ovakav oblik agroterorizma mogu primenjivati samo ekonomski i tehnološki razvijene države (neke se u javnosti predstavljaju kao zakleti borci protiv bilo kog oblika terorizma)^{10,11}.

Ciljevi agroterorizma

Poljoprivredna proizvodnja koja zadovoljava potrebe države za sirovinama i proizvodima biljnog i životinjskog porekla garancija je mira i prosperiteta. Stoga, poljoprivreda čini kritičnu tačku nacionalne bezbednosti. Suočavanjem javnosti sa realnošću asimetričnog ratovanja i globalnog terorizma, nove mete i ranjiva mesta treba tražiti sa šireg gledišta u odnosu na kritične delove nacionalne infrastrukture. Povećanje nacije u vlast može biti narušeno ukoliko državni organi nisu u stanju da preveniraju jedan takav napad, odnosno da zaštite snabdevanje populacije hranom³.

Ciljevi agroterorizma su dvojak: direktni (biljke, životinje) i indirektni (ekonomski gubici, strah, politička nestabilnost)

bilnost)^{4-8,12}. Kada se izvrši agroteroristički napad na domaće životinje, napadnuta zemlja mora sprovesti mere karantina i masovnih klanja i spaljivanja zaražene stoke. Sve se odvija pod budnim okom televizije, što zajedno sa ogromnim finansijskim gubitkom zbog međunarodnog embarga, predstavlja upravo ono što teroristi žele da vide.

Komponente agroterorizma

Izvršioци

Nosioci agroterorističkih dejstava mogu biti pojedinci, terorističke grupe (političke organizacije, udruženja zasnovana na rasnoj, verskoj ili nekoj drugoj osnovi) i pojedine države ili vojni savezi¹³. S obzirom na to da se u agroterorizmu prvenstveno radi o uništavanju biljaka i životinja, etička barijera za jedan takav napad mnogo se lakše prelazi nego da su u pitanju masovne ljudske žrtve. Irak je bio poznat po postrojenju za proizvodnju žitne gari kao biološkog oružja 1985. i 1988. godine. Žitna gar može da uništi kompletan prinos i izazove ekonomsku katastrofu¹⁴.

Agensi

Posebnu pogodnost teroristima predstavlja činjenica da za proizvodnju velikog broja bioloških agenasa nije potrebna posebno sofisticirana oprema kao za neke vrste oružja za masovno uništenje (npr. atomska bomba), a da su efekti koje proizvode po razmerama slični ili čak i veći¹⁵⁻¹⁸. Na primer, 100 kilograma spora antraksa rasejano iznad Vašingtona¹⁹, uz povoljne uslove, ubilo bi isti ili čak veći broj ljudi nego hidrogenska bomba. U odnosu na hemijsko oružje biološki agensi mnogo su potentniji, jer se toksična doza bioloških agenasa meri u pikogramima (10^{-12} g), a kod hemijskih agenasa u mikrogramima (10^{-6} g)²⁰.

Uzročnici zoonoza za koje je poznato da su uzgajani i testirani kao biološko oružje su *B. anthracis* (antraks), *Y. pe-*

stis (bubonska kuga), *Brucella abortus* (bruceloza), *F. tularensis* (tularemija), *Cl. botulinum* (botulizam), *Cox. burnetii* (Q-groznica), *Burkholderia spp.*, *Fusarium spp.*, *Morbillivirus spp.*, *Staphylococcus spp.*, venecuelanski virus encefalomijelitisa konja kod i nekoliko virusa izazivača hemoragijskih groznica (Ebola, Marburg, Lassa, Rift Valley). Uzročnici antropozoonoza (kuge, tularemije i antraksa) i kultivisani uzročnici bolesti životinja (slinavke i šapa, bruceloze i govede kuge) ozbiljna su pretnja za domaće i divlje životinje, kao i za ugrožene vrste. Naročito su opasni virusi bolesti Njukasla, ptičjeg gripa, afričkih svinja, afričkih konja. Danas poznajemo i prepoznajemo pet puta više uzročnika alimentarnih intoksikacija i toksiinfekcija, nego pre pola veka, koji su sposobni da prežive uobičajene postupke procesuiranja hrane kao što su povišena temperatura i kiselost²¹.

Virus slinavke i šapa najinfektivniji je poznati virus. Njegova infektivnost je 20 puta veća od virusa malih boginja, otporan je i preživljava u kostnoj srži leševa životinja mesecima. Australijska studija iz 1995. godine dokazala je prisustvo virusa u formi aerosola na vuni ovaca i posle 48 dana, na temperaturi od +4° C. Virus se može lako proizvoditi i širiti sa minimumom tehnoloških zahteva. Životinja koja je preležala bolest ili je vakcinisana, pa potom zaražena virusom, može dugo nositi virus u grlu i biti izvor zaraze za druge životinje. Ako se ne otkrije, virus slinavke i šapa može se proširiti na sve raspoložive životinje širom zemlje. Postoji sedam različitih tipova virusa slinavke i šapa i oko 70 podtipova, a vakcina protiv jednog tipa ne štiti protiv drugog tipa²².

Iako se u literaturi kao biološki agensi pogodni za agroteorističke napade u stočarskoj proizvodnji najčešće navode bolesti sa A i B liste OIE (*Office International des Epizooties*), teroristima je pored njih na raspolaganju veliki broj retkih ili egzotičnih oboljenja čija detekcija i identifikacija predstavlja poseban problem. Sličan je slučaj i sa izazivačima oboljenja biljaka. Kontrolisanje osobina živih bića putem genetskog inženjeringa otvara Pandorinu kutiju mogućnosti za zloupotrebe i primenu ovih znanja u agroteorizmu. Ovaj oblik terorističkih pretnji verovatniji je od strane krupnijih i bogatijih terorističkih organizacija ili država nego od terorističkih grupa trećeg sveta, jer takva istraživanja i njihov razvoj traže ogromna ulaganja u opremu i kadar sa usko specijalizovanim znanjima. Genetskim inženjeringom moguće je proizvesti uzročnike raznih bolesti koji su otporniji prema poznatim sredstvima za lečenje ili imaju veću virulenciju. Činjenica da su mnoge štetočine ili bolesti iskorenjene u zemlji može značiti da veterinari ili naučnici imaju malo ličnog iskustva sa ovim bolestima. To može dovesti do zakasnelog prepoznavanja simptoma u slučaju njihove pojave. Broj smrtonosnih zaraznih bioloških agenasa mnogo je veći za biljke i životinje nego za ljude. Mnogi od tih agenasa su otporni na uslove spoljne sredine, endemski su i nisu patogeni za ljude, što olakšava teroristima nabavku, rukovanje i distribuciju patogena.

Medijumi i sredstva za rasejavanje

Neki biološki agensi²³ mogu se bez posebnih problema preneti na velika rastojanja. Dobar primer je bolest papkara, slinavka i šap, koja se može širiti vetrom u obliku aerosola na velike razdaljine. To se desilo 1981. godine kada su se tri

dana posle izbijanja epizootije u Engleskoj i Francuskoj javili slučajevi oboljevanja stoke na ostrvu Vajt (Wight) udaljenom 175 milja.

Za vreme ratova i civilnih konflikata dolazi do urušavanja sistema zdravstva i veterinarstva što rezultira pojavom epidemija zaraznih bolesti među ljudima, kao i među domaćim i divljim životinjama. Iransko-irački rat i Zalivski rat ubrzali su pojavu govede kuge kod domaćih životinja u regionu, verovatno uzrokovanu ili ubranu izmeštanjem pastira i njihovih stada. Prekid rada državne veterinarske službe tokom rodezijsko-zimbabveanskog rata verovatno je doveo do pojave oboljevanja od antraksa i besnila među domaćim i divljim životinjama u Zimbabveu. Mortalitet od antraksa među ljudima i domaćim životinjama dostigao je epidemijske razmere 1979–1980. godine i nastavio sa rastom još četiri godine posle rata. Oboljevanje od antraksa pojavilo se u šest od osam provincija u Zimbabveu sa preko 10 000 zabeleženih slučajeva oboljevanja ljudi pre nego što je oboljevanje zaustavljeno 1987. godine.

Ljudi mogu biti ugroženi i sa aspekta bezbednosti hrane ili direktnog narušavanja zdravstvenog stanja ukoliko se zloupotrebe bolesti koje se prenose na ljude (zoonoze)²⁴.

Intenzivan saobraćaj i trgovina olakšavaju rasejanje vektora, infektivnog materijala i obolelih (zaraženih) u udaljene krajeve planete. Kada su komunikacije brze i mnogobrojne, jedinke udaljene u prostoru mogu se inficirati kao i jedinke koje su fizički blizu. Jake kiše mogu dovesti do spiranja zemljišta sa poljoprivrednih polja zajedno sa đubretom, izlivanja septičkih jama i toksičnih deponija i tako dovesti do diseminacije patogena (kao što su *Cryptosporidium parvum* i *Giardia lamblia*). Aktivnosti vezane za hidrogradnju (izgradnja brana i irigacionih sistema) olakšavaju prenos vektorskih bolesti. Mogu uticati i direktno (leptospiroza) i indirektno na pojavu bolesti dovodeći do porasta populacije komaraca. Smanjivanjem staništa prilikom krčenja šuma smanjuje se i biodiverzitet, a povećava rizik oboljevanja u bioarealu zbog povećane gustine rezervoara (izvora) i vektora bolesti (tabela 1).

Snabdevanje namirnicama u razvijenim zemljama karakteriše centralizovana proizvodnja i široka distribucija. Namerno zaražavanje namirnica može uzrokovati epidemiju bolesti sa velikim brojem obolelih na velikom području. U zavisnosti od uzročnika i vrste hrane koja je kontaminirana epidemija se može javiti u obliku sporog porasta sporadičnih, raštrkanih slučajeva oboljevanja bez karakterističnih simptoma bolesti ili kao eksplozivna epidemija sa iznenadnom pojavom velikog broja obolelih. Priprema protiv bioterorističkog akta uperenog na snabdevanje hranom iziskuje stabilnu i jaku infrastrukturu javnog zdravstva, pojačan nadzor nad bolestima, promptnu i tačnu laboratorijsku dijagnostiku, brzo javljanje i istraživanje bolesti, kao i razvijanje bolničkih kapaciteta za odgovor na takvu katastrofu sa eventualno velikim brojem obolelih²⁵.

Biološko oružje i prirodno nastale epidemije najbrže se šire putem aerosola. Poslednja velika epizootija slinavke i šapa u Velikoj Britaniji posledica je atmosferskih prilika koje su pogodovale širenju uzročnika putem vetra. U februaru 2001. godine u Northumberland-u sa farme svinja bolest se

Tabela 1

Promene životne sredine nastale ljudskom aktivnošću koje pogoduju bioterorističkim udarima		
Promene prirodne sredine	Opis promene	Bolest
Intenziviranje poljoprivrede	Promena načina gajenje žita i stoke, đubrenje, pojačan kontakt ljudi i domaćih životinja	Ptičji grip, bruceloza, psitakoza, kju groznica, salmoneloza, antraks, infekcija nipah virusom, svinjski grip
De(re)forestacija	Seča šuma, požari, erozija, pošumljavanje	Hemoragične groznice prenosive krpeljima, encefalitis prenosivi krpeljima, hemoragične groznice izazvane hanta virusima (prenosive glodarima)
Hydrogradnja	Izgradnja brana i irigacija sa sledstvenim promenama vodotokova	Infektivna žutica, infekcije vibrionima, šigelom, norovirusima, kriptosporidijama

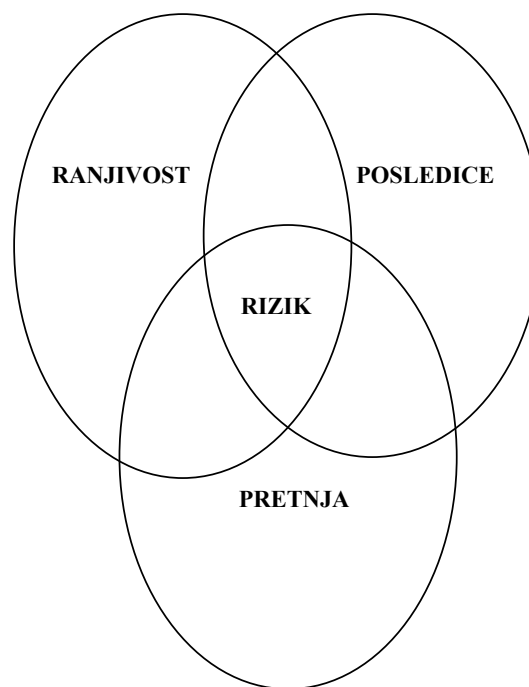
proširila putem transporta životinja i putem vetra u epizootiju koja je zahvatila Irsku i kontinentalnu Evropu. Zaražena životinja može preneti slinavku i šap već osam sati nakon zaražavanja. Bolest se može preneti i preko predmeta. Takođe, moguće je da obuća i vozila prenose virus. Bilo koji uređaj, od spreja do automobila i obuće pešaka može neupadljivo preneti virus i izazvati epizootiju. Velika gustina smeštaja životinja na farmama (centralizovana proizvodnja u razvijenim zemljama) može znatno olakšati širenje bolesti²⁶.

