

ČASOPIS UDRUŽENJA ANESTEZISTA
REANIMATORA I TRANSFUZISTA SRBIJE



ANESTEZIJA
REANIMACIJA
TRANSFUZIJA

BEOGRAD
2019

Časopis Udruženja anesteziologa, reanimatora i transfuzista Srbije

Glavni i odgovorni urednik: Dragoslav Itov

Uredivački odbor: Draga Udovica
Radivoje Milovanović
Ninoslav Stojković

Recenzenti: Prof. dr Bela Balint- dopisni član SANU
Dr sc. med. Gradimir Bogdanović
VNS dr Mirjana Kovač
N sar. dr Nataša Vavić
Dr sc. med. Olivera Savić
Prim. dr sc. med. Snežana Jovanović-Srzić
Dr sc. med. Sanja Bogdanović
Prof. dr Maja Šurbatović
Doc. dr Dragan Đorđević
Prof. dr Nebojša Lađević
Prof. dr Dušan Vučetić
Prof. dr Slađana Anđelić
N sar. dr Zoran Stanojković
Dr Zdravko Brkan, anesteziolog
Dr Ana Popadić, anesteziolog
Dr Aleksandar Vranjanac, anesteziolog

Časopis izlazi kao dvobroj: Tiraž : 300

Štampa: ACTION PRO , Beograd

Predsednik Udruženja: Draga Udovica

Izdaje: Udruženje anesteziologa, reanimatora i
transfuzista Srbije
Beograd, Svetog Save 39

S A D R Ź A J

THE CONCEPT AND PRACTICE OF LIVING CELL CRYOPRESERVATION

Bela Balint, Mirjana Pavlovic,
Milena Todorovic 7

IMPEDANCE AGGREGOMETRY AS AN INDEPEPENDENT PREDICTOR OF INCREASED PERIOPERATIVE BLEEDING IN CARDIAC SURGERY

Zoran Stanojković , Ana Antić ,
Milan Lazarević, Miodrag Vučić 21

MONITORING OF PLATELET FUNCTION

Ana Antić, Zoran Stanojković,
Miodrag Vučić, Milan Lazarević 31

REVIEW OF PULMONARY ARTERIOLE HYPERTENSION (PAH) WITH AN EMPHASIS ON TREATMENT METHODS INVOLVING BIOENGINEERING

Kristina Fritz, Milena Todorovic,
Bela Balint, Mirjana Pavlovic 43

FUNKCIONISANJE I AKREDITACIJA CENTRA ZA TRANSPLANTACIJU MATIČNIH ČELIJA U KONTEKSTU IMPLEMENTACIJE ISO STANDARDA

Milena Todorović Balint, Bela Balint ,
Irena Đunić, Mirjana Pavlović ,
Milena Šantrić Milićević 59

HEMOTERAPIJA: AUTENTIČNI PRI- STUPI KONCENTROVANI ERITROCITI, TROMBOCITI, KRIOPRECIPITAT, FIBRINSKI LEPAK I SELEKTIVNA AFEREZA

Bela Balint, Milena Todorović, Snežana Janković,
Dragica Samardžić, Tamara Devrnja, Jelena Žunić,
Dušan Vučetić, Gordana Ostojić, Marika Ljubenov,
Mirjana Pavlović 71

SELEKTIVNI IGA NEDOSTATAK I TRANSFUZIJA KRV I

- PRIKAZ SLUČAJA -
Ivana Pešić Stevanović, Marika Ljubenov,
Željko Miković97

PERIOPERATIVNA HIPOTERMIJA KROZ VREME

Snježana Zeba, Katarina Mladenović,
Goran Rondović103

ŠTETAN UTICAJ PERIOPERATIVNE HIPOTERMIJE NA KOAGULACIJU I GUBITAK KRV I

Snježana Zeba, Goran Rondović,
Katarina Mladenović 111

IMUNOMONITORING FUNKCIJE MONOCITA I NEUTROFILA KOD KRITIČNO OBOLELIH PACIJENATA SA SEPSOM

Goran Rondović, Katarina Mladenović,
Snježana Zeba 119

TRANSKRANIJALNA STIMULACIJA ELEKTRIČNOM STRUJOM (tSJS) KAO ADJUVANTNA METODA U TERAPIJI AKUTNOG POSTOPERATIVOG BOLA

Katarina Mladenović, Goran Rondović,
Snježana Zeba 127



THE CONCEPT AND PRACTICE OF LIVING CELL CRYOPRESERVATION

Bela Balint^{1,2,3}, Mirjana Pavlovic⁴, Milena Todorovic⁵

¹ Department of Medical Sciences, Serbian Academy of Sciences and Arts;

² Department of Transfusion Medicine, Institute of Cardiovascular Diseases "Dedinje";

³ Institute for Medical Research, University of Belgrade, Serbia;

⁴ Department of Computer and Electrical Engineering and Computer Science, FAU, FL, USA;

⁵ Clinic for Hematology, Clinical Center of Serbia, Belgrade, Serbia.

Keywords: Blood Cells, Stem Cells, Cryopreservation

Abstract

The attractive field of stem cell research raised extensive number of questions suggesting that remarkable peace of work is expected to be done in the next decade(s). Thus, within the next period, a majority of researchers believe stem cell-based applications will be used for treatment not only of hematological diseases and other cancers, immune-mediated disorders, but for the therapy of heart disease, diabetes mellitus, Parkinson's disease, etc.

Recent extensive application of various cell-mediated therapeutic approaches has resulted in increased needs for both specific blood-derived cells and operating procedures to get a minimized cell damages during their collection, processing and storage in liquid or frozen state.

The aim of cryoinvestigations is to minimize cell injuries during the freeze/thaw process (cryoinjury). Cryoinjuries may be the result of extensive cell dehydration and/or intracellular ice crystallization. The basic goal of cryopreservation is to maintain the cell viability – which may be defined as the ability of cells to perform their normal or near-normal function when transfused or transplanted. Generally, postthaw cell recovery is superior when the most appropriate freezing procedure and the best cryoprotective agent (cryoprotectant) are used. For blood progenitor or cell cryopreservation, glycerol, dimethyl sulfoxide (DMSO) and hydroxyethylstarch (HES) are regularly used, although in different concentrations.

Despite the fact that cell freezing practice is already in routine use, some questions related to the optimal living cell cryopreservation are still unresolved.

This review briefly recapitulates the current knowledge on cell cryoinjuries and effects of cryoprotectants, as well as the conceptual and practical aspects of SC and platelet, as well as lymphocyte cryopreservation. In addition, recent activities in cryopractice, including our results obtained by the controlled-rate system versus uncontrolled-rate freezing in experimental and clinical settings will be summarized.