Mete u agroterorizmu

Agroterorizmu su podložne sve zemlje bez obzira na stepen razvoja. Razvijene zemlje kao i zemlje u razvoju imaju neke zajedničke predispozicije koje ih čine atraktivnim metama za agroterorističke napade: povećanje broja terorističkih grupa kojima su ciljevi razvijene zemlje kao i zemlje u razvoju; zavisnost ekonomija velikog broja zemalja od uvoza i izvoza poljoprivrednih proizvoda; poljoprivredna proizvodnja zauzima velike površine zemljišta. Zemlje u razvoju dodatno su ugrožene zbog malih kapaciteta za praćenje potencijalnih poljoprivrednih štetočina i bolesti (male sposobnosti ekspertske procene rizika i donošenja odluka, niskog nivoa bezbednosnih mera i loše ekonomske situacije).

Za procenu rizika od agroterorističkih napada može se koristiti TCV analiza (*threat, vulnerability and consequence*: pretnja, ranjivost i posledica). Međusoban odnos ova tri faktora u odnosu na rizik od agroterorističkih napada šematski je dat na slici 1. Potpuna analiza rizika od agroterorističkih napada na jednu zemlju mora uzeti u obzir sva tri faktora kao i njihov međusoban odnos. Na slici 2 prikazane su podkategorije faktora pretnje, ranjivosti i posledica prilikom analize rizika od agroterorizma²⁷.

Poljoprivreda ima nekoliko karakteristika koje postavljaju jedinstvene probleme za prevenciju agroterorizma². Geografski je difuzna i u neobezbeđenom okruženju (polja i pašnjaci širom zemlje). Neke domaće životinje moguće je gajiti u obezbeđenim objektima, ali poljoprivreda, generalno, traži velika prostranstva koja je teško obezbediti od napadača što je čini „mekom metom“ ili „lakim ciljem“ („soft target“). Domaće životinje često su koncentrisane u zatvorenim objektima, kao što su hranilišta sa hiljadama komada stoke u otvorenim oborima, farme sa desetinama hiljada svinja ili živinarnici sa stotinama hiljada pilića. Koncentrisanje prilikom klanja, obrade i distribucije daje velike mogućnosti za enormnu kontaminaciju. Živa stoka, žitarice i prerađena hrana rutinski se transportuju i ukrštaju tokom procesa proizvodnje

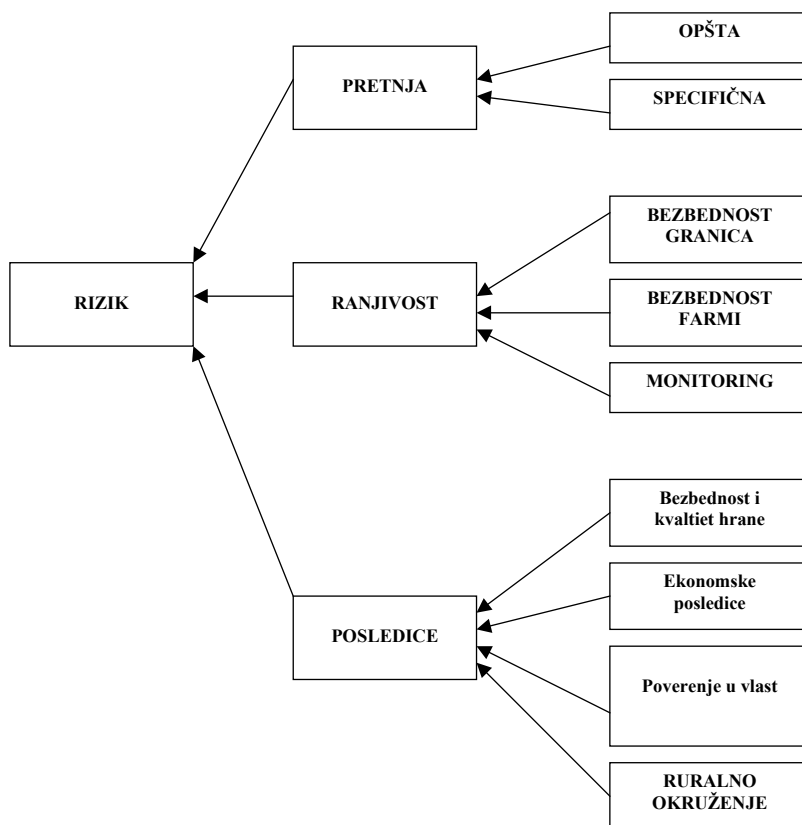


Sl. 1 – Međusoban odnos pretnje, ranjivosti i posledica kao faktora u proceni rizika od agroterorističkih napada (modifikovana šema po Linacre-u i sar.²⁷)

i prerade. Ovi činioци narušavaju prirodne barijere koje imaju za cilj da uspore diseminaciju patogena. Čak i samo prisustvo ili glasina o prisustvu pojedinih štetočina ili bolesti u zemlji može brzo da prekine svaki izvoz prehrambene robe, a povratak na prethodno stanje može trajati mesecima ili godinama. Reakcije javnosti na agroteroristički napad mogu dodatno povećati ekonomski gubitak bojkotom poljoprivrednih proizvoda.

Pouke iz prošlosti

Tokom istorije, epizootije stoke dovodile su do gladi stanovništva. Istorijski gledano, agroterorizam dugo postoji, ali za njegovo pouzdano dokazivanje tek su se u novije vreme stekli svi potrebni uslovi. Najvažniji uslov je razvoj naučnih disciplina (npr. mikrobiologija i toksikologija) koje omogućavaju brzu detekciju, identifikaciju i kvantifikaciju agenasa koji se koriste u agroterorizmu. Kao jasni primeri agroterorizma navode se slučajevi zaražavanja konja antraksom i sakagijom u vojskama SAD, Francuske i Rumunije od



Sl. 2 – Podkategorije faktora pretnje, ranjivosti i posledica u proceni rizika od agroterorističkih napada (modifikovana šema po Linacre-u i sar.²⁷⁾

strane Nemaca tokom 1. svetskog rata, korišćenje buva zaraženih uzročnicima kuge u Mandžuriji tokom 2. svetskog rata od strane Japana. Za vreme Drugog svetskog rata u Japanu je istraživanje vršeno primarno u vezi biološkog oružja koje bi izazivalo obolevanja ljudi, ali i obolevanje žitarica. Japanci su istraživali gljivice, bakterije i parazite kao agense koji napadaju žitarice i povrće, naročito u Mandžuriji i Sibiru.

Posle Drugog svetskog rata SAD, SSSR, Velika Britanija i Kanada nastavile su sa razvojem biološkog oružja. Između 1951. i 1969. godine SAD su imale zalihe tri vrste žitnog patogena: trulež stabla pšenice (36000 kg), trulež stabla raži i palež pirinča (900 kg). Godine 1969. SAD su opozvale svoj program biološkog oružja i nastavile istraživanja u odbrambene svrhe. Sve četiri zemlje su potpisale i ratifikovale Konvenciju o biološkom oružju 1972. godine koja zabranjuje nabavku i upotrebu biološkog oružja. Tokom 1975. godine SAD su „zvanično” uništile preostale zalihe biološkog oružja. Sovjetski Savez nastavio je sa razvojem biološkog oružja. U okviru ministarstva poljoprivrede postojala je grana koja se bavila razvojem antiagrarnih agenasa, od kojih su najpoznatiji: rđa pšenice, palež pirinča i palež raži, a od antianimalnih agenasa istraživali su i proizvodili: groznicu afričkih svinja, govedu kugu i slinavku i šap²⁸. Korišćenje defolijanata (žute kiše) u Vijetnamu od strane vojske SAD, pored efekata na vegetaciju, imalo je i teške posledice na ljude i životinje²⁴. U cilju uništavanja izraelske poljoprivrede, palestinski teroristi su 1979. godine zatrovali izraelske pomorandže²³.

U Kanadi je epizootija slinavke i šapa od 1951. do 1953. godine ubila 2000 životinja, čime je pričinjena šteta od oko dva miliona dolara. Cena stoke je pala, trgovina stokom smanjena, uveden je međunarodni embargo, tako da je ukupna šteta procenjena na dve milijarde dolara. U Italiji je 1993. godine epizootija slinavke i šapa, zbog pada trgovine, izazvala ekonomske gubitke koji su deset puta premašivali cenu same eradikacije. Na Tajvanu je 1996. godine epizootija slinavke i šapa kod svinja rezultirala uništavanjem četiri miliona jedinki, a gubici u industriji povezanoj sa gajenjem svinja dostigli su 7 milijardi dolara. Godine 2001. izbila je epizootija slinavke i šapa u Velikoj Britaniji i tom prilikom borba sa bolešću trajala je šest meseci, koštala 25 milijardi američkih dolara i završila tek kada je 11 miliona životinja pobijeno na teritoriji veličine američke države Oregon. Pretpostavlja se da je epizootija nastala tako što su svinje hranjene otpacima iz kineskog restorana koji su sadržavali parčiće mesa zaražene virusom. Uzgajivač svinja nije kuvao otpatke kako bi uništio virus, a nije ni prijavio obolele i uginule životinje, čime je prekršio Zakon o dobrom postupanju prema životinjama²⁹. Direktni troškovi suzbijanja epizootije slinavke i šapa iz 2001. bili su daleko manji od indirektnih troškova nastalih u neagrarnom sektoru. Gubici od turizma zbog zabrane putovanja u ugrožene delove procenjeni su na 350 miliona dolara nedeljno, tj. 25 puta bili su veći od troškova u agrarnom sektoru koji su iznosili 14 miliona dolara nedeljno. Histerija oko slinavke i šapa, intenzivno prikazivanje klanja i spaljivanja životinjskih leševa (TV faktor) ozbiljno su uzdrmali industriju Velike Britanije.

Srbija ima status zemlje u kojoj su slinavka i šap iskorenjeni. Tokom 1996. godine, na teritoriji Kosova preduzete su mere radi sprečavanja unosa ove bolesti na teritoriju tadašnje SR Jugoslavije, nakon njenog pojavljivanja na teritoriji Republike Makedonije i Republike Bugarske. Da je došlo do unosa bolesti kroz pojas punktova, sledeća mogućnost za zaustavljanje širenja bolesti bila bi duž reka Save i Dunava. Prilikom sanacije na prostoru Kosova uništeno je oko četiri hiljade grla stoke. Na teritoriji Srbije nijedan slučaj nije zvanično potvrđen od strane nadležne evropske laboratorije. Na primeru iz 1996. godine može se videti koje bi se mere preduzele u slučaju izbijanja epizootije ove bolesti i kako bi se vršila dekontaminacija ljudi i vozila koji dolaze iz ugroženih područja.

Neposredni realizatori ovih aktivnosti bili su organi veterinarske i sanitetske službe. Jedinice atomsko-biološko-hemijske odbrane (ABHO) bile su angažovane na poslovima uklanjanja posledica (dekontaminacija objekata, zemljišta i komunikacijskih pravaca). Osnovna metoda koja je primenjena bila je polivanje odgovarajućim rastvorom.

Dekontaminacija vozila i tehničkih sredstava obavljala se iz automobila-cisterne za dekontaminaciju i angažovanjem odeljenja ABHO za dekontaminaciju. Odeljenje ABHO za dekontaminaciju bilo je sastava od 4 do 12 ljudi, u zavisnosti od mesta angažovanja, uslova smeštaja, ishrane i načina izvršenja zadatka (dekontaminacije puta, motornih vozila ili ljudi). Pojedina odeljenja ABHO bila su izdvojena i imala su zadatke da pored izvršenja namenskog zadatka brinu i o smeštaju i ishrani ostalih angažovanih organa. Vršena je dekontaminacija svih zaprežnih, putničkih, terenskih i teretnih vozila prskanjem guma i donjeg postroja vozila (kod autobusa i unutrašnjost). Dekontaminacija vozila vršila se na posebnim podlogama od sundera natopljenim rastvorom hidrokisida (prostor za dekontaminaciju vozila). Prilikom dekontaminacije ljudstvo se nalazilo u zaštitnoj opremi (zaštitni kombinezon, zaštitna maska, zaštitne rukavice, zaštitne cizme), a komandir kod vozila koristio je zaštitne rukavice, keclju i masku.

Materije koje su se koristile za biološku dekontaminaciju slinavke i šapa bile su: natrijum hidroksid (NaOH) i limunska kiselina $[(H_2OCCH_2)_2COHCO_2H \cdot H_2O]$. Natrijum hidroksid upotrebljavao se kao 2% rastvor zagrejan na oko 50° C, a limunska kiselina kao 2,5% rastvor. Rastvorom natrijum hidroksida vršila se dekontaminacija polivanjem ili prskanjem komunikacija, objekata i motornih vozila. Limunska kiselina koristila se za dekontaminaciju ljudi (ruku i donova obuće) na prostoru za dekontaminaciju ljudi u okviru dekontaminacione stanice. Pomenute materije vrlo su efikasne u uništavanju virusa, a primenjuju se u gore pomenutim procentnim rastvorima koji osiguravaju potpunu i uspešnu dekontaminaciju. Ljudstvo koje je došlo u neposredni kontakt sa obolelim životinjama bilo je podvrgnuto sanitetskoj obradi (pregledu od strane lekara-specijaliste) i pojačanom zdravstvenom nadzoru od oko 20 dana.

Dekontaminacija zemljišta i objekata vršila se prskanjem tečnim rastvorom korišćenjem cisterne za dekontaminaciju. Organizacija rada u potpunosti se sprovodila kao za hemijsku dekontaminaciju. Objekti su polivani spolja i iznutra, a tvrde površine polivane su korišćenjem creva. Mesta na

kojima je uništavana stoka polivana su dva puta (sa pauzom od 10 minuta) upotrebom većih količina rastvora. Celokupna organizacija, planiranje i metode birane su i realizovane koordinirano sa organima veterinarske i sanitetske službe.