Cell preservation – liquid versus frozen state storage

Cryobiology is a scientific discipline that estimates the effects of ultra-low temperature on cell integrity and functionality in the "refriger-

ated biological system" (cryobiosystem) and determines data/facts applicable in cryopractice. While the goal of the cell culturing is to keep cells in as near normal conditions as possible by supplying nutrients essential for their metabolism, cooling/freezing is an effort to

reduce the necessity of cells for energy. Precisely, after cooling, the need of cells for energy production (ATP synthesis) and its consumption (for protein synthesis, ion transport and other biochemical activities) is decreased (2). Cryopreservation is beneficial when cells appear to be biologically, chemically or thermally unstable after liquid-state storage. Its primary purpose is to obtain both better cell recovery and well postthaw viability. Thus, cryopreservation includes specific approaches and techniques designed to extend "therapeutic shelf-life" of the cells (prolonged storage-time) and to obtain minimum thermal damage (cryoinjury) (1).

Generally, cell preservation methods could be categorized as: (a) a liquid-state storage at hypothermic temperatures, but $> 0^{\circ}\text{C}$ (usually $4 \pm 2^{\circ}\text{C}$) for red blood cells and leukocytes or seldom for hematopoietic stem cells (SCs) up to 48 hours; (b) a frozen-state storage (-80°C to -196°C), the so called cryopreservation (1). The use of cryobiology for isolated cell

preservation began in 1949 with the freezing of living animal sperm cells, using glycerol as a cryoprotectant (3). Afterwards, glycerol and DMSO techniques were applied for cryopreservation of different blood-derived cells (3–9). The basic goal of these initial cryoinvestigations was to predict the cell response to freeze/thaw processes and cryoprotectant addition/removal. However, evaluation of cryobiological variables (biophysical, physicochemical and other parameters responsible for cryoinjury), as well as standardization of practical aspects of cryopreservation is still a question of large interest to researchers and practitioners (10–17).

Although SC cryopreservation is now in routine use, certain freezing aspects should be revised to optimize specific cryobiosystem, i.e. to minimize the cryoinjury and maximize cell recovery (10–16). Microprocessor-restricted (controlled-rate) freezing is a time-consuming process, which requires high-level technical expertise (Figures 1a–c).

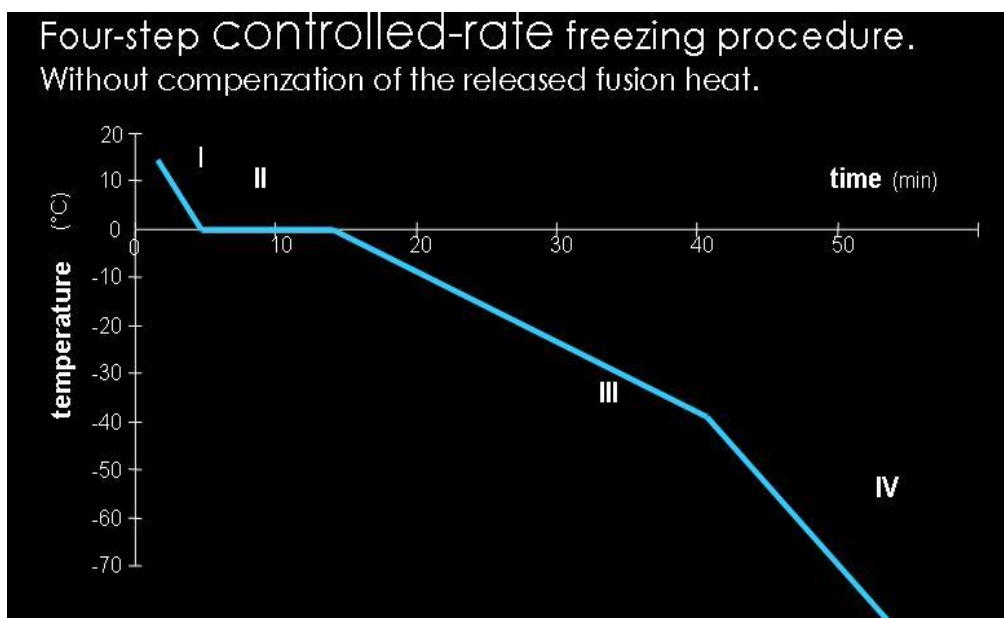


Figure 1a. Four-step controlled-rate SC freezing

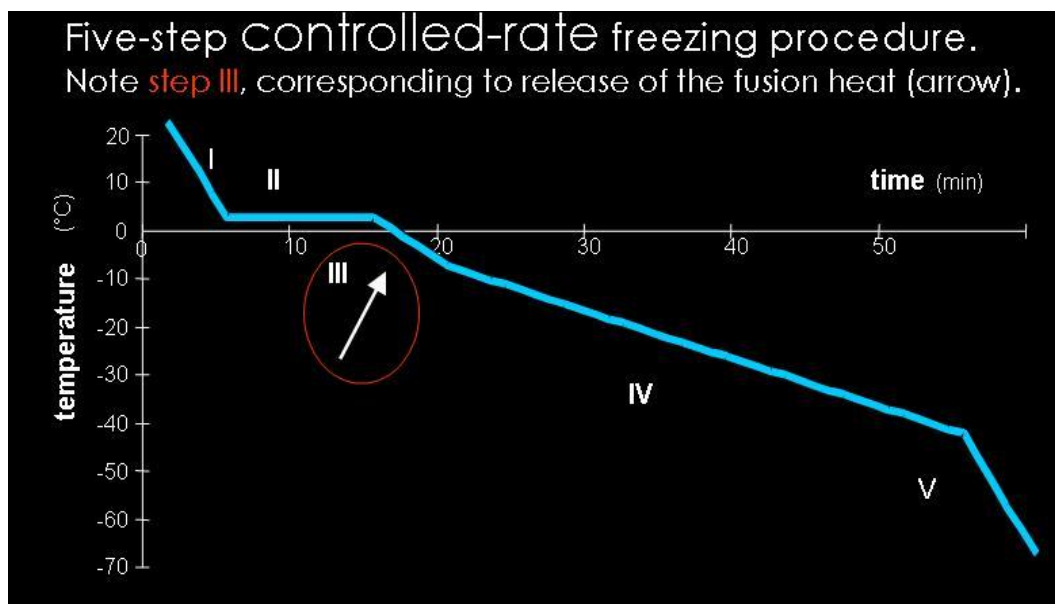


Figure 1b. Five-step controlled-rate SC freezing with compensated fusion heat

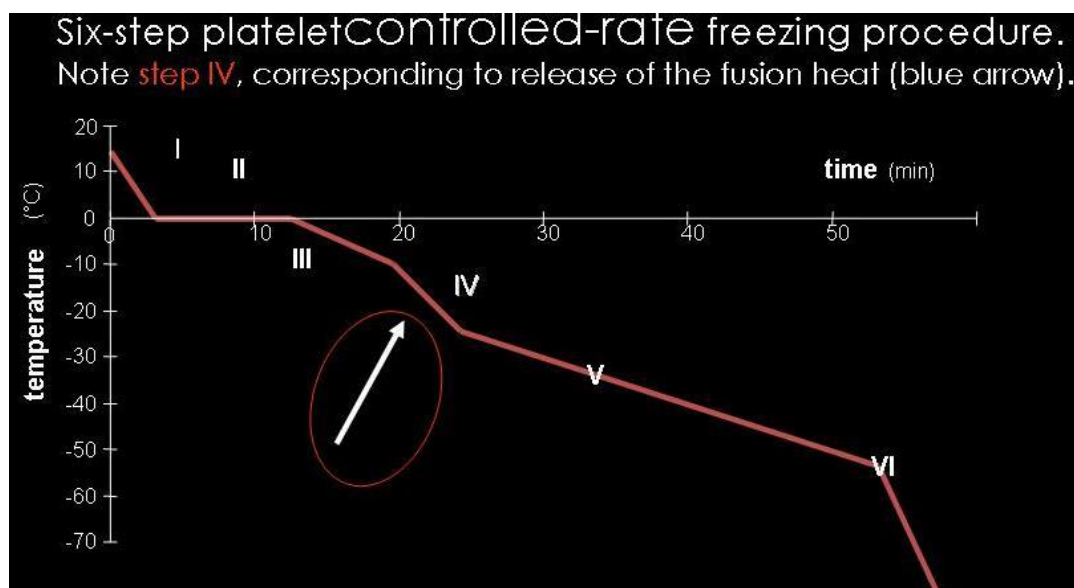


Figure 1c. Six-step controlled-rate platelet freezing with compensated fusion heat