Na komunikacijskim pravcima na ugroženim područjima i delom u unutrašnjosti razvijane su dekontaminacione stanice (odnosno dezinfekcioni punktovi u sanitetskoj terminologiji). U zoni odgovornosti tadašnje 2. Armije, a prema granici sa Crnom Gorom organizovano je osam punktova koji su radili u vremenu od 4.7.1996. godine do 9.9.1996. godine. Za vreme ovog angažovanja dekontaminirano je 256 416 motornih vozila, 1,35 km komunikacija, a broj ljudi koji su dekontaminirali ruke i obuču nije tačno utvrđen. Angažovanje bataljona ABHO iz sastava 3. Armije, u zoni prema R. Makedoniji otpočelo je 4. jula, a završilo 5. septembra 1996. godine sa težištem na graničnim prelazima i teritoriji Kosova. Kontrolni punktovi bili su postavljeni na graničnim prelazima Cakanovac-Čukarka i Prohor Pčinjski i na glavnim komunikacijama sa Kosova, i to: na putu Bujanovac-Gnjilane, na putu Preševo-Gnjilane i jedan punkt u širem rejonu Gnjilane-Priština. Posebno intenzivan rad odvijao se na graničnim prelazima prema Republici Makedoniji (kod Preševa i Kačanika) i u unutrašnjosti (na putu Gnjilane-Bujanovac i Podujevo-Kuršumljija). Dnevno je na ovim punktovima bilo i po više stotina vozila. U toku dvomesečnog angažovanja na ovom zadatku izvršena je dezinfekcija oko 100 000 motornih vozila. Angažovanje ABHO sastava, na istim zadacima, na graničnim prelazima prema R. Bugarskoj otpočelo je 31. oktobra, a završilo se 30. decembra 1996. godine nakon pojave slinavke i šapa u pograničnim delovima Bugarske prema Turskoj. Postavljena su dva punkta: „Gradina” i „Vrška Čuka”. Punkt „Vrška Čuka” posle deset dana zatvoren je zbog malog broja vozila (300 vozila za taj period) koja su tim prelazom ulazila u Srbiju i nerentabilnosti korišćenja snaga i sredstava. Punkt „Gradina” funkcionisao je veoma uspešno i izvršena je dezinfekcija preko 16 000 motornih vozila i putnika. Rad ekipe iz sastava ovog bataljona na tom punktu prestao je zbog niskih temperatura i velikih snežnih padavina koje su otežavale funkcionisanje uređaja. Karta Kosova sa rasporedom punktova data je na slici 3.

Iako je deklarativno većina najjačih država sveta prekinula razvoj i proizvodnju biološkog oružja, ipak postoji velika verovatnoća da su pod parolom priprema za odbranu od biološkog oružja nastavili istraživanje i razvoj ovog oružja.

Prevenција agroterrorizma

Odbrana od agroterrorizma može se podeliti na pet nivoa²⁸. Prvi nivo odbrane je sam organizam sa svojom otpornošću prema bolestima. Širi nivo odbrane je farma odnosno prostor na kome se uzgajaju biljke ili životinje i na kome se sprovode mere za prevenciju širenja bolesti. Sledeći nivo odbrane je sektor poljoprivredne proizvodnje koji propisuje procedure detekcije i preduzimanja mera u slučaju pojave bolesti. Nacionalni ili državni nivo odbrane obuhvata mere koje minimizuju socijalne i ekonomske troškove pojave bolesti. Peti nivo odbrane je globalni, tj. međunarodni nivo jer je to globalna pretnja.



Sl. 3 – Puntovi razvijeni radi sprečavanja širenja bolesti slinavke i šapa, na Kosovu, 1996. godine

Na osnovu procenjenih potreba usmerava se razvoj potencijala nacionalne logistike (specijalističke laboratorije i oprema) za ranu detekciju i identifikaciju agrotorističkih napada. Sistem javljanja i obaveštavanja mora da povezuje sve elemente sistema i da pravovremeno obezbedi informacije o mogućem agrotorističkom napadu³⁰⁻³⁴. Svi elementi sistema na osnovu propisanih mera i obaveza pripremaju protokole i postupke koji olakšavaju donošenje odluka i postupanje u slučaju agrotorističkih napada. Nakon detekcije i identifikacije agensa koji je korišćen za napad, svaki element sistema pokreće propisane mere i postupke predviđene za taj tip agensa. Prvo se obezbeđuje ugrožena lokacija u smislu zabrane kretanja, formiraju se bezbednosne zone (zaraženo i ugroženo područje) i preduzimaju propisane biosigurnosne i druge mere^{30,31}. U slučaju da se radi o naročito opasnim zaraznim bolestima biljaka ili životinja najčešće se preduzima njihovo uništavanje („stamping out”) i neškodljivo uklanjanje^{27,31}.

Oblast zdravstvene zaštite životinja i biljaka kod nas regulisana je odgovarajućom zakonskom regulativom^{31,35}. Propisane su mere i postupci koji se primenjuju za spreča-

vanje pojave i širenja zaraznih bolesti biljaka i životinja^{31,35}. Kontrolom, prilikom uvoza i prevoza biljaka i životinja preko naše teritorije, kao i praćenjem zdravstvene ispravnosti proizvoda biljnog i životinjskog porekla bave se nadležne republičke inspekcije (sanitarna, veterinarsko-sanitarna i fitosanitarna), specijalističke i naučno-obrazovne ustanove^{30,31,34}. Sve informacije od značaja za zdravstveno stanje biljaka i životinja i zdravstvene ispravnosti proizvoda biljnog i životinjskog porekla dostavljaju se Ministarstvu poljoprivrede, šumarstva i vodoprivrede i Ministarstvu zdravlja Republike Srbije, a ova ministarstva nadležna su da u slučaju agrotorističkog napada propišu, organizuju i angažuju sve elemente sistema na sprovođenju preventivnih i protivepidemijskih mera, kao i otklanjanju posledica napada.

Zaključak

Poljoprivredna proizvodnja koja zadovoljava potrebe države za sirovinama i proizvodima biljnog i životinjskog porekla garancija je mira i prosperiteta. Stoga poljoprivre-

da čini kritičnu tačku nacionalne bezbednosti. Suočavanjem javnosti sa realnošću asimetričnog ratovanja i globalnog terorizma, nove mete i ranjiva mesta treba tražiti sa šireg gledišta u odnosu na kritične delove nacionalne infrastrukture.

Vojska Srbije u okviru svojih misija takođe ima obaveze vezane za agrotorističke napade. U slučaju agrotorističkih napada iz sastava Vojske Srbije najveća naprezanja bi podnele sanitetska, veterinarska i ABH služba, a ostale službe imale bi ulogu u obezbeđenju logistike za rad ove tri službe. Težište rada vojske u slučaju agrotorističkog napada

bilo bi obezbeđenje uslova za sprovođenje propisanih biosigurnosnih mera i otklanjanje posledica napada.

U borbi protiv agrotorističkih napada najvažnija je dobra procena i blagovremeno preduzimanje preventivnih i protivepidemijskih mera. Procena obuhvata potencijalne teroriste, agense, medijume i sredstva za rasejavanje agensa, ciljeve i moguće gubitke, kao i potrebne mere i sredstva za odbranu. Na osnovu procene ugroženosti nadležni državni organi propisuju mere prevencije i definišu obaveze svih elemenata sistema u slučaju agrotorističkog napada.

L I T E R A T U R A

1. *Khardori N.* Bioterrorism and bioterrorism preparedness: historical perspective and overview. *Infect Dis Clin N Am* 2006; 20: 179–211.
2. *Monke J.* Agroterrorism: Threats and Preparedness. CRS Report for Congress. Congressional Research Service. The Library of Congress. 2005. Available from: www.fas.org/irp/crs/RL32521.pdf
3. *Katz LB.* Agroterrorism: Another Domino? New York: Nova Science Publishers; 2005.
4. *Gewin V.* Bioterrorism: Agriculture shock. *Nature* 2003; 421(6919): 106–8.
5. *Mathews KH, Perry J.* "The Economic Consequences of Bovine Spongiform Encephalopathy and Foot and Mouth Disease Outbreaks in the United States," Appendix 6 in Animal Disease Risk Assessment, Prevention and Control Act of 2001 (P. L.107-9): Final Report of the P.L. 107-9 Federal Inter-Agency Working Group. January 2003. Washington, DC. Available from: http://www.aphis.usda.gov/lpa/pubs/pubs/PL107-9_1-03.pdf.
6. *Rendleman M, Spinelli F.* An economic assessment of the costs and benefits of African Swine Fever prevention. *Animal Health Insight*. Centers for Epidemiology and Animal Health. Animal and Plant Health Inspection Service. US Department of Agriculture: Spring-Summer; 1994. p. 18-27.
7. *Radosavljević V, Jakonjčević B.* Bioterrorism-Types of epidemics, new epidemiological paradigm and levels of prevention. *Public Health* 2007; 121(7): 549–57.
8. *Radosavljević V, Radunović D, Belojević G.* Epidemics of panic during a bioterrorist attack- a mathematical model. *Med Hypotheses* 2009; 73(3): 342–6.
9. *Schaub J. D.* Applying the risk analysis paradigm to bioterrorism in agriculture. Presentation presented at Bioterrorism and food security conference, Fargo. ND. 2002. Available from: aaae.okstate.edu/.../Agroterrorism%20Paper%20-%20Ashlock,%20Leising%20&%20Cartmell.doc
10. *Eisenberg JN, Desai MA, Lery K, Bates SJ, Liang S, Naumoff K, et al.* Environmental determinants of infectious disease: a framework for tracking causal links and guiding public health research. *Environ Health Perspect* 2007; 115(8): 1216–23.
11. Environmental change may be boosting diseases-UN. Reuters by C. Bryson Hull. Nairobi. Available from: www.yongenawe.com/.../newsclips/36envirodisease220205.html [cited 2005 February 22]
12. *Byrne R.* Horizon scanning rural crime - agroterrorism an emerging threat to UK agriculture? *Int J Rural Crime* 2007; 1: 62–78.
13. *Radosavljević V, Belojević G.* A New Model of Bioterrorism Risk Assessment. *Biosecurity and Bioterrorism: Biodefense Strategy, Practise, and Science* 2009; 7(4): 443–51.
14. *Koda EK.* Could foot and mouth disease be a biological warfare incident? *Mil Med* 2002; 167(2): 91–2.
15. *Centers for Disease Control and Prevention (CDC).* Bioterrorism agent/diseases. Available from: www.bt.cdc.gov/agent/agentlist-category.asp [accessed 2007 August 17]
16. *Mushtaq A, El-Azizy M, Khardori N.* Category C potential bioterrorism agents and emerging pathogens. *Infect Dis Clin North Am* 2006; 20(2): 423–41.
17. *Pappas G, Panagopoulou P, Christou L, Akritidis N.* Category B potential bioterrorism agents: bacteria, viruses, toxins, and foodborne and waterborne pathogens. *Infect Dis Clin North Am* 2006; 20(2): 395–421.
18. *Collins S.* "Opening Statement" in Agroterrorism: The Threat to America's Breadbasket, Senate Committee on Governmental Affairs, S. Hrg. 108-491. Available from: http://frwebgate.access.gpo.gov/cgi-bin/getdoc.cgi?dbname=108_senate_hearing&docid=f91045.wais.pdf. [accessed 2003 Nov 19]
19. *Veljić R, Dukić B, Arapović L, Čamo D.* Bioterrorizam. *Sarajevo: Veterinar*; 2001; 5: 98–104.
20. *Report of a WHO Group of Consultants.* Health aspects of chemical and biological weapons. Geneva: World Health Organization; 2002. pp. 98–9.
21. *Peregrin, T.* Bioterrorism and food safety: What nutrition professionals need to know to educate the American public. *J Am Diet Assoc* 2002; 102(1): 14–6.
22. *Breeze R.* Agroterrorism: Betting Far More than the Farm. *Biosec* 2004; 2(4): 251–64.
23. *Casagrande R.* Biological terrorism targeted at agriculture: the threat to U.S. national security. *Nonproliferation Rev* 2000; 73(7): 92–105.
24. *Dudley JP, Woodford MH.* Bioweapons, bioterrorism and biodiversity: potential impacts of biological weapons attacks on agricultural and biological diversity. *Rev Sci Tech* 2002; 21(1): 125–37.
25. *Sobel J, Khan AS, Swerdlow DL.* Threat of a biological terrorist attack on the US food supply: the CDC perspective. *Lancet* 2002; 359(9309): 874–80.
26. *Rivas AL, Kunsberg B, Chowell G, Smith SD, Hyman JM, Schwager SJ.* Human-mediated Foot-and-Mouth Disease epidemic dispersal: disease and vector clusters. *J Vet Med B* 2006; 53: 1–10.
27. *Linacre NA, Koo B, Rosegrant MW, Msangi S, Falck-Zepeda J, Gaskell J et al.* Security Analysis for Agroterrorism: Applying the Threat, Vulnerability, Consequence Framework to Developing Countries. Washington: International Food Policy Research Institute. Available from: www.springerlink.com/index/p551359p051p9863.pdf [accessed 2008 Nov 14]
28. *Kohnen A.* "Responding to the Threat of Agroterrorism: Specific Recommendations for the United States Department of Agriculture." Discussion Paper 2000-29. Available from: www.medscape.com/viewarticle/482308_2

29. *Gibbs EPJ*. Emerging zoonotic epidemics in the interconnected global community. *Vet Rec* 2005; 157(22): 673–9.
30. Zakon o zaštiti stanovništva od zaraznih bolesti („Službeni glasnik RS“ br. 125/04).
31. Zakon o veterinarstvu („Službeni glasnik RS“ br. 91/05 i 30/10).
32. Zakon o odbrani („Službeni glasnik RS“ br. 116/2007).
33. Zakon o Vojski Srbije ("Službeni glasnik RS", br. 116/2007).
34. Zakon o bezbednosti hrane („Službeni glasnik RS“ br. 41/2009).
35. Zakon o zdravlju bilja („Službeni glasnik RS” br. 41/2009).