There is discrepancy concerning the need for the use of controlled-rate freezing (vs. uncontrolled-rate) for lymphocyte cryopreservation. Thus, Montanari et al. (13) and Lakota et al. (14) demonstrated that the simple -80°C freezing and storage method, combined with

extracellular (HES) and intracellular (DMSO) cryoprotectants, is practical and it preserves well functionality of dendritic cells, monocytes and lymphocytes. Also, it is confirmed that excellent T cell recovery was obtained at each cryostorage period, indicating that cell

loss occurred due to the freezing process rather than the duration of storage time. They also showed that cryopreservation could well maintain the T cell cytokine-producing activity (10–12).

Uncontrolled-rate ("dump-freeze" without programmed cooling rate) technique is less costly because it does not require a programmed freezing-device (Figures 2a–b) (13, 25–27).



Figure 2a. Uncontrolled-rate cell freezing procedure



Figure 2b. Controlled-rate/uncontrolled-rate freezing and SC storage at -140 °C

Briefly, there are data (13, 19–24) that controlled-rate method is a high-class alternative to uncontrolled-rate technique (25–27) due to superior quantitative and functional cell recovery.

For obtaining an effective cryopreservation,

besides optimized freezing method, the choice and use of appropriate cryoprotective agents is required. At present, for SC and platelet freezing, DMSO and HES are commonly used as cryoprotectants, although in different concentrations (14–16, 23–36).

The next part of this manuscript recapitulates the recent knowledge on cell cryoinjuries and effects of cryoprotectants, as well as the conceptual and practical aspects of SC cryopreservation. In addition, recent activities in cryopractice, including our results obtained by the controlled-rate system (with compensated fusion heat) vs. uncontrolled-rate freezing ("dump-freezing" technique) in experimental and clinical settings will be summarized.

Origin and mechanisms of cell cryoinjuries

As mentioned, the object of basic cryoinvestigations have been to determine physicochemical and cryobiological parameters (including cell osmotic characteristics, water and cryoprotectant permeability coefficients) in the course of freezing, as well as to obtain better cell protection during cryopreservation.

Cryoinjuries can be manifested as cell lesions, caused by the reduction of selected functions to the complete cell destruction and/or cytolysis (4–9). Initially it has been considered that cryoinjuries are derived exclusively from the effect of extracellular ice crystals. In this sense, it has been proposed that the use of an adequately high freezing rate will help to avoid crystallization. However, a hypothetical

cooling rapidity, so high that it would not cause cell cryoinjury, could not be achieved in practice due to thermodynamic limitations of heat transfer. In addition, during the "ultra-rapid" cooling, despite the expectations, complete cell destruction occurred (4–10). At present it is considered that cryoinjuries result from the extensive volume reduction (cellular dehydration) and/or massive intracellular ice crystallization (mechanical damage) (6, 23, 32–34). Although independent, these mechanisms can also act together. The first event is expressed primarily at low-rate ($\leq 10^\circ\text{C}/\text{min}$) freezing, and the second one in high-rate ($\geq 10^\circ\text{C}/\text{min}$) freezing (10, 23).

During the low-rate freezing, extracellular crystallization occurs initially. These ice crystals do not cause mechanical cell damage (by membrane penetration) despite their physical presence (4–7, 10). However, crystallization produces a progressive osmotic pressure rise in extracellular area. Thus, extensive differences in the osmotic gradient (extracellular vs. intracellular) are formed, resulting in intensive intracellular water efflux. As a result, cells become dehydrated and the process is termed as "solution effect". Dehydration and hypertonicity cause cell volume reduction, malformations and finally cytolysis (Figure 3) (4–9, 21–23).

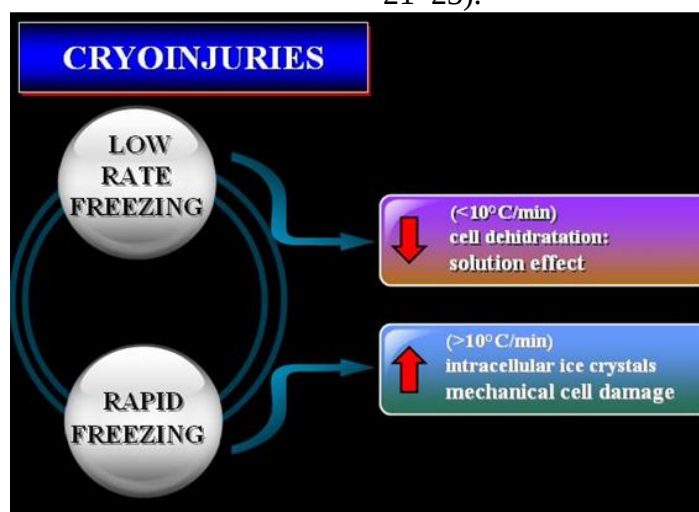


Figure 3. Cryoinjuries: during low-rate vs. rapid freezing procedures

As presented, at high-rate cooling (rapid cell freezing), the osmotic gradient has no time to develop, consequently dehydration and cell volume reduction are minimal. However, intracellular ice crystal formation/growth and cell destruction are the most critical effect. The process is named as "mechanical cell damage" (10, 23). The quantity of "free" intracellular water can be increased by the release of "bound" water. This process is called "water desorption". The degree of mechanical cell damage is related to the total intracellular ice mass and the size of ice crystals (4–10).

Generally, cryoinjuries may occur not only at freezing, but also due to ice "recrystallization" and/or "dilution shock" during thawing. Small ice crystals will either form crystal "agglomerates" or they will amplify their mass by "recrystallization" (10–12).

During intracellular "recrystallization" mechanical cell damage, while in the state of their extracellular occurrence cell dehydration will be expressed (4–10). Inversely, rapid ice thawing causes a considerable increase in the extracellular water mass and a subsequent osmotic pressure decrease. Due to that, but also due to cryoprotectant slow efflux from cells, an extensive water influx into the cells

("dilution shock" or "cell swelling") will occur. Otherwise, cells will be more sensitive to the increase, than to the decrease of its volume, thus they will be destroyed (10, 23).

Consequently, determination of an optimal freezing rate (specific for each cryobiosystem) should be considered. It is the speed of cooling high enough to prevent cell dehydration and adequately low to make possible efflux of water from the cell. It would be ideal to find a cooling rate just less than the one, which causes intracellular crystallization (10, 23). Optimal freezing rate is the function of the ratio between cell surface and volume, as well as of cell membrane permeability for water and its corresponding temperature coefficient – but it also depends on what type of cryopreservation strategy is applied (Figure 4).

Last but not least, a higher degree of cell destruction has occurred when transition period from liquid to solid phase (fusion heat releasing) is prolonged. The released heat of fusion – if not considered during controlled-rate freezing – could result in additional temperature fluctuation. That is why the period of transformation from liquid to solid phase will be prolonged, and its duration is directly related to the degree of cryoinjury (5–12, 23)



Figure 4. Device for controlled-rate freezing of isolated cells

Finally, in the course of rapid freezing, as stated, the quantity of "free" intracellular water can be increased as a result of "bound" water desorption. In accordance with this thermodynamic fact, more recently a small second peak of heat release was detected between -30°C and -40°C (17). We think that this "second heat release" might be partially caused due to water desorption and additional crystallization. Consequently, there is potential need for revision of some cryodynamic parameters specific for controlled-rate cryobiosystems.

Penetrating versus nonpenetrating cryoprotective agents

Determination of the optimal freezing

approach is essential, but it can not solve all problems related to cell cryoinjury. To be precise, postthaw cell recovery and viability are high only when cryoprotectants are present in the cryobiosystem. They efficiently prevent or reduce the degree of cell thermal damages.

As stated, the first applied cryoprotectant was glycerol (2). Later on, numerous substances (such as dimethyl sulfoxide – DMSO, hydroxyethylstarch – HES, dextran-based hydrogel) with useful cryoprotective capacity were described (28–31). One of them is DMSO, which demonstrated specific efficiency in the cryopreservation of SCs, platelets, lymphocytes and granulocytes (Figure 5).



Figure 5. DMSO as cryoprotective agent for SC and platelet cryopreservation

DMSO is a transparent (colorless) fluid with a sulfur-like smell. It is a very polar molecule, which dissolves many water-soluble and lipid-soluble substances. DMSO has exothermic properties and should be mixed slowly with the cell suspension to dissipate the generated heat. Given intravenously in (even in small concentrations) DMSO may cause certain un-

wanted effects such as nausea, vomiting, local vasospasm, etc (23, 33–44). Generally, cryoprotectants can be classified into nonpenetrating or extracellular and penetrating or intracellular compounds (30–32). Mechanisms of their action are complex and only partially recognized. Due to the differences in its chemical and other properties, it is not possible to

discover a cryoprotective mechanism common for all cryoprotectants. In brief, extracellular agents could protect cells during high-rate freezing, reducing the intracellular ice crystal formation. On the other hand, intracellular cryoprotectants could provide protection in the course of low-rate freezing, decreasing the degree of cell dehydration (10, 23, 32).

Penetrating cryoprotectants increase intracellular solute concentration, and lower the temperature at which ice crystals form (reduced or "delayed" ice crystallization). Applied cryoprotectants, in higher concentration (but below the critical cytotoxicity) as well as reduced temperature will result in the increase of intracellular viscosity. That is why the mobility of the water molecules and ice crystal formation and/or growth are slowed down. They decrease intracellular vs. extracellular osmotic gradient (reduced "solution effect") too (5–10). Finally, certain cryoprotectants can change directly the cell membrane permeability for water, thus influencing the degree of cell dehydration (23, 30–34).

Besides the effects on osmotic gradient, cryoprotectants have other mechanisms of action as well. The protective effect of penetrating cryoprotectants is obtained also due to their colligate effect, i.e. capacity for water binding (5–10). Glycerol and DMSO are the first-class acceptors of hydrogen bonds, accordingly they can strongly bind a high amount of water and they have a high cryoprotective capacity. Thus, cells can be stored at below freezing temperatures without excessive intracellular ice crystal formation and extreme cellular dehydration (10, 30–34).

Although the cryoprotectant penetration (across the cell membrane) ability is critical for cell protection, it can be obtained by rapidly (DMSO) and slowly penetrating (glycerol), as well as with nonpenetrating (HES) compounds. The temperature at cell is exposed to the cryoprotectant influence on the penetration rate also (23, 28–33).

The main nonpenetrating cryoprotectant is HES, a compound initially used (together with DMSO) for granulocyte freezing. HES have a higher molecular weight than DMSO and predominantly, it acts extracellularly at the time of low-rate freezing. There are reports showing that it is possible to cryopreserve different blood cells with HES and DMSO using controlled-rate or uncontrolled-rate freezing. Cells frozen by these methods have adequate postthaw recovery and viability (14, 15, 25–27, 32–34).

In summary, cryoprotectants can express protective effect by the reduction of cell dehydration, as well as by decreasing the intensity of intracellular crystallization. However, they can't protect cells from already existing excessive dehydration or from the effect of previously formed intracellular ice crystals.

Cryopreservation of stem cells – practical aspects

The completion of SC transplant requires both efficient collection (by aspirations from bone marrow or apheresis from peripheral or cord blood) and cryopreservation techniques for obtaining an adequate cell yield and recovery. For SC cryopreservation, there are several well known protocols, using primarily DMSO in autologous plasma, but in various concentrations (11, 33–37).

Most authors suggest that the optimal cooling rate during SC and platelet cryopreservation is approximately 1 °C/min, while according to the others it is 2–3 °C/min (17, 45–49). The transition from liquid to solid phase is also critical (because of releasing of the specific fusion heat), since a considerable reduction in cell viability has been observed when this period is prolonged. Thus, the optimal freezing rate for SCs has been shown to be 1 °C/min, with an elevated cooling rapidity during liquid to solid phase transition (from 0 °C to -10 °C) period (11).

There are data presenting that uncontrolled-rate freezing is also useful in SC cryopreservation (13–15, 25–27, 39, 40). However, this technique produces an "unbalanced" or "changeable" cooling rate (around or over 3°C/min). In addition, the freezing bag or canister configuration, as well as the volume of cell concentrate are critical parameters, which can radically modify the freezing velocity.

In practice, bone marrow SC cryopreservation consists of the following steps: (a) aspirate processing (red blood cell and plasma reduction); equilibration (cell exposure to cryoprotectant) and freezing; (b) cell storage at -90±5 °C (mechanical freezer), at temperature from -120 °C to -150 °C (mechanical freezer or steam of nitrogen) or at -196 °C (liquid nitrogen); and (c) cell thawing in a water bath at 37±3 °C (9).

The cryopreservation of peripheral blood vs. bone marrow derived SCs has to be adapted to conditions which depend on the: (a) higher mononuclear cell count; (b) presence of plasma proteins; (c) absence of lipid and bone particles in cell suspension (34).