Primljen 26. VI 2009.
Revidiran 28. IV 2010.
Prihvaćen 1.VI 2010.



Funkcionalna magnetna rezonanca u ispitivanju adaptacije moždane kore kod bolesnika sa niskogradusnim gliomom

Functional magnetic resonance imaging of cortical changes in a low-grade glioma patient

Olivera Šveljo*, Katarina Koprivšek*, Miloš A. Lučić*, Ljubodrag Minić†

*Institut za onkologiju Vojvodine, Centar za imidžing dijagnostiku, Sremska Kamenica, Srbija; †Vojnomedicinska akademija, Klinika za neurohirurgiju, Beograd, Srbija

Apstrakt

Uvod. Nove metode za izučavanje moždanih funkcija omogućile su nov pogled u mozak čoveka. Zaista je moguće izučavati kortikalnu adaptaciju kod odraslih osoba sa oštećenjem mozga. Prikazali smo kortikalne promene u sklopu moždane adaptacije kod bolesnika sa niskogradusnim gliomom tokom progresije bolesti i nakon reoperacije pomoću funkcijske magnetne rezonance (fMRI). **Prikaz bolesnika.** Mapiranje bolesnikovih elokventnih motornih i govornih zona načinjeno je u tri navrata: sedam godina nakon prvobitne resekcije tumora, jedanaest meseci kasnije i tri meseca nakon reoperacije. Kortikalni odgovor na motorne zadatke prilikom prvog pregleda uočen je na očekivanim lokacijama primarnog motornog korteksa, dok su prilikom drugog i trećeg pregleda značajni kortikalni odgovori uočeni u primarnoj motornoj kori obe hemisfere kod pokretanja desne šake. Evaluacija govora prilikom prvog pregleda pokazala je dominaciju leve hemisfere za oba govorna zadatka, dok je drugi pregled pokazao različite kortikalne odgovore na govorne zadatke. Postoperativna evaluacija govora ukazala je na dominaciju leve hemisfere za oba govorna zadatka. **Zaključak.** Primena fMRI za mapiranje kortikalnih promena kod bolesnika sa niskogradusnim gliomima može omogućiti dodatnu optimizaciju i individualizaciju neurohirurških procedura.

Ključne reči:

magnetska rezonanca, snimanje; gliom; dijagnoza; funkcija, povratak; govor; aktivnost, fizička; lečenje, ishod.

Abstract

Introduction. New methods for studying brain functions have provided the new insights into human brain. It is really possible to study a cortical adaptation in adults who have sustained injury. We reported cortical changes in a left frontal low-grade glioma patient during disease progression and after reoperation by functional magnetic resonance imaging (fMRI). **Case report.** The use of fMRI exams for localisation of eloquent motor and language areas were performed three times in a period of 15 months: seven years after initial tumor resection, eleven months later and three months after the reoperation. The first fMRI demonstrated cortical activation for motor tasks in the expected location of primary motor area while later examinations showed activations of both primary motor areas for right hand movement. The first exam language evaluation showed the left hemisphere dominance for both language tasks, while the second fMRI demonstrated the right hemisphere dominance for complex word generation task, but the left hemisphere remained dominant in simple language task. After the reoperation, language mapping revealed the left hemisphere dominance for both language tasks. **Conclusion.** fMRI evaluation of cortical changes in low-grade glioma patients may additionally optimize and individualize neurosurgical treatment.

Key words:

magnetic resonance imaging; glioma; diagnosis; recovery of function; speech; motor activity; treatment outcome.

Uvod

Pod funkcijskom adaptacijom moždane kore podrazumevamo sposobnost odraslog mozga da se prilagodi na nove situacije u okruženju (učenje), kao i sposobnost da se adaptira na promene koje nastaju usled moždanih lezija različite etiologije (kortikalna reorganizacija)¹.

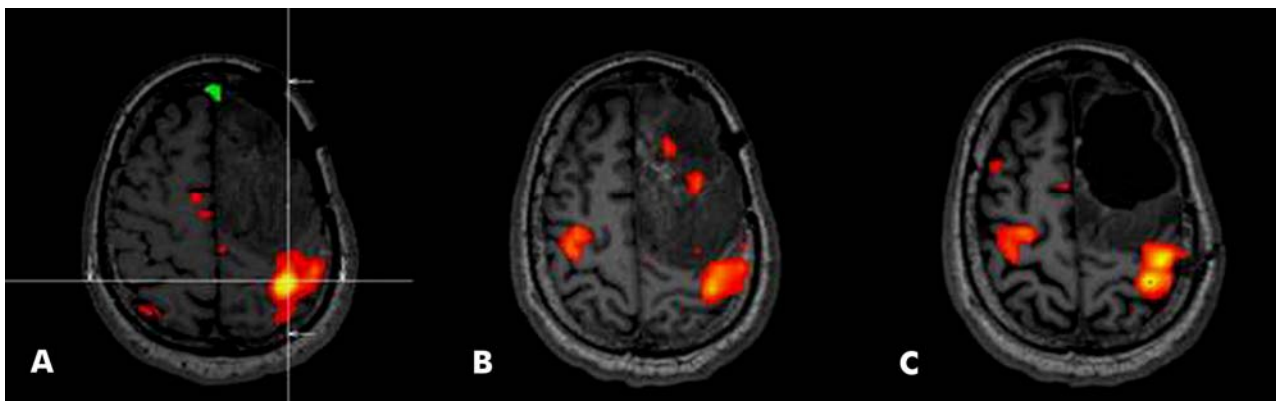
Za razliku od akutno nastalih moždanih lezija, poput moždanog udara, kod kojih kortikalna reorganizacija najčešće zahvata strukture istostrane moždane hemisfere, naročito u neposrednim okolnim zonama², kod spororastućih lezija, u koje spadaju i niskogradusni gliomi, kortikalne promene odnose se kako na bliske, tako i na udaljene moždane zone u okviru ipsilateralne i/ili kontralateralne moždane hemisfere³.

Koncept dinamičkog opsega nastanka moždane lezije i posledičnog kortikalnog odgovora na izmenjenu moždanu strukturu, ispitan metodom funkcijske magnetne rezonance (fMRI), demonstriran je na primeru bolesnika sa niskogradusnim gliomom u levom frontalnom režnju praćenog u periodu od 15 meseci.

Prikaz bolesnika

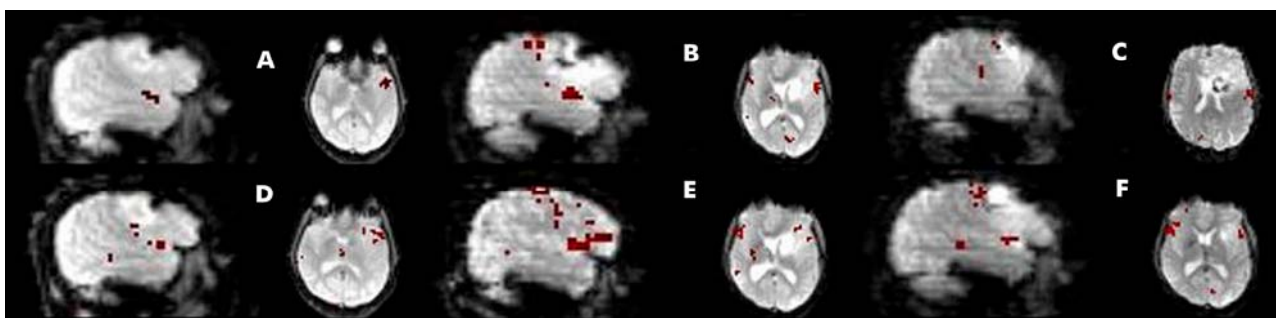
Desnoruki muškarac, starosti 38 godina, operisan je u 29-toj godini života, zbog niskogradusnog tumora u levom frontalnom režnju dijagnostikovano pregledom magnetnom re-

načinjena je i fMRI za lokalizaciju elokventnih motornih i govornih zona tehnikom BOLD (*Blood Oxygenation Level Dependent*) sa motornim zadacima koji su uključivali standardne zadatke pokretanja prstiju obe šake i fleksiju stopala, dok je mapiranje elokventnih govornih zona načinjeno za jednostavni i složeni zadatak generisanja reči. Funkcijsko mapiranje motornih zona za donje i gornje ekstremitete pokazalo je kortikalnu aktivaciju za motorne zadatke na očekivanim lokacijama primarnog motornog i sensorimotornog korteksa u obe hemisfere (slika 1A), dok je za oba govorna zadatka utvrđena dominacija leve hemisfere u skladu sa desnorukošću bolesnika (slika 2 A, D).



Sl. 1 – Kortikalni odgovor na motorni zadatak pokretanja prstiju desne šake kod bolesnika sa niskogradusnim gliomom u levom frontalnom režnju prilikom prvog fMRI pregleda (A), jedanaest meseci kasnije (B) i nakon reoperacije (C)

(A) – ne uočavaju se alteracije u odnosu na očekivane kortikalne odgovore na motorni zadatak; (B) – fMRI detektuje zone kortikalne aktivacije u primarnom motornom korteksu obe hemisfere, u sklopu verovatne kompenzacije; tri meseca nakon operacije; (C) – i dalje se detektuju zone bilateralnog kortikalnog odgovora



Sl. 2 – Na prvom pregledu fMRI BOLD mape pokazuju dominantan kortikalni odgovor u levoj hemisferi za oba govorna zadatka – jednostavan (A) i složen govorni zadatak (D)

Posle 11 meseci fMRI mape govora pokazuju dominantni kortikalni odgovor u levoj hemisferi za jednostavan govorni zadatak (B), dok se za složeni govorni zadatak (E) uočava dominantni kortikalni odgovor u desnoj hemisferi; nakon operacije fMRI mape govora pokazuju ponovni dominantni kortikalni odgovor u levoj hemisferi za oba govorna zadatka – jednostavno generisanje reči (C) i složeno generisanje reči (F)

zonom (MR), nakon incidentalnog gubitka svesti. Patohistološki, potvrđeno je da se radi o oligodendrogliomu gradus II. Bolesnik na sopstveni zahtev nije podvrgnut predloženoj radioterapijskom i hemoterapijskom tretmanu. U periodu nakon operacije, bolesnik je povremeno imao afazične ispade u trajanju od oko 20 sekundi, bez gubitka svesti, ali drugi neurološki deficiti nisu uočeni. Praćenje bolesnika uključivalo je redovne godišnje MR preglede endokranijuma.

Prvi kontrolni MR pregled na kojem je uočeno postojanje rekurentne tumorske formacije, načinjen je sedam godina nakon prvobitne resekcije tumora u 36. godini života bolesnika. Pored konvencionalnog MR snimanja, ovom prilikom

Drugi kontrolni MR pregled pre ponovljene hirurške intervencije načinjen je 11 meseci posle prvog pregleda, u 37. godini života bolesnika pri čemu je konvencionalno MR snimanje i fMRI sa lokalizacijom elokventnih motornih i govornih zona načinjeno po istovetnom protokolu, kao i prilikom prethodnog pregleda. Ovom prilikom fMRI nije ukazao na značajnije razlike u funkcijskom odgovoru na motorne zadatke za donje ekstremitete i pokretanje leve šake, ali je uočen značajan bilateralni kortikalni odgovor, ne samo u primarnoj motornoj zoni za pokretanje desne šake u levoj hemisferi, već u obe hemisfere, što govori u prilog postojanju verovatne kompenzacije za ovu vrstu pokreta i u kontra-

lateralnoj moždanoj hemisferi (slika 1B). Funkcijska evaluacija govora ukazala je na značajne razlike u odnosu na prvi pregled. Naime, drugi fMRI pregled pokazao je dominaciju desne hemisfere kod izvođenja složenog zadatka generisanja reči, dok je leva hemisfera ostala dominantna kod izvođenja jednostavnog govornog zadatka (slika 2 B, E).

Deset dana nakon izvedenog kontrolnog MR i fMRI snimanja, bolesnik je reoperisan u Klinici za neurohirurgiju Vojnomedicinske akademije u Beogradu, pri čemu je načinjena suptotalna resekcija rest/recidiva oligodendroglioma gradus II, što je nanovo potvrđeno patohistološkim nalazom.

Tri meseca nakon reoperacije ponovljeno je konvencionalno MR snimanje i fMRI po identičnom protokolu. Konvencionalno MR snimanje pokazalo je resekciju najvećeg dela tumorske mase (> 90%) uz očuvanje elokventnih motornih i govornih zona identifikovanih funkcijskim MR snimanjem. Funkcijske MR mape načinjene ovom prilikom nisu pokazale promenu kortikalnog odgovora na motorne zadatke u odnosu na prethodno fMRI snimanje (slika 1 C), dok je kortikalni odgovor na oba govorna zadatka ukazao na ponovno uspostavljenu dominaciju leve hemisfere (slika 2 C, F).

Nakon ponovljene neurohirurške operacije došlo je do potpunog povlačenja afazičnih ispada kod bolesnika, bez pojave drugih neuroloških deficita.

Diskusija

Funkcijska kortikalna adaptacija podrazumeva kompenzaciju gubitka određenih funkcija i/ili optimizaciju moždane funkcije u cilju smanjenja neurološkog deficita usled prisustva moždanih lezija. Dinamika kortikalnih promena ispitivana je u različitim studijama⁴, a razvoj novih tehnika snimanja, posebno fMRI omogućio je vizualizaciju normalne, ali i patološke kortikalne aktivnosti. Iako se funkcijskim MR mapama dobijenim BOLD tehnikom samo posredno beleži neuralna aktivnost pomoću detekcije povećanja nivoa oksihemoglobina, ova tehnika ubrzano dobija kliničku potvrdu i postaje deo standardnih kliničkih protokola, ne samo u sklopu priprema za neurohirurške intervencije, već i u praćenju toka bolesti i efikasnosti terapije kod oboljenja mozga raznovrsne etiologije, poput moždanog udara, multiple skleroze i demencija^{5,6}.

Fenomen kortikalne reorganizacije ispitivan je do sada u najvećoj meri kod bolesnika sa moždanim udarima^{2,7,8}. Pokazano je da do kortikalnih promena najčešće dolazi u regijama neposredno pored ishemične lezije⁹ ili u udaljenim zonama iste¹⁰ ili kontralateralne hemisfere^{11,12}, pri čemu uobičajeno dolazi do povećane aktivnosti regije koja kompenzuje realizaciju zadataka oštećenog područja mozga, što se objašnjava angažovanjem paralelnih kortikalnih puteva¹³. Vrsta i način nastanka moždane lezije, takođe utiču na fenomen kortikalne reorganizacije i stepen oporavka. Naime, uočeno je da spororastuće promene, uključujući i niskogradusne gliome, ne daju isti nivo kliničkih simptoma kao akutno nastale lezije i u slučajevima približno identične lokalizacije i ekstenzivnosti^{3,14}, dok kod akutno nastalih lezija mozga, gotovo 70% bolesnika pokazuje manje ili ozbiljnije neurološke deficite i nakon 11 godina¹⁵.

Ovi podaci potkrepljuju pretpostavku da progresivne moždane lezije, sa relativno sporim razvojem, ostavljaju veći prostor za kortikalnu reorganizaciju od akutnih lezija mozga^{3,16}, što se uočava kod prikazanog bolesnika.

Zbog toga razumevanje mehanizama koji omogućavaju kortikalnu reorganizaciju kao i njihove dinamičke karakteristike ukazuje na nove puteve za terapijske intervencije, ne samo neurohirurške, već i farmakoterapijske ili genetske, kao i biheviorističke. Pošto pojam kortikalne adaptacije ne podrazumeva samo jedan fenomen, već pokriva čitav niz različitih fenomena koji se događaju unutar kontinualnog razvoja mozga i promena koje nastaju usled moždanih povreda, upravo u ovom slučaju kortikalni odgovor zapravo predstavlja adaptaciju na nove uslove u pravcu umanjavanja ili čak potpunog eliminisanja kognitivnih, senzornih ili motornih deficita. Akutni ili hronični deficiti mogu nestati spontano, a mogu biti i redukovani hirurškim, farmakološkim, bihevioralnim ili fizikalnim tretmanima, među kojima je i nova obećavajuća tehnika transkranijalne magnetne stimulacije^{17,18}. Kod prikazanog bolesnika evidentan je visok nivo kortikalne adaptacije na progresivnu spororastuću tumorsku formaciju koja progresivno kompresivno ugrožava primarni motorni korteks leve hemisfere, što je uslovalo aktivaciju centara kontralateralne hemisfere prilikom zadatka pokretanja prstiju desne šake na drugom (neposredno pre reoperacije) i trećem kontrolnom fMRI pregledu, načinjenom nakon reoperacije. Činjenica da prestankom dejstva kompresivnog efekta tumora nije došlo do restitucije kortikalnog odgovora i njegovog ograničavanja isključivo na levostrani primarni motorni korteks mogla bi se objasniti eventualnom delimičnom narušenošću funkcije istostranog kortikospinalnog trakta.

S druge strane, iako na prvom fMRI nije bilo znakova aktivnih adaptivnih mehanizama, prilikom izvođenja složenog zadatka generisanja reči na drugom načinjenom fMRI, pre reoperacije uočena je aktivacija homolognih moždanih zona u desnoj hemisferi koja opredeljuje u pravcu aktuelne kompenzacije funkcije kompresivno ugroženog levostranog donjeg frontalnog girusa, a što se nakon odstranjenja tumorske mase ponovo normalizuje, govoreći u prilog restitucije funkcija govornih zona leve hemisfere, smanjujući verovatnoću da se radi o potpunoj reorganizaciji kortikalne funkcije.

Prikazani bolesnik, kao i drugi slični primeri iz kliničke prakse^{14,19}, podržavaju ideju da funkcijska specijalizacija moždanih zona nije nepromenljiv rezultat lokalne moždane arhitektonike. Sposobnost nekanonskih govornih zona mozga da privremeno ili trajno kompenzuju funkciju primarnih govornih zona koje su ugrožene spororastućom tumorskom novotvorevinom, uz činjenicu da kortikalna reorganizacija pokazuje nizak nivo kompenzatornog mehanizma u očuvanju vitalnih moždanih funkcija kod akutnih, naglo nastalih lezija mozga, podržava hipotezu da kompenzatorni mehanizmi u svojoj osnovi imaju neku vrstu superviziranog učenja, prema kojoj bi elokventne moždane zone igrale ulogu udaljenog supervizora²⁰. Do pre samo nekoliko godina, ova ideja bi bila više od akademskog nego od praktičnog interesa, ali sa napretkom neinvanzivnih tehnika snimanja moždanih aktivnosti, kao i razvojem novih matematičkih metoda za njihovu lokalizaciju i evaluaciju^{21,22}, ona bi mogla da dobije daleko veći značaj u

bliskoj budućnosti, kako za bolje razumevanje funkcijske neuroanatomije, tako i za razvoj novih terapijskih tehnika kod bolesnika sa moždanim lezijama različite etiologije²³.

Zaključak

S obzirom na to da neurohirurška resekcija tumora mo- zga nosi sa sobom opasnost od pojave ozbiljnih neuroloških deficita, naročito kada je tumor lokalizovan unutar ili u bli- zini motornih ili govornih moždanih zona, aktualno prihvaćeno intraoperativno mapiranje kortikalnih funkcija od interesa elektrokortikalnom stimulacijom, od izuzetnog je značaja. Međutim, nove tehnike snimanja, a posebno fMRI omogućavaju neinvazivnu identifikaciju elokventnih moždanih zona u procesu preoperativne pripreme bolesnika, što može bitno da utiče na terapijske odluke u svrhu optimizacije i individualizacije terapijskog pristupa i poboljšanja izvođenja neurohirurške intervencije.

ni motornih ili govornih moždanih zona, aktualno prihvaćeno intraoperativno mapiranje kortikalnih funkcija od interesa elektrokortikalnom stimulacijom, od izuzetnog je značaja. Međutim, nove tehnike snimanja, a posebno fMRI omogućavaju neinvazivnu identifikaciju elokventnih moždanih zona u procesu preoperativne pripreme bolesnika, što može bitno da utiče na terapijske odluke u svrhu optimizacije i individualizacije terapijskog pristupa i poboljšanja izvođenja neurohirurške intervencije.

L I T E R A T U R A

1. Pascual-Leone A, Amedi A, Fregni F, Merabet LB. The plastic human brain cortex. *Annu Rev Neurosci* 2005; 28: 377–401.
2. Rijntjes M, Weiller C. Recovery of motor and language abilities after stroke: the contribution of functional imaging. *Prog Neurobiol* 2002; 66: 109–22.
3. Desmurget M, Bonnetblanc F, Duffau H. Contrasting acute and slow growing lesions: a new door to brain plasticity. *Brain* 2007; 130(4): 898–914.
4. Lee RG, van Donkelaar P. Mechanism underlying functional recovery following stroke. *Can J Neurol Sci* 1995; 22: 257–63.
5. Rocca MA, Filippi M. Functional MRI in multiple sclerosis. *J Neuroimaging* 2007; 17: 36S–41S.
6. Faro SH, Feroze MB. Functional MRI: basic principles and clinical applications. New York: Springer-Verlag; 2006.
7. Elbert T, Rockstroh B. Reorganization of human cerebral cortex: the range of changes following use and injury. *Neuroscientist* 2004; 10: 129–41.
8. Krakauer JW. Arm function after stroke: from physiology to recovery. *Semin Neurol* 2005; 25: 384–95.
9. Nudo RJ, Milliken GW. Reorganization of movement representations in primary motor cortex following focal ischemic infarcts in adult squirrel monkeys. *J Neurophysiol* 1996; 75: 2144–9.
10. Frost SB, Barbay S, Friel KM, Plantz EJ, Nudo RJ. Reorganization of remote cortical regions after ischemic brain injury: a potential substrate for stroke recovery. *J Neurophysiol* 2003; 89: 3205–14.
11. Carmichael ST. Plasticity of cortical projections after stroke. *Neuroscientist* 2003; 9: 64–75.
12. Fridman EA, Hanakawa T, Chung M, Hummel F, Leiguarda RC, Cohen LG. Reorganization of the human ipsilesional premotor cortex after stroke. *Brain* 2004; 127: 747–58.
13. Feydy A, Carlier R, Roby-Brami A, Bussel B, Cazalis F, Pierot L, et al. Longitudinal study of motor recovery after stroke: recruitment and focusing of brain activation. *Stroke* 2002; 33(6): 1610–7.
14. Duffau H. Lessons from brain mapping in surgery for low-grade glioma: Insights into associations between tumour and brain plasticity. *Lancet Neurol* 2005; 4: 476–86.
15. Varona JF, Bermejo F, Guerra JM, Molina JA. Long-term prognosis of ischemic stroke in young adults. Study of 272 cases. *J Neurol* 2004; 251: 1507–14.
16. Duffau H. New concepts in surgery of WHO grade II gliomas: functional brain mapping, connectionism and plasticity—a review. *J Neurooncol* 2006; 79(1): 77–115.
17. Draganski B, Gaser C, Busch V, Schuierer G, Bogdahn U, May. Neuroplasticity: changes in grey matter induced by training. *Nature* 2004; 427(6972): 311–2.
18. Bolognini N, Pascual-Leone A, Fregni F. Using non-invasive brain stimulation to augment motor training-induced plasticity. *J Neuroeng Rehabil* 2009; 6: 8–21.
19. Duffau H, Denvil D, Capelle L. Long term reshaping of language, sensory, and motor maps after glioma resection: a new parameter to integrate in the surgical strategy. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2002; 72: 511–6.
20. Jordan MI, Rumelhart DE. Forward models: supervised learning with a distal teacher. *Cogn Sci* 1992; 16: 307–54.
21. Leistriz L, Galicki M, Kochs E, Zwick EB, Fitzek C, Reichenbach JR, et al. Application of generalized dynamic neural networks to biomedical data. *IEE Trans Biomed Eng* 2006; 53: 2289–99.
22. Marrelec G, Bellec P, Krainik A, Duffau H, Péligrini-Issac M, Lebéryc S, Benali H, et al. Regions, systems, and the brain: hierarchical measures of functional integration in fMRI. *Med Image Anal* 2008; 12(4): 484–96.
23. Petrella JR, Shah LM, Harris KM, Friedman AH, George TM, Sampson JH, et al. Preoperative functional MR imaging localization of language and motor areas: effect on therapeutic decision making in patients with potentially resectable brain tumors. *Radiology* 2006; 240: 793–802.

Primljen 24. III 2009.
Revidiran 21. VII 2009.
Prihvaćen 19. X 2009.



Povezanost posttraumatske komunikacije endokranijuma i nosne šupljine sa recidivnim meningoencefalitisom bez nazolikvoreje

Association of post-traumatic communication of endocranium and nasal cavity with recurrent meningoencephalitis without rhinorrhea

Djula Djilvesi, Petar Vuleković, Tomislav Cigić, Željko Kojadinović,
Vladimir Papić, Igor Horvat

Klinički centar Vojvodine, Neurohirurška klinika, Novi Sad, Srbija

Apstrakt

Uvod. Prostrelne povrede glave delovanjem mehaničke sile velikog intenziteta pored direktnog oštećenja tkiva na mestu udara mogu izazvati i udaljene prelome svoda i baze lobanje koje se dalje mogu komplikovati stvaranjem komunikacije između endokranijuma i nosne i paranazalnih šupljina. Lečenje ovako povređenih može predstavljati veliki dijagnostički i terapijski problem. **Prikaz slučaja.** U radu je prikazan bolesnik sa prostrelnom povredom glave kod kojeg je u narednih šest godina došlo do recidivnih meningitisa, bez detektabilne nazolikvoreje. Kompjuterizovanom tomografijom visoke rezolucije otkrivena je fisura baze lobanje u frontoetmoidalnom predelu, udaljenom od mesta primarne povrede. Sprovedena je endoskopska intervencija transnazalnim putem te je otvor na bazi lobanje zatvoren. U naredne dve godine kod bolesnika nisu se javili znakovi ponovne infekcije. **Zaključak.** U slučaju pojave odloženih meningitisa nakon kranocerebralnih povreda i bez znakova likvoreje, pored drugih uzroka nastanka, mora se razmotriti mogućnost postojanja komunikacije intrakranijalne i nosne šupljine. Primenom savremenih dijagnostičkih i terapijskih procedura ovakvu komunikaciju potrebno je precizno locirati i zatvoriti.

Ključne reči:

glava, penetrantne povrede; fistula; cerebrospinalna tečnost, rinoreja; meningitis.