Immediately after thawing in a water bath at 37±3 °C, cells are reinfused through a central venous catheter. Generally, patients tolerate the infusion of unprocessed SCs well, with no side effects (22, 33, 34, 43). However, the grade of the potential reinfusion-related toxicity is associated with DMSO quantity in the cell concentrate. Thus, the recovery of SCs cryopreserved by 5% DMSO reported by Abrahamsen et al. is rather impressive (18, 20). They showed that the use of 5% rather

than 10% DMSO results in an improved CD34+ cell recovery (low apoptotic and necrotic CD34+ cell fraction) with a high potential for in vivo engraftment and ex vivo manipulations of these cells. Similar findings were also reported by Rowley et al (15). Finally, there are reports (14, 27, 40) that DMSO concentrations lower than 5% (2.2 and 3.5% DMSO) are also sufficient for acceptable SC recovery.

Cryoprotective agent can be removed by washing after thawing, but this procedure results in substantial SC loss (10, 23, 34). The integrity of residual granulocytes is compromised within cryopreserved SCs and consequential DNA release during the thawing procedure may lead to cell "clumping" with resulting additional cell loss. To avoid this problem, a washing protocol by recombinant human deoxyribonuclease is recommended (37). The addition of deoxyribonuclease to cell concentrate seemingly proves to be effective in preventing "clumping" and it does not cause decreased expression of adhesion molecules, although it is not free of potential risks for patients. Moreover, the use of specific additives (e.g. membrane stabilizers) could improve postthaw cell recovery and it is probably a more effective approach than the decrease of DMSO concentration (50).

Our results (11, 21) are in agreement with the above mentioned studies. Namely, we have found that the recovery of mature population of the mature pluripotent and committed hematopoietic progenitors (CFU-Sd12 and CFU-GM) in the presence of 5% vs. 10% DMSO is superior (Figure 6).



Figure 6. CFU-Sd12 after SC transplants using controlled-rate cryopreservation (mice spleen model)

However, it has also been demonstrated that the recovery of very primitive pluripotent hematopoietic stem cells (Marrow Repopulating Ability – MRA) is better when 10% DMSO is used. These results imply a different "cryobiological request" of MRA cells in comparison with the nucleated cells and progenitors. Moreover, we have demonstrated that differences in cell recovery are not related to the changes in the total number of frozen/thawed cells, regardless of the use of cryopreservation strategy (11).

Our clinical studies showed that therapeutic use of the controlled-rate cryopreserved SCs in treatment of multiple myeloma, Hodgkin's and non-Hodgkin's lymphoma and extragonadal non-seminal germ cell tumor resulted with high 7-AAD functional recovery, as well as complete and long-term hematopoietic reconstitution following peripheral blood SC transplants – on the day 12 ± 2.3 in average, as presented in Figure 7 (10, 12).

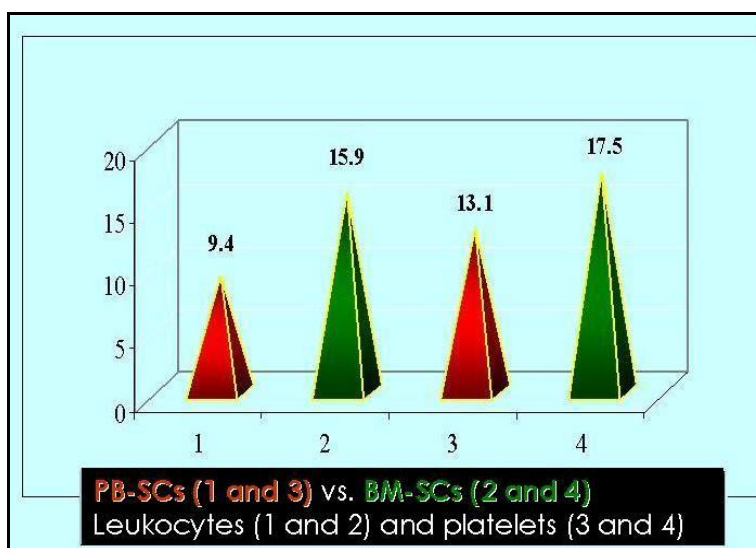


Figure 7. Hematopoietic reconstitution following SC transplants

Our criteria for hematopoietic reconstitution were: PMN count $> 0,5 \times 10^9/L$ and PLT number $> 20 \times 10^9/L$ of patients' peripheral blood in three consecutive posttransplant days.

*
* *

The intensifying of myeloablative therapy with SC rescue, as well as increase in the use of allogeneic SC transplantats and another cell-mediated therapeutic approaches have resulted in higher needs for both specific blood-derived cells and a practical operating procedures to minimize cell damage during collection and cryostorage. Cryobiosystem must effectively protect the biological and physical properties of cells that can be altered radically by the freezing/thawing process, and have to include techniques and materials appropriate for human use.

Nowadays a variety of different experimental and clinical freezing protocols are in practice,

implying that the optimal procedure is not defined yet. Certain cryobiological events and/or parameters responsible for cryoinjuries and techniques applicable in cryopractice should be revised or reengineered for optimization of the postthaw cell recovery and viability.

Although cryopreservation SCs and different blood cells represents one complex process and the number of potential questions is higher than the number of possible answers, considering ever increasing needs for blood cell support as well as ever-increasing use of different cell-mediated curative approaches, it should also find its rightful place in the current medical practice.

References

1. Balint B, Radovic M. Biophysical aspects of cryopreservation of hematopoietic stem and progenitor cells. *Bull Transfus* 1993; 21: 3–8.
2. Meryman HT. Cryopreservation of living cells: principles and practice. *Transfusion* 2007; 47: 935–45.
3. Polge C, Smith AU, Parkes AS. Revival of spermatozoa after vitrification and dehydration at low temperatures. *Nature* 1949; 164: 666.
4. Barnes DWH, Loutit JF. The radiation recovery factor: preservation by the Polge–Smith–Parkers technique. *J Nat Canc Inst* 1955; 15: 901–906.
5. Lovelock JE, Bishop MWH. Prevention of freezing damage to living cells by dimethyl-sulfoxide. *Nature* 1959; 183: 1394–5. Meryman HT. Mechanics of freezing in living cells and tissues. *Science* 1956; 124: 515–21
6. Mazur P. Theoretical and experimental effects of cooling and warming velocity on the survival of frozen and thawed cells. *Cryobiology* 1966; 2: 181–92.
7. Lewis JP, Passovoy M, Trobaugh FE. The transplantation efficiency of marrow cooled to $-100^{\circ}C$ at $2^{\circ}C$ per minute. *Cryobiology* 1966; 3: 47–52.
8. Litvan GG. Mechanism of cryoinjury in biological systems. *Cryobiology* 1972; 9: 181–91.
9. Pavlovic M, Balint B. *Stem Cells and Tissue Engineering*. New York: Springer; 2013.
10. Balint B, Ivanovic Z, Petakov M, et al. The cryopreservation protocol optimal for progenitor recovery is not optimal for preservation of MRA. *Bone Marrow Transplant* 1999; 23: 613–9.

11. Balint B, Paunovic D, Vucetic D, Vojvodic D, Petakov M, Trkuljic M, et al. Controlled-rate vs. uncontrolled-rate freezing as predictors for platelet cryopreservation efficacy. *Transfusion* 2006; 46(2): 230–5.
12. Montanari M, Capelli D, Poloni A, et al. Long-term hematologic reconstitution after autologous peripheral blood progenitor cell transplantation: a comparison between controlled-rate freezing and uncontrolled-rate freezing at 80 degrees C. *Transfusion* 2003; 43: 42–9.
13. Lakota J, Fuchsberger P. Autologous stem cell transplantation with stem cells preserved in the presence of 4.5 and 2.2% DMSO. *Bone Marrow Transplant* 1996; 18: 262–3.
14. Rowley SD, Feng Z, Chen L, et al. A randomized phase III clinical trial of autologous blood stem cell transplantation comparing cryopreservation using dimethylsulfoxide vs dimethylsulfoxide with hydroxyethylstarch. *Bone Marrow Transplant* 2003; 31: 1043–51.
15. Hubel A, Carlquist D, Clay M, McCullough J. Liquid storage, shipment, and cryopreservation of cord blood. *Transfusion* 2004; 44: 518–25.
16. Cohn CS, Dumont LJ, Lozano M, Marks DC, Johnson L, Ismay S, et al. Vox sanguinis international forum on platelet cryopreservation: Summary. *Vox Sang* 2017; 112(7): 684–8.
17. Abrahamsen JF, Rusten L, Bakken AM, Bruserud O. Better preservation of early hematopoietic progenitor cells when human peripheral blood progenitor cells are cryopreserved with 5 percent dimethylsulfoxide instead of 10 percent dimethylsulfoxide. *Transfusion* 2004; 44: 785–9.
18. Rowe AW, Rinfret AP. Controlled rate freezing of bone marrow. *Blood* 1962; 20: 636.
19. Abrahamsen JF, Bakken AM, Bruserud O. Cryopreserving human peripheral blood progenitor cells with 5-percent rather than 10-percent DMSO results in less apoptosis and necrosis in CD34+ cells. *Transfusion* 2002; 42: 1573–80.
20. Balint B, Ivanovic Z, Petakov M, et al. Evaluation of cryopreserved murine and human hematopoietic stem and progenitor cells designated for transplantation. *Vojnosanit Pregl* 1999; 56: 577–85.
21. Balint B, Taseski J. Cryopreservation of hematopoietic stem and progenitor cells. *Maked Med Pregl* 2000; 54: 80–4.
22. Balint B, Taseski J. Long-term storage of blood cells by cryopreservation. *Vojnosanit Pregl* 1999; 56: 157–66.
23. Balint B, Stamatovic D, Todorovic M, Elez M, Vojvodic D, Pavlovic M, Cucuz-Jokic M. Autologous transplant in aplastic anemia: quantity of CD34+/CD90+ subset as the predictor of clinical outcome. *Transf Apher Sci* 2011; 45(2): 137–41.
24. Stiff PJ, Koester AR, Weidner MK, et al. Autologous bone marrow transplantation using unfractionated cells cryopreserved in dimethylsulfoxide and hydroxyethyl starch without controlled-rate freezing. *Blood* 1987; 70: 974–8.
25. Clark J, Pati A, McCarthy D. Successful cryopreservation of human bone marrow does not require a controlled-rate freezer. *Bone Marrow Transplant* 1991; 7: 121–5.
26. Halle P, Tournilhac O, Knopinska-Posluszny W, et al. Uncontrolled-rate freezing and storage at -80 degrees C, with only 3.5-percent DMSO in cryoprotective solution for 109 autologous peripheral blood progenitor cell transplantations. *Transfusion* 2001; 41: 667–73.
27. Ahwood-Smith MJ. Preservation of mouse bone marrow at -79°C with dimethyl sulfoxide. *Nature* 1961; 190: 4782, 1204–5.
28. Rowe AW. Biochemical aspects of cryoprotective agents in freezing and thawing. *Cryobiology* 1966; 3: 12–8.

29. Meryman HT. Cryoprotective agents. *Cryobiology* 1971;8:173–83.
30. Pereira J, Ferraretto X, Patrat C, Meddahi-Pellé A. Dextran-based hydrogel as a new tool for BALB/c 3T3 cell cryopreservation without dimethyl sulfoxide. *Biopreserv Biobank* 2019; 17(1): 2–10.
31. Anderson J, Toh ZQ, Reitsma A, Do LAH, Nathanielsz J, Licciardi PV. Effect of peripheral blood mononuclear cell cryopreservation on innate and adaptive immune responses. *J Immunol Methods* 2019; 465: 61–6.
32. Gorin NC. Collection, manipulation and freezing of haemopoietic stem cells. *Clin Hematol* 1986; 15: 19–48.
33. Moroff G, Seetharaman S, Kurtz JW, Greco NJ, Mullen MD, Lane TA, Law P. Retention of cellular properties of PBPCs following liquid storage and cryopreservation. *Transfusion* 2004; 44: 245–52.
34. Limaye LS, Kale VP. Cryopreservation of human hematopoietic cells with membrane stabilizers and bioantioxidants as additives in the conventional freezing medium. *J Hematother Stem Cell Res* 2001;10:709–18.
35. Felix OMWO, Tunes G, Ginani VC, Simoes PC, Barros DP, Delbuono E, et al. The influence of cell concentration at cryopreservation on neutrophil engraftment after autologous peripheral blood stem cell transplantation. *Hematol Transfus Cell Ther* 2018; 40(3): 233–9.
36. Beck C, Nguyen XD, Kluter H, Eichler H. Effect of recombinant human deoxyribonuclease on the expression of cell adhesion molecules of thawed and processed cord blood hematopoietic progenitors. *Eur J Hematol* 2003; 70: 136–42.
37. Beaujean F, Hartmann O, Kuentz M, Le Forister C, Divine M, Duedari N. A simple efficient washing procedure for cryopreserved human hematopoietic stem cells prior to reinfusion. *Bone Marrow Transplant* 1991; 8: 291–4.
38. Makino S, Harada M, Akashik K, Taniguchi S, Shibuya T, Inaba S, et al. A simplified method for cryopreservation of PBSC at -80 °C without rate-controlled freezing. *Bone Marrow Transplant* 1991; 8: 239–44.
39. Halle P, Tournilhac O, Knopinska-Posluszny W, et al. Uncontrolled-rate freezing and storage at -80 degrees C, with only 3.5-percent DMSO in cryoprotective solution for 109 autologous peripheral blood progenitor cell transplantations. *Transfusion* 2001; 41: 579–80.
40. Marjanović S, Balint B, Stamatović D, Obradović S. Early treatment of extragonadal non-seminal germ cell tumor with high-doses chemotherapy support with autologous hematopoietic progenitor cell transplantation. *Arch Oncology* 1998; 6: 135–6.
41. Stamatovic D, Balint B, Todoric B, Marjanovic S, Lakic-Trajkovic Z, Malesevic M. Secondary allogeneic bone marrow transplantation in the patient with severe aplastic anemia following late graft rejection. *Vojnosanit Pregl* 2000; 57 (5 Suppl): 95–8.
42. Sauer-Heilborn A, Kadidlo D, McCullough J. Patient care during infusion of hematopoietic progenitor cells. *Transfusion* 2004; 44(6): 907–16.
43. Syme R, Bewick M, Stewart D, Porter K, Chadderton T, Gluck S. The role of depletion of dimethyl sulfoxide before autografting: on hematologic recovery, side effects, and toxicity. *Biol Blood Marrow Transplant* 2004; 10: 135–41.
44. Beck C, Nguyen XD, Kluter H, Eichler H. Effect of recombinant human deoxyribonuclease on the expression of cell adhesion molecules of thawed and processed cord blood hematopoietic progenitors. *Eur J Hematol* 2003; 70: 136–42.
45. Balint B. Stem cells – unselected or selected, unfrozen or cryopreserved: marrow repopulation capacity and plasticity potential