Abstract

Introduction. A gunshot head injury, characterized by a huge intensity of mechanical force, in addition to the direct tissue damage at the location of direct impact, may cause a skull and skull base fracture, distant from the the point of direct impact, which could be further complicated by creating a communication between endocranium and nasal/paranasal cavities. Such cases pose a great diagnostic and therapeutic challenge for every clinician. **Case report.** The patient is presented with the history of a perforating gunshot head injury six years ago, with recurrent attacks of meningoencephalitis subsequently, without rhinorrhea. By using high resolution CT scans, previous traumatic skull injury was verified and a fissure in the frontoethmoidal region, far from the point of direct impact, was detected. The patient underwent transnasal endoscopic surgery, in order to seal the communication on skull basis. The patient did not suffer from meningoencephalitis during the next two years. **Conclusion.** In the cases with late occurrence of posttraumatic meningoencephalitis with no signs of rhinorrhea, a possibility of an existing communication between intracranial and nasal cavities should be considered, as well. By applying modern diagnostic and therapeutic procedures such communication should be precisely located and sealed.

Key words:

head injuries, penetrating; fistula; cerebrospinal fluid rhinorrhea; meningitis.

Uvod

Kod prostrelnih povreda glave zbog delovanja mehaničke sile velikog intenziteta, pored direktnog oštećenja tkiva na mestu delovanja, mogu nastati i udaljeni prelomi svoda i baze lobanje. Prelomi baze lobanje dalje se mogu komplikovati stvaranjem komunikacije između endokranijuma i nosne šupljine, paranazalnih sinusa ili srednjeg uha.

Najčešći znak stvaranja ovakve komunikacije je isticanje cerebrospinalne tečnosti – likvora na nos ili uho (nazo, odnosno otolikvoreja). Kod ovih bolesnika postojanje fistule je očigledno i ona se hirurški rešava najčešće primarno kada i prostrelna povreda.

U retkim slučajevima traumatski otvor na bazi lobanje i tvrdoj moždanići ostaje prekriven sluzokožom, fibroznom tkivom ili moždanim parenhimom kada se likvoreja ili uop-

šte ne javi ili nakon kratkog vremena prestane i ostane neprepoznata¹⁻³. Kod ovih bolesnika postoji povećan rizik od nastanka posttraumatskog meningoencefalitisa, čak i više godina nakon povrede, a određivanje tačne lokalizacije traumatskog otvora na bazi lobanje i operativno lečenje može biti veoma teško⁴.

Klasičnim radiološkim pregledima koji se koriste kod prostrelnih povreda glave: kranioogram, kompjuterizovana tomografija (CT) i magnetna rezonanca (MRI), ovakvi se prelomi, pogotovo kada su mali i udaljeni od mesta prostrelne povrede, ne moraju prikazati. Pojava meningitisa kod ovih bolesnika i u dužem vremenskom periodu nakon povrede, pored dijagnostičkog, predstavlja i problem u donošenju indikacija za vrstu i planiranje odgovarajuće operativne intervencije. Za detekciju i prikaz lokalizacije u slučaju postojanja sumnje na prelom baze lobanje, kao veoma osetljiva metoda pokazao se CT nalaz visoke rezolucije (64 slajsnji) u koronarnoj ravni⁵. U lečenju ovih bolesnika, pored transkranijalnog operativnog pristupa, u slučaju precizne lokalizacije preloma, moguće je endonazalnom endoskopskom metodom izvršiti sanaciju manjih defekata baze lobanje u prednjem i zadnjem delu etmoidnog krova i u sfenoidnom sinusu⁶.

Prikaz bolesnika

Prikazan je bolesnik, star 29 godina, sa prostrelnom povredom glave (ulazna rana bila je desno slepoočno, iznad uha, a izlazna čeonno, takođe, desno). Nakon sprovedene inicijalne dijagnostike (kranioogram i CT) izvršena je hitna neurohirurška intervencija evakuacije intracerebralnog hematoma, te odstranjivanje dostupnih stranih tela uz plastiku tvrde moždanice. U postoperativnom toku bolesnik se postepeno oporavljao, te je u dobrom opštem stanju, bez znakova nazolikvoreje, otpušten sa klinike. Zbog defekta kranijuma bolesniku je godinu dana nakon povrede načinjena kranioplastika čeonoslepoočne regije metilmetakrilatnim umetkom.

Tri godine nakon povrede kod bolesnika, koji je bio u dobrom opštem stanju i bez nazolikvoreje, razvili su se klinički znakovi bakterijskog meningitisa. I pored ponovljenih pretraga uzročnik nije identifikovan, a infekcija je sanirana antibiotskom terapijom. Tada ponovo načinjena radiološka dijagnostička obrada nije identifikovala prelom baze lobanje, niti likvoreju.

Naredne godine, četiri godine nakon povrede, kod bolesnika su se ponovo razvili klinički znakovi meningitisa. Tada je u likvoru identifikovan uzročnik - *Neisseria meningitidem*. Kod bolesnika i tada nije bilo znakova nazolikvoreje, a ponovna dijagnostika nije ukazala na postojanje i mesto fistule.

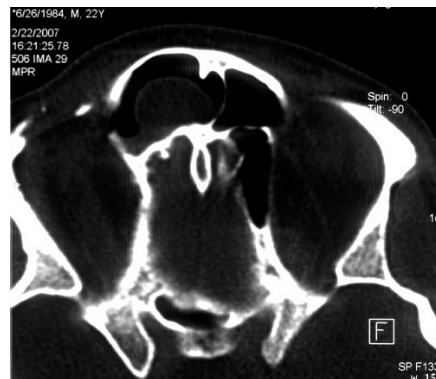
Nakon naredne dve godine dobrog stanja (šest godina nakon povrede) javila se epizoda bakterijskog meningoencefalitisa. Urađena je ponovna dijagnostika kostiju lobanje, sada 64-slajsnim CT visoke rezolucije. Pored i ranije verifikovanih traumatskih oštećenja kranijuma otkriven je i prelom baze lobanje frontoetmoidne regije 20 mm, udaljen od mesta primarne povrede (slike 1 i 2). U visini preloma u etmoidnom i frontalnom sinusu otkrivena je submukozna cistična formacija ispunjena bistrom tečnošću koja je smatrana likvorom (slike 3 i 4). Po sanaciji bakterijske infekcije sproveden je fluorescinski test i u nosnoj šupljini nisu nađeni tragovi li-



Sl. 1 – Sagitalna 3D projekcija CT snimka kranijuma



Sl. 2 – Koronalna projekcija CT snimka kranijuma



Sl. 3 – Horizontalna projekcija CT snimka kranijuma sa prikazom submukozne kolekcije likvora



Sl. 4 – Sagitalna projekcija CT snimka kranijuma sa prikazom submukozne kolekcije likvora

kvora. Transnazalno, endoskopski, uz upotrebu navigacionog sistema, pristupilo se frontoetmoidnom recesusu u predelu fissure na prednjoj bazi lobanje. Nakon otvaranja izmenjene sluzokože nadena je bistra tečnost koja je odgovarala likvoru, te je otvor na bazi lobanje zatvoren uz pomoć masnog tkiva i fibrinskog lepka. Patohistološkom analizom odstranjenog tkiva u predelu otvora na bazi lobanje utvrđena je izmenjena nosna sluzokoža sa vezivnim tkivom i ožiljcima.

U naredne više od dve godine bolesnik je bio dobrog opšteg stanja, bez znakova upale moždanica.

Diskusija

Nazolikvoreja koja predstavlja isticanje cerebroskinalne tečnosti kroz nos, nastaje kada su arahnoidna, dura, lobanja i mukozni epitel povređeni. Najčešći uzrok nazolikvoreje su kranio cerebralne povrede (u 80–90% slučajeva). Kod penetrantnih povreda glave nazolikvoreja nastaje u 7–10% slučajeva. Nazolikvoreja kod najvećeg broja povređenih javlja se odmah po povređivanju, ređe u prva tri meseca od povrede, a iznimno i nakon ovog perioda⁷.

Strelne rane glave posledica su delovanja projektilnog zrna iz vatrenog oružja i mogu biti ustrelne, prostrelne i tangencijalne. Obim i vrsta oštećenja tkiva zavise od brzine projektila, njegovog kalibra, udaljenosti sa koje se projektil ispaljuje i ugla pod kojim udara u glavu. Među mogućim posledicama prostrelnih povreda glave, kada projektilno zrno velikom brzinom ulazi, prolazi i izlazi iz lobanje spadaju i udaljeni prelomi svoda i baze lobanje sa stvaranjem komunikacije između endokranijuma i šupljina lobanje (nazalne šupljine, paranazalnih sinusa i srednjeg uha). Kroz ovakve traumatske komunikacije mogu se stvoriti putevi isticanja moždane tečnosti što se manifestuje nazolikvorejom, otolikvorejom ili slivanjem likvora niz ždrelo. Frakture u predelu kribriiformnoetmoidnog spoja i u predelu same etmoidne kosti najčešći su uzroci nazolikvoreje. Avulzija olfaktivnih nerava u predelu kribriiformne ploče može izazvati nazolikvoreju i bez prisustva preloma koštanih struktura. Kada dođe do preloma unutrašnjeg zida frontalnog sinusa, likvor ističe kroz nazolakrimalni kanal u nosnu šupljinu. Prelomi srednje baze lobanje, koji zahvataju sfenoidni sinus mogu, takođe, izazvati nazolikvoreju. Ako pri prelomu temporalne kosti bubna opna ostane nepovređena, likvor može isticati kroz eustahijevu tubu u ždrelo i kroz nos. Istanjanje likvora može biti očigledno, profuzno, ali i minimalno, intermitentno. Većina likvoreja spontano prestaje u toku sedam do deset dana. Likvoreja koja perzistira duže od sedam dana predstavlja značajan rizik od razvoja meningitisa⁸.

U retkim slučajevima, traumatski otvor na lobanji može ostati prekriven sluzokožom, fibroznim tkivom ili moždanim parenhimom i tada ne postoji isticanje likvora. Kod ovakvih stanja ne postoji klinička manifestacija isticanja likvora, a postoji otvorena komunikacija subarahnoidnog prostora i spoljašnje sredine, te opasnost od prodora mikroorganizama i razvoja infektivnih komplikacija.

Meningitis je relativno česta i opasna posledica traumatskih otvora na bazi lobanje, čak i u slučajevima kada nema evidentne likvoreje. U slučaju perzistentne posttraumatske likvoreje meningitis nastaje u toku prvih mesec dana kod

oko 20% povređenih, dok kod hroničnih fistula koje traju u dužem vremenskom periodu nakon traume, taj procenat dostiže 57%⁴. Mortalitet kod upale moždanica i mozga kao posledica traumatske likvoreje, i pored antibioterapije, iznosi oko 10%⁹. Uzročnici posttraumatskog meningoencefalitisa mogu biti i gram-pozitivni i gram-negativni mikroorganizmi. Većina objavljenih serija ukazuje da je najčešće izolovan uzročnik *Streptococcus pneumoniae* kod 52–100% slučajeva¹⁰. Vremenski period između kranio cerebralne povrede i pojave posttraumatskog meningitisa može iznositi i više godina¹¹. Etiologija posttraumatskog meningoencefalitisa više godina nakon povrede glave može, osim zbog likvoreje, biti i druge prirode kao što su zaostala strana tela, bakterijska infekcija nastala hematogenim širenjem ili propagacijom *per kontinuitatem*, virusne infekcije, što dodatno otežava dijagnostiku.

Visok morbiditet, kao i mortalitet meningitisa, kao komplikacije spoljašnje sredine i subarahnoidnog prostora, nosi obavezu identifikacije, te zatvaranja ove komunikacije. Sa druge strane, da bi hirurško lečenje bilo uspešno, neophodno je postojanje komunikacije potvrditi i precizno lokalizovati.

Nakon druge pojave meningitisa kod prikazanog bolesnika, po sanaciji bakterijske upale, sprovedli smo najsavremenije dijagnostičke pretrage kojima nije otkriven uzrok ponavljanih meningoencefalitisa. Nakon konsultacija sa eminentnim svetskim stručnjacima iz ove oblasti odlučeno je da se ne sprovede operativno lečenje.

Identifikacija nazolikvoreje je laka, ako je evidentno isticanje bistre tečnosti kroz nos. Ukoliko je tečnost iz nosa sukrvičava, može se uraditi jednostavan test pomoću filter papira na koji se ona kapne. Ako se radi o likvoreji, oko krvavog kružnog centralnog dela pojavljuje se likvor u vidu prstena. Ako je likvoreja minimalna ili intermitentna, rade se laboratorijski testovi određivanja koncentracije glukoze i β 2-transferina u ispitivanoj tečnosti¹². Dijagnostička ili preoperativna lumbalna punkcija sa ubrizgavanjem fluorescinske boje je invazivna dijagnostička metoda koja je visoko senzitivna za detekciju aktivne likvoreje.

Određivanje tačne lokalizacije traumatskog otvora na bazi lobanje može biti izuzetno teško, pogotovo ako nema dokaza o prisustvu likvoreje. Postojanje i lokalizacija koštanog defekta na bazi lobanje kod opisanog bolesnika efikasno se prikazalo na koronalnim snimcima načinjenim 64-slajsnim CT aparatom visoke rezolucije⁵. Kod manjeg broja bolesnika ne otkriva se lokalizacija fistule.