- in experimental and clinical settings. Macedonia. Maked Med Pregl 2004; 58 (Suppl 63): 22–4.
46. Spurr EE, Wiggins NE, Marsden KA, Lowenthal RM, Ragg SJ. Cryopreserved human hematopoietic stem cells retain engraftment potential after extended (5–14 years) cryostorage. Cryobiology 2002; 44(3): 210–7.
47. Mitrus I, Smagur A, Fidyk W, Czech M, Prokop M, Chwieduk A, et al. Reduction of DMSO concentration in cryopreservation mixture from 10% to 7.5% and 5% has no impact on engraftment after autologous peripheral blood stem cell transplantation: results of a prospective, randomized study. Bone Marrow Transplant 2018; 53(3): 274–80.
48. Meinke S, Wikman A, Gryfelt G, Hultenby K, Uhlin M, Höglund P, Sandgren P. Cryopreservation of buffy coat-derived platelet concentrates photochemically treated with amotosalen and UVA light. Transfusion 2018; 58(11): 2657–68.
49. Limaye LS, Kale VP. Cryopreservation of human hematopoietic cells with membrane stabilizers and bioantioxidants as additives in the conventional freezing medium. J Hematother Stem Cell Res 2001; 10: 709–1

**Corresponding author: Prof. Bela Balint, MD, PhD, SASA-member,
Serbian Academy of Sciences and Arts,
Knez Mihajlova 35,
11 000 Belgrade, Serbia
Tel: +381 64 2625 126
Email: balintbela52@yahoo.com**

IMPEDANCE AGGREGOMETRY AS AN INDEPENDENT PREDICTOR OF INCREASED PERIOPERATIVE BLEEDING IN CARDIAC SURGERY

Zoran Stanojković^{1,2}, Ana Antić¹, Milan Lazarević³, Miodrag Vučić^{2,4}

¹ Blood Transfusion Institute Niš, Serbia

² Medical Faculty Niš, University of Niš, Serbia

³ Clinic for Cardiovascular and Transplant Surgery, Clinical Center of Niš, Serbia

⁴ Clinic for Hematology, Clinical Center of Niš, Serbia

Abstract

Background/Aim. Preoperative evaluation of increased risk for perioperative bleeding is essential for cardiac surgery patients. Platelet aggregation, as a laboratory test for a platelet function, is very efficient for optimal antiplatelet treatment and also for assessment of the increased risk of postoperative bleeding and perioperative application of allogenic red blood cell transfusions. The aim of this study was to establish whether preoperative platelet function testing for the presence of residual antiplatelet effect of acetylsalicylate (ASA) on platelet aggregation can be correlated with an increased risk for intraoperative bleeding during cardiac interventions.

Patients and methods. A retrospective study included 60 patients who underwent surgical procedures (CABG II and CABG III) at the Department of Cardiovascular Surgery, Clinical Center in Niš in period November 2017-July 2018. Patients were previously taken ASA at a dose of 100 mg per day, but therapy was discontinued 5 days before surgery. Platelet aggregation was measured on the day of surgery using impedance aggregometer Multiplate (Multiplate Platelet Function Analyzer, Roche), using TRAP and ASPI tests. Patients were divided into two groups: Control group (CG), which included patients with preserved function of platelets (ASPI 790-1410 AU*min), and Examined group (EG), which included patients with inhibited platelet aggregation in ASPI test (<790 AU*min).

Results. There was statistically significant difference between values of ASPI test measured in both groups (1056±229,44 AU/min in CG vs. 416,7±195,95 AU/min in EG, $p<0.0001$). Patients in EG had a higher amount of blood loss perioperatively of 1527,5±637,74 ml compared with loss in CG of 980,6 ± 199,86 ml ($p<0.0001$), as well as the amount of autologous blood that was transfused intraoperatively (587,60 ± 210,87 ml in EG vs 388,3±76,07 ml in CG, $p<0.0001$). On the other hand, there was no statistically significant difference in the number of transfused allogenic blood units between CG and EG ($p>0,05$).

Conclusions. Residual effect of acetylsalicylates increases the risk of perioperative bleeding and therefore affects the overall survival of cardiac surgery patients. For this reason, preoperative testing of platelet aggregation should be a mandatory part of clinical practice.

Key words: impedance aggregometry; cardiac surgery; perioperative bleeding

Uvod/Cilj. Preoperativna procena povećanog rizika perioperativnog krvarenja je od suštinskog značaja za kardiohirurške pacijente. Agregacija trombocita, kao laboratorijski test za procenu funkcije trombocita, je vrlo efikasna za optimalno vođenje antitrombocitne terapije i, takođe, za procenu povećanog rizika postoperativnog krvarenja i perioperativne primene alogenih transfuzija. Cilj ovog istraživanja je bio da se utvrdi da li preoperativno ispitivanje funkcije trombocita u smislu prisustva antitrombocitnog efekta acetilsalicilne kiseline (ASK) pre same operacije može da pruži klinički važne informacije vezane za povećano intraoperativno krvarenje i porast broja transfuzija krvi.

Pacijenti i metode. Retrospektivnom studijom obuhvaćeno je 60 pacijenata kod kojih je rađen dvostruki aortokoronarni bajpas (CABG II) i trostruki "on-pump" bajpas (CABG III) na Klinici za kardiovaskularnu hirurgiju Kliničkog centra u Nišu od novembra 2017. do jula 2018. godine. Pacijenti su preoperativno koristili ASK u dozi od 100 mg dnevno, ali je terapija prekinuta 5 dana pre operacije. Agregacija trombocita je merena na dan operacije korišćenjem impedantnog agregometra Multiplate (Multiplate Platelet Function Analyzer, Roche), testovima TRAP i ASPI. Pacijenti su bili podeljeni u dve grupe: Kontrolnu grupu (KG), sa preoperativno nepromenjenom funkcijom trombocita (ASPI 790-1410 AU*min) i Ispitivnu grupu (IG), sa inhibiranom funkcijom trombocita u ASPI testu (<790 AU*min).

Rezultati. Postoji statistički značajna razlika u vrednostima ASPI testa između grupa ($1056 \pm 229,44$ AU/min u KG vs. $416,7 \pm 195,95$ AU/min u IG, $p < 0.0001$). Pacijenti u IG imali su veći perioperativni gubitak krvi od $1527,5 \pm 637,74$ ml u poređenju sa KG, gde je taj gubitak bio $980,6 \pm 199,86$ ml ($p < 0.0001$), kao i u količini autotransfundovane krvi intraoperativno ($587,60 \pm 210,87$ ml u IG vs $388,3 \pm 76,07$ ml u KG, $p < 0,0001$). S druge strane, nije bilo značajne razlike u broju alogenih transfuzija krvi između grupa (Mann Whitney U test, $p > 0.05$).