Cilj hirurške terapije je zatvaranje duralnog otvora, odgovornog za likvoreju. Hirurška terapija izmenila se u značajnoj meri od uvođenja funkcionalne endoskopske tehnike koja omogućava hirurgu jasan pregled krova nosne šupljine i paranazalnih šupljina, identifikaciju likvorne fistule i dalje planiranje za rešavanje likvoreje. Danas, za tretman rinoreje pored klasičnog neurohirurškog transkranijalnog pristupa prihvaćena je i endonazalna endoskopska metoda. Primenom endoskopske metode osećaj za miris ostaje očuvan skoro uvek, prosečna dužina hospitalizacije je 36 h, dok je uspeh u zatvaranju likvorne fistule u prvom pokušaju 90%, u drugom 97%⁶. Primenjuje se za nekomplikovane likvorne fistule lokalizovane u prednjem i zadnjem delu etmoidnog krova i u sfenoidnom sinusu. Kod našeg bolesnika endonazalna endo-

skopska metoda pokazala se uspješnom jer se nakon zatvaranja defekta baze lobanje ni nakon više od dve godine od intervencije nisu javili znakovi infekcije. Nekomplikovane likvorne fistule koje se lokalizovane na unutrašnjem zidu frontalnog sinusa rešavaju se ekstraduralno osteoplastičnom frontalnom sinusotomijom. U slučajevima likvoreje zbog tumora prednje baze lobanje i kod ekstenzivnih kominutivnih preloma baze lobanje koji su udruženi sa intrakranijalnim povredama, koristi se intrakranijalni pristup.

Zaključak

Nakon teške kranio cerebralne povrede može nastati komunikacija kranijalne i nazalne šupljine i bez isticanja lik-

vora, uz razvoj submukozne kolekcije likvora u istoj visini. Infekcija se kroz taj otvor na lobanji može preneti endokranijalno, te biti uzrok recidivnih meningoencefalitisa.

U slučaju pojave odloženih meningoencefalitisa nakon kranio cerebralnih povreda bez znakova likvoreje, pored drugih uzroka nastanka, mora se razmotriti i mogućnost postojanja komunikacije intrakranijalne i nosne šupljine.

U prikazu ovog bolesnika traumatski otvor na bazi lobanje otkriven je i detaljno prikazan nalazom CT visoke rezolucije.

Zatvaranje komunikacije na bazi lobanje u frontoetmoidalnoj regiji endonazalnom endoskopskom intervencijom pokazalo se kao minimalno invazivna, sigurna i delotvorna metoda.

L I T E R A T U R A

1. *Ommaya AK, Di Chiro GJ, Baldwin M, Pennybacker JB.* Non-traumatic cerebrospinal fluid rhinorrhoea. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 1968; 31(3): 214–25.
2. *Eisenberg HM, Gary HE Jr, Aldrich EF, Saydjari C, Turner B, Foulkes MA, et al.* Initial CT findings in 753 patients with severe head injury. A report from the NIH Traumatic Coma Data Bank. *J Neurosurg* 1990; 73(5): 688–98.
3. *Meironosky AM, Caveness WF, Dillon JD, Rish BL, Mober JP, Kistler JP, et al.* Cerebrospinal fluid fistulas complicating missile wounds of the brain. *J Neurosurg* 1981; 54(1): 44–8.
4. *Calcaterra TC.* Diagnosis and management of ethmoid cerebrospinal rhinorrhea. *Otolaryngol Clin N Am* 1985; 18: 99–105.
5. *Koso-Thomas AK, Harley EH.* Traumatic cerebrospinal fluid fistula presenting as recurrent meningitis. *Otolaryngol Head Neck Surg* 1995; 112(3): 469–72.
6. *Marentette LJ, Valentino J.* Traumatic anterior fossa cerebrospinal fluid fistulae and craniofacial considerations. *Otolaryngol Clin North Am* 1991; 24: 151–63.
7. *Bakay L, Glauser FE.* Head Injury. Boston: Little-Brown; 1980. pp. 341–4.
8. *Ryall RG, Peacock MK, Simpson DA.* Usefulness of beta 2-transferrin assay in the detection of cerebrospinal fluid leaks following head injury. *J Neurosurg* 1992; 77(5): 737–9.
9. *Lloyd MNH, Kimber PM, Burrows EH.* Post-traumatic cerebrospinal fluid rhinorrhea: modern high-definition computed tomography is all that is required for the effective demonstration of the site of leakage. *Clin Radiol* 1994; 49: 100–3.
10. *Brodie HA, Thompson TC.* Management of complications from 820 temporal bone fractures. *Am J Otol* 1997; 18(2): 188–97.
11. *Hegazy HM, Carrau RL, Snyderman CH, Kassam A, Zweig J.* Transnasal endoscopic repair of cerebrospinal fluid rhinorrhea: a meta-analysis. *Laryngoscope* 2000; 110: 1166–72.
12. *Ryall RG, Peacock MK, Simpson DA.* Usefulness of beta 2-transferrin assay in the detection of cerebrospinal fluid leaks following head injury. *J Neurosurg* 1992; 77(5): 737–9

Primljen 26. III 2009.

Revidiran 29. VII 2009.

Prihvaćen 14. VIII 2009.

UPUTSTVO AUTORIMA

Vojnosanitetski pregled (VSP) objavljuje radove koji ranije nisu nigde publikovani, niti predati za publikovanje redosledom koji određuje uređivački odbor. Uz rad, na posebnom listu, treba dostaviti: izjavu da rad do sada nije (ili je delimično) objavljen ili prihvaćen za štampu u drugom časopisu; potpise svih koautora; ime, tačnu adresu, brojeve telefona (fiksne, mobilne, faks), *e-mail* adresu, kao i kopiju dokaza o pretplati na časopis za sve autore (i koautore). Za objavljene radove VSP zadržava autorsko pravo.

Radove slati na adresu: Vojnosanitetski pregled Vojnomedicinska akademija, Institut za naučne informacije, Cmotravska 17, 11040 Beograd.

U VSP-u se objavljuju **uvodnici**, **originalni članci**, **prethodna ili kratka saopštenja**, revijski radovi tipa **opšteg pregleda**, **aktuelne teme** ili **metaanalize**, **kazuistika**, članci iz **istorije medicine**, lični stavovi, naručeni komentari, pisma uredništvu, izveštaji sa naučnih i stručnih skupova, prikazi knjiga, referati iz naučne i stručne literature i drugi prilozi.

Radove tipa opšteg pregleda Uredništvo će prihvatiti samo ukoliko autori navođenjem najmanje 5 autocitata potvrde da su eksperti u oblasti o kojoj pišu.

Radovi se objavljuju na srpskom ili engleskom jeziku sa apstraktima na srpskom i engleskom, za radove tipa originalnih članaka, prethodnih ili kratkih saopštenja, metaanalize i kazuistike. Odabrani članci objavljuju se u celini na engleskom jeziku sa apstraktom na srpskom.

Rukopis se piše pomoću IBM-PC kompatibilnog računara, sa proredom 1,5. Štampa se na laserskom ili nekom drugom visokokvalitetnom štampaču, uredno i bez ispravki, na čistoj beloj hartiji formata A4, sa levom marginom od 4 cm. Koristiti font veličine 12, a načelno izbegavati upotrebu **bold** i *italic* slova, koja su rezervisana za podnaslove. Originalni članci, opšti pregledi i metaanalize ne smeju prelaziti 16 stranica (sa prilogima); aktuelne teme – osam, kazuistika – šest, prethodna saopštenja – pet, a pisma uredniku, izveštaji sa skupova i prikazi knjiga – dve stranice.

U celom radu obavezno je korišćenje međunarodnog sistema mera (SI) i standardnih međunarodno prihvaćenih termina.

Radove (tekst i grafičke priloge) treba slati na disketi (CD) i štampane u tri primerka (original i dve kopije). Autori konačnu verziju rukopisa i priloga prihvaćenih za publikovanje predaju u jednom štampanom primerku i na disketi od 3,5" (očišćenju od „virusa“) ili na kompaktnom disku. Za obradu teksta koristiti program **Word for Windows** verzije 97, 2000, XP ili 2003, a samo izuzetno i neki drugi. Za izradu grafičkih priloga koristiti standardne grafičke programe za **Windows**, poželjno iz programskog paketa **Microsoft Office (Excel, Word Graph)**. Kod kompjuterske izrade grafika izbegavati upotrebu boja i senčenja pozadine.

Prispeli radovi kao anonimni podležu uređivačkoj obradi i recenziji najmanje dva urednika/recenzenata. Primedbe i sugestije urednika/recenzenata dostavljaju se autoru radi konačnog oblikovanja. Otisak članka šalje se prvom autoru na korekturu, koji treba vratiti u roku od pet dana. Rukopisi radova prihvaćenih za štampu ne vraćaju se autoru.

Priprema rada

Delovi rada su: **naslovna strana**, **apstrakt sa ključnim rečima**, **tekst i literatura**.

1. Naslovna strana

a) Naslov treba da bude kratak, jasan i informativan i da odgovara sadržaju rada. Podnaslove treba izbegavati.

b) Ispisuju se puna imena i prezimena autora.

c) Navode se puni nazivi ustanove i organizacijske jedinice u kojima je rad obavljen i mesta u kojima se ustanove nalaze, sa jasnim obeležavanjem odakle je autor, koristeći standardne znake za fus-note.

2. Apstrakt i ključne reči

Na drugoj stranici nalazi se strukturisani apstrakt sa naslovom rada. Kratkim rečenicama na srpskom i engleskom jeziku iznosi se **uvod i cilj** rada, osnovne procedure - **metode** (izbor ispitanika ili laboratorijskih životinja; metode posmatranja i analize), glavni nalazi - **rezultati** (konkretni podaci i njihova statistička značajnost) i glavni **zaključak**. Naglasiti nove i značajne aspekte studije ili zapažanja. Strukturisani apstrakt (**250** reči) ima podnaslove: *uvod/cilj*, *metode*, *rezultati* i *zaključak*. Za apstrakte na engleskom dozvoljeno je i do **450** reči. Strukturisani apstrakt je obavezan za metaanalize (istog obima kao i za originalne članke) i kazuistiku (do 150 reči, sa podnaslovima *uvod*, *prikaz slučaja* i *zaključak*). Ispod apstrakta, pod podnaslovom „Ključne reči“ predložiti 3–10 ključnih reči ili kratkih izraza koji oslikavaju sadržinu članka.

3. Tekst članka

Tekst sadrži sledeća poglavlja: **uvod**, **metode**, **rezultate** i **diskusiju**. **Zaključak** može da bude posebno poglavlje ili se iznosi u poslednjem

pasusu diskusije. U **uvodu** ponovo napisati naslov rada, bez navođenja autora. Navesti hipotezu (ukoliko je ima) i ciljeve rada. Ukratko izneti razloge za studiju ili posmatranje. Navesti samo strogo relevantne podatke iz literature i ne iznositi opširna razmatranja o predmetu rada, kao ni podatke ili zaključke iz rada o kome se izveštava.

Metode. Jasno opisati izbor metoda posmatranja ili eksperimentalnih metoda (ispitanici ili eksperimentalne životinje, uključujući kontrolne). Identifikovati metode, aparaturu (ime i adresa proizvođača u zagradi) i proceduru, dovoljno detaljno da se drugim autorima omogući reprodukcija rezultata. Navesti podatke iz literature za uhodane metode, uključujući i statističke. Tačno identifikovati sve primenjene lekove i hemikalije, uključujući generičko ime, doze i načine davanja. Za ispitivanja na ljudima i životinjama navesti saglasnost etičkog komiteta.

Rezultate prikazati logičkim redosledom u tekstu, tabelama i ilustracijama. U tekstu naglasiti ili sumirati samo značajna zapažanja.

U **diskusiji** naglasiti nove i značajne aspekte studije i izvedene zaključke. Posmatranja dovesti u vezu sa drugim relevantnim studijama, u načelu iz poslednje tri godine, a samo izuzetno i starijim. Povezati zaključke sa ciljevima rada, ali izbegavati nesumnjive tvrdnje i one zaključke koje podaci iz rada ne podržavaju u potpunosti.

Literatura

Literatura se u radu citira kao superskript, a popisuje rednim brojevima pod kojima se citat pojavljuje u tekstu. Navode se svi autori, ali ako broj prelazi šest, navodi se prvih šest i dodaje et al. Svi podaci o citiranoj literaturi moraju biti tačni. Literatura se u celini citira na engleskom jeziku, a iza naslova se navodi jezik članka u zagradi. Ne prihvata se citiranje apstrakata, sekundarnih publikacija, usmenih saopštenja, neobjavljenih radova, službenih i poverljivih dokumenata. Radovi koji su prihvaćeni za štampu, ali još nisu objavljeni, navode se uz dodatak „u štampi“. Rukopisi koji su predati, ali još nisu prihvaćeni za štampu, u tekstu se citiraju kao „neobjavljeni podaci“ (u zagradi). Podaci sa *Interneta* citiraju se uz navođenje datuma.

Primeri oblika referenci

Durović BM. Endothelial trauma in the surgery of cataract. *Vojnosanit Pregl* 2004; 61(5): 491–7. (Serbian)

Balint B. From the haemotherapy to the haemomodulation. Beograd: Zavod za udžbenike i nastavna sredstva; 2001. (Serbian)

Mladenović T, Kandolf L, Mijušković ŽP. Lasers in dermatology. In: *Karadaglić D*, editor. *Dermatology*. Beograd: Vojnoizdavački zavod & Verzal Press; 2000. p. 1437–49. (Serbian)

Christensen S, Oppacher F. An analysis of Koza's computational effort statistic for genetic programming. In: *Foster JA, Lutton E, Miller J, Ryan C, Tettamanzi AG*, editors. *Genetic programming*. EuroGP 2002: Proceedings of the 5th European Conference on Genetic Programming; 2002 Apr 3–5; Kinsdale, Ireland. Berlin: Springer; 2002. p. 182–91.

Abood S. Quality improvement initiative in nursing homes: the ANA acts in an advisory role. *Am J Nurs [serial on the Internet]*. 2002 Jun [cited 2002 Aug 12]; 102(6): [about 3 p.]. Available from: <http://www.nursingworld.org/AJN/2002/june/Wawatch.htm>

Tabele

Sve tabele štampaju se sa proredom 1,5 na posebnom listu hartije. Obeležavaju se arapskim brojevima, redosledom pojavljivanja, u desnom uglu (**Tabela 1**), a svakoj se daje kratak naslov. Objašnjenja se daju u fus-noti, ne u zaglavlju. Za fus-notu koristiti sledeće simbole ovim redosledom: *, †, ‡, §, ||, ¶, **, ††, Svaka tabela mora da se pomene u tekstu. Ako se koriste tuđi podaci, obavezno ih navesti kao i svaki drugi podatak iz literature.

Ilustracije

Slikama se zovu svi oblici grafičkih priloga i predaju se u tri primerka i na disketi (CD). Fotografije treba da budu oštre, na glatkom i sjajnom papiru, do formata dopisnice. Slova, brojevi i simboli treba da su jasni i ujednačeni, a dovoljne veličine da prilikom umanjivanja budu čitljivi. Na svakoj slici treba na poleđini, tankom grafitnom olovkom, označiti broj slike, ime prvog autora i gornji kraj slike. Slike treba obeležiti brojevima, onim redom kojim se navode u tekstu (**Sl. 1**; **Sl. 2** itd.). Ukoliko je slika već negde objavljena, obavezno citirati izvor.

Legende za ilustracije pisati na posebnom listu hartije, koristeći arapske brojeve. Ukoliko se koriste simboli, strelice, brojevi ili slova za objašnjenje pojedinog dela ilustracije, svaki pojedinačno treba objasniti u legendi. Za fotomikrografije navesti unutrašnju skalu i metod bojenja.

Skraćenice i simboli

Koristiti samo standardne skraćenice, izuzev u naslovu i apstraktu. Pun naziv sa skraćenicom u zagradi treba dati kod prvog pominjanja u tekstu.

Detaljno uputstvo može se dobiti u redakciji ili na sajtu:
www.vma.mod.gov.rs/vsp/download/uputstvo_za_autore.pdf.

INSTRUCTIONS TO AUTHORS

Vojnosanitetski pregljed (VSP) publishes only previously neither published nor submitted papers in any other journals in the order determined by the Editorial Board. The following should be enclosed with the manuscript: a statement that the paper has not been submitted or accepted for publication elsewhere; a consent signed by all the authors that the paper could be submitted; the name, exact address, phone number, and e-mail address of the first author and co-authors. VSP reserves all copyrights.

Papers should be sent to: Military Medical Academy, Institute for Scientific Information, Crnotravska 17, 11040 Belgrade, Serbia & Montenegro, for "Editorial Board of VSP."

VSP publishes: **editorials, original articles, short communications, reviews/meta-analyses, case reports**, from the **medical history** (general or military), personal views, invited comments, letters to the editor, reports from scientific meetings, book reviews, extensive abstracts of interesting articles from foreign language journals, and other contributions. Papers are published in Serbian or English with abstracts in both languages, and the selected ones fully in English for original articles, short communications, meta-analyses and case reports.

General review papers type will be accepted by the Editorial Board only if the authors prove themselves as the experts in the fields they write on by citing not less than 5 self-citations.

Papers should be written on IBM-compatible PC, using 12 pt font, and double spacing, and printed on the laser, or other high-quality printer without any corrections, on white bond paper ISO A4 (212×297 mm) with at least 4 cm left margin. **Bold** and *italic* letters should be avoided. Observational and experimental articles, reviews and meta-analyses, should not exceed 16 pages (including tables and illustrations); case reports – 6; short communications – 5; letters to the Editor, reports on scientific meetings and book reviews – 2.

All measurements should be reported in the metric system in terms of the International System of Units (SI). Standard, internationally accepted terms should be used. Papers should be submitted on a diskette (CD) in triplicate (original and two copies).

Authors are requested to submit the final version of manuscript approved for publishing with tables and illustrations on a 3.5" virus free diskette or a CD. **MS Word for Windows** (97, 2000, XP, 2003) is recommended for word processing; other programs are to be used only exceptionally. Illustrations should be made using standard **Windows** programs. Avoid the use of colors in graphs.

Papers are reviewed anonymously by at least two editors and/or invited reviewers. Remarks and suggestions are sent to the author for final composition. Galley proofs are sent to the first author for corrections that should be returned within 5 days. Manuscripts accepted for publication are not being returned.

Preparation of manuscript

Parts of the manuscript are: **Title page; Abstract with key words; Text; References.**

1. Title page

- The title should be concise but informative. Subheadings should be avoided;
- full name of each author;
- name and place of department(s) and institution(s) of affiliation, clearly marked by standard footnote signs.

2. Abstract and key words

The second page should carry a structured abstract with the title for original articles, meta-analyses and case reports. The abstract should state the purposes of the study or investigation, basic procedures (selection of study subjects or laboratory animals; observational and analytical methods), main findings (giving specific data and their statistical significance, if possible), and the principal conclusions. It should emphasize new and important aspects of the study or observations. **Structure** abstract should contain typical subtitles: *background/aim, methods, results and conclusion*. The abstract for meta-analyses and original papers should have up to 450 words, and up to 150 words for case reports (with subtitles *background, case report, conclusion*). Below the abstract authors should provide, and identify as such, 3–10 key words or short phrases that will assist indexers in cross-indexing the article and will be published with the abstract.

3. Text

The text of original articles is divided into sections with the headings: **Introduction, Methods, Results, and Discussion**. Long articles may need subheadings within some sections to clarify their content.

In the **Introduction** repeat the title of the article, excluding the names of authors. State the purpose of the article and summarize the rationale for the study or observation. Give only strictly pertinent references and do not include data or conclusions from the work being reported.

Methods. Describe your selection of the observational or experimental subjects (patients or experimental animals, including controls) clearly. Identify the methods, apparatus (manufacturer's name and address in parentheses), and procedures in sufficient detail to allow other workers to reproduce the results. Give references to established methods, including statistical methods. Identify precisely all drugs and chemicals used, with generic name(s), dose(s), and route(s) of administration. State the approval of the Ethics Committee for the tests in humans and animals.

Results should be presented in logical sequence in the text, tables and illustrations. Emphasize or summarize only important observations.

Discussion is to emphasize the new and important aspects of the study and the conclusions that result from them. Relate the observations to other relevant studies. Link the conclusions with the goals of the study, but avoid unqualified statements and conclusions not completely supported by your data.

References

References should be superscripted and numbered consecutively in the order in which they are first mentioned in the text. **The references must be verified by the author(s) against the original document.** List all authors, but if the number exceeds 6, give 6 followed by et al. Do not use abstracts, secondary publications, oral communications, unpublished papers, official and classified documents. References to papers accepted but not yet published should be designated as "in press". Information from manuscripts not yet accepted should be cited in the text as "unpublished observations". References are cited according to the **International Committee of Medical Journal Editors. Uniform Requirements for Manuscripts Submitted to Biomedical Journals. Ann Intern Med 1997; 126: 36–47. Updated October 2001.**

Examples of references:

Jurhar-Pavlova M, Petlichkovski A, Trajkov D, Efinanska-Mladenovska O, Arsov T, Strezova A, et al. Influence of the elevated ambient temperature on immunoglobulin G and immunoglobulin G subclasses in sera of Wistar rats. *Vojnosanit Pregl* 2003; 60(6): 657–612.

DiMaio VJ. Forensic Pathology. 2nd ed. Boca Raton: CRC Press; 2001.

Blinder MA. Anemia and Transfusion Therapy. In: Ahya NS, Flood K, Paranjothi S, editors. *The Washington Manual of Medical Therapeutics*, 30th edition. Boston: Lippincott, Williams and Wilkins; 2001. p. 413-428.

Christensen S, Oppacher F. An analysis of Koza's computational effort statistic for genetic programming. In: *Foster JA, Lutton E, Miller J, Ryan C, Tettamanzi AG*, editors. Genetic programming. EuroGP 2002: Proceedings of the 5th European Conference on Genetic Programming; 2002 Apr 3-5; Kinsdale, Ireland. Berlin: Springer; 2002. p. 182-91.

Abood S. Quality improvement initiative in nursing homes: the ANA acts in an advisory role. *Am J Nurs* [serial on the Internet]. 2002 Jun [cited 2002 Aug 12]; 102(6): [about 3 p.]. Available from: <http://www.nursingworld.org/AJN/2002/june/Wawatch.htm>

Tables

Type each table double-spaced on a separate sheet. Number tables consecutively in the order of their first citation in the text in the upper right corner (**Table 1**) and supply a brief title for each. Place explanatory matter in footnotes, using the following symbols, in this sequence: *, †, ‡, §, ||, ¶, **, ††, Each table has to be mentioned in the text. If you use data from another source, acknowledge fully.

Illustrations

Figures are submitted in triplicate, and for the final version also on diskette/CD. Photos should be sharp, glossy black and white photographic prints, not larger than 203 × 254 mm. Letters, numbers, and symbols should be clear and even throughout and of sufficient size that when reduced for publication, each item will still be legible. Each figure should have a label on its back indicating the number of the figure, author's name, and top of the figure. If a figure has been published, acknowledge the original source.

Legends for illustrations are typed on a separate page, with arabic numerals corresponding to the illustrations. Identify and explain each one clearly in the legend symbols, arrows, numbers, or letters used to identify parts of the illustrations. Explain the internal scale and identify the method of staining in photomicrographs.

Abbreviations and symbols

Use only standard abbreviations. Avoid abbreviations in the title and abstracts. The full term for which an abbreviation stands should precede its first use in the text.

Detailed Instructions are available at the web site: www.vma.mod.gov.rs/vsp/download/instructions_to_authors.pdf.



VOJNOSANITETSKI PREGLED
VOJNOMEDICINSKA AKADEMIJA
Crnotravska 17, 11040 Beograd, Srbija
Tel/Fax: +381 11 2669689
vmaini1@EUnetr.rs
vmavsp@hotmail.com

Časopis „Vojnosanitetski pregled“ izlazi godišnje u 12 brojeva. Godišnja pretplata za 2010. godinu iznosi: 4 000 dinara za građane Srbije, 8 000 dinara za ustanove iz Srbije i 150 € za strane državljanke i ustanove. Sredstva se uplaćuju na tekući račun Vojnomedicinske akademije Beograd kod Uprave za javna plaćanja u Beogradu broj: **840-941621-02 VMA (za Vojnosanitetski pregled ili za VSP), PIB 102116082**. Uplatnicu (dokaz o uplati) dostaviti lično ili poštom (pismom, faksom, *e-mail*-om). Za zaposlene u MO i Vojsci Srbije moguća je i pretplata u 12 mesečnih rata putem trajnog naloga, tj. „odbijanjem od plate“. Popunjen obrazac poslati na adresu VSP-a.

PRIJAVA ZA PRETPLATU NA ČASOPIS „VOJNOSANITETSKI PREGLED“

Ime i prezime ili naziv ustanove	
Jedinstveni matični broj građana	
Poreski identifikacioni broj (PIB) za ustanove	
Mesto	
Ulica i broj	
Telefon / telefaks	
Pretplata na časopis „Vojnosanitetski pregled“ (zaokružiti):	
1. Lično. Dokaz o pretplati dostavljam uz ovu prijavu.	
2. Za pripadnike MO i Vojske Srbije: Dajem saglasnost da se prilikom isplate plata u Računovodstvenom centru MO iz mojih prinadležnosti obustavlja iznos mesečne rate (preplate).	
3. Virmanom po prijemu profakture.	
Datum _____	Potpis _____



VOJNOSANITETSKI PREGLED
VOJNOMEDICINSKA AKADEMIJA
Crnotravska 17, 11040 Beograd, Srbija
Tel/Fax: +381 11 2669689
vmaini1@EUnetr.rs
vmavsp@hotmail.com

Časopis „Vojnosanitetski pregled“ izlazi godišnje u 12 brojeva. Godišnja pretplata za 2010. godinu iznosi: 4 000 dinara za građane Srbije, 8 000 dinara za ustanove iz Srbije i 150 € za strane državljanke i ustanove. Sredstva se uplaćuju na tekući račun Vojnomedicinske akademije Beograd kod Uprave za javna plaćanja u Beogradu broj: **840-941621-02 VMA (za Vojnosanitetski pregled ili za VSP), PIB 102116082**. Uplatnicu (dokaz o uplati) dostaviti lično ili poštom (pismom, faksom, *e-mail*-om). Za zaposlene u MO i Vojsci Srbije moguća je i pretplata u 12 mesečnih rata putem trajnog naloga, tj. „odbijanjem od plate“. Popunjen obrazac poslati na adresu VSP-a.

PRIJAVA ZA PRETPLATU NA ČASOPIS „VOJNOSANITETSKI PREGLED“

Ime i prezime ili naziv ustanove	
Jedinstveni matični broj građana	
Poreski identifikacioni broj (PIB) za ustanove	
Mesto	
Ulica i broj	
Telefon / telefaks	
Pretplata na časopis „Vojnosanitetski pregled“ (zaokružiti):	
1. Lično. Dokaz o pretplati dostavljam uz ovu prijavu.	
2. Za pripadnike MO i Vojske Srbije: Dajem saglasnost da se prilikom isplate plata u Računovodstvenom centru MO iz mojih prinadležnosti obustavlja iznos mesečne rate (preplate).	
3. Virmanom po prijemu profakture.	
Datum _____	Potpis _____