Zaključci. Rezidualni efekat ASK povećava rizik perioperativnog krvarenja i tako utiče na opšte preživljavanje kardiohirurških pacijenata. Iz tog razloga preoperativno ispitivanje funkcije trombocita treba da bude obavezan deo kliničke prakse.

Ključne reči: impedantna agregometrija; kardiohirurgija; perioperativno krvarenje

Introduction

Preoperative risk assessment for increased perioperative bleeding is essential for surgical patients, and especially for cardiac surgery patients. Specificity of operations on open heart does not just reflect in complexity of surgical action and the use of extracorporeal bloodstream which disturbs the hemostasis, but also in the fact that the patients were preoperatively treated with antiplatelet drugs (1). The standard preoperatively coagulation testings include prothrombin time (PT, INR) and activated partial thromboplastin time (aPTT), but does not give us insight what is happening

on the platelets level, which are one of the main factors of normal hemostasis (2).

Impaired platelet function is rarely congenital, the most often is acquired, commonly caused by medications. More than 100 years acetylsalicylic acid (ASA) is achieving the positive cardiovascular effect by inhibition of production of thromboxan A_2 (TxA_2), acting on enzymes cyclooxygenase 1 (COX-1) and cyclooxygenase 2 (COX-2), which perform conversion of arachidonic acid into TxA_2 . ASA effect on COX-1 is irreversible and lasts as long as platelets life, depending on platelets production which will enable the re-

covery of cyclooxygenase activity on approximately 10% daily in healthy people. Lower doses of ASA are sufficient to suppress more than 95% synthesis of thromboxane over COX-1, and such suppression leads to the inhibition of platelet aggregation. Higher doses of ASA can inhibit COX-2 mediated prostacyclin synthesis in endothelial cells (3).

While it is clearly proven usefulness of ASA in decreasing adverse ischemic events at patients with coronary artery disease, there are different views about preoperative abuse of ASA and its connection with increase risk for bleeding during cardiac surgery operations (4). It is recommended that preoperative ASA therapy must be discontinued 5-7 days before cardiac surgery intervention, in order to reduce the potential risks of perioperative bleeding. However, without testing platelets function there is no access in the possible disrupted function or presence of residual antithrombotic agents therapeutic effect, and especially taking into account each person individually respond to therapy (5).

In this sense, the performance of impedance platelet aggregometry and predicting the risk for increased bleeding depending precisely on platelet function, is one of the most important tests in preoperative preparation of patients (6). For this purpose we use semi-automatic impedance aggregometer (Multiplate analyzer, Dynabyte Medical, Germany) which analyzes platelet function from whole blood.

Aggregometry is applied for evaluating the platelet function and the effects of platelet inhibitors. It permits measuring of platelet aggregation after adding agonists, by detecting changes in electrical resistance in small volumes of whole blood. The increase of impedance due to attachment of platelets to the electrodes is transformed to aggregation units (AU). Reduced impedance implies platelet dysfunction or the presence of specific platelet

inhibitors. For example, the ASPI test is inhibited in the presence of ASA. The Multiplate analyzer has an important role in detecting and analyzing preoperative coagulopathies, caused by many drugs, routinely used in therapy of cardiovascular diseases (7).

Impedance aggregometry is very interesting issue for researchers world wide in past few years. Most of studies evaluated aggregometry and its role to predict bleeding after the cardiac surgery (8). On the other hand, authors tried to prove usefulness of the method for determining bleeding complications after cardiac surgery patients received thienopyridines (9). Also, in published studies in Republic of Serbia we could not find researches that investigated preoperative detection of residual antiplatelet effects of ASA and its influence on increased perioperative bleeding in cardiac surgery.

The aim of this study was to establish whether preoperative platelet function testing for the presence of residual antiplatelet effect of ASA before cardiac surgery itself may provide clinically important information that would be related to increased intraoperative bleeding and consequent increase in blood transfusions.

Methods

This retrospective study included 60 elective cardiac surgery patients operated between November 2017 and July 2018 at the Department of Cardiac surgery, Clinical Center Nis. The majority of patients were male, 45 (75%), and the female represented 15 (25%). Patients were aged between 47 and 77 years. Total of 32 (53.3%) patients underwent double coronary artery bypass grafting (CABG II), and 28 (46.6%) patients the triple elective on-pump coronary artery revascularization (CABG III).

The patients were on single therapy with ASA

(Aspirin, Cardipirin, Andol) in a daily dose of 100 mg before surgery. Based on the standard practice in our clinic, ASA were abolished five days before the scheduled surgery. Impedance aggregometry was performed on the day of surgery, and included a range of two tests: ASPI (assay for detecting platelet function after adding arachnidonic acid) and TRAP (assay for detecting platelet function after adding thrombin activating peptide).

Hemostasis screening that included PT, INR and APTT was made for all patients, within 7 days before surgery, and the average value for the study included patients ranged from 11.7 to 15.4 sec for PT, from 0.93 to 1.41 for INR, and from 22 to 37.9 sec for APTT.

On the day of surgery we determined the values of a complete blood count, estimated the value of blood volume (BV) based on body weight and height on the device for extracorporeal circulation (ECC), the amount of perioperative bleeding (in the reservoir device for blood salvage), the quantity of autologous blood and transfused allogenic blood during operation. The device used for intraoperative blood salvage was the Haemonetics Cell Saver 5 +, and the extracorporeal blood flow, perfusion system Terumo S1. Priming of ECC machine for all patients consisted of Sol. Hartmani 1500 ml, Sol. Manitoli 20% 250ml, Sol. NaHCO₃ 8.4% 100ml, high molecular weight heparin 5000 i.j. and 500 mg of tranexamic acid.

All patients were operated according to standard cardiac surgery protocols. That

means that all of them were systemically heparinized obtaining 400 IU/kg b.w. high molecular weight heparin (which were monitored during the operation by means of the activated clotting time (ACT)), and for reversal of heparin was administered the protamine sulfate in the ratio of 1:1.

Patients were separated into two groups:

1. CG (Control group), consisted of 31 patients (51.6%), without preoperative registration of impaired platelet function (Reference values: ASPI 790-1410 AU* min, TRAP 923-1509 AU* min).

2. EG (Examined group), 29 patients (48.3%) who had inhibited ASPI test before operation, defined as the values obtained below the lower reference limit for the ASPI test (<790 AU* min), while TRAP assay was in the referente range.

The function of the platelets was measured using impedance aggregometer, by increasing in the electrical impedance between the sensor electrodes coated with silver. Patient's blood was sampled in lithium-heparin tubes of 4 ml and analyzed within 30 min. After sampling, the blood was added at 37°C hot saline solution, and then to the test according to the different platelet agonists, and measured continuously (6 min) the platelet aggregation was obtained by reading the result that the aggregation is expressed in units per minute - AU min. (Figure 1). Tests used in this research were:

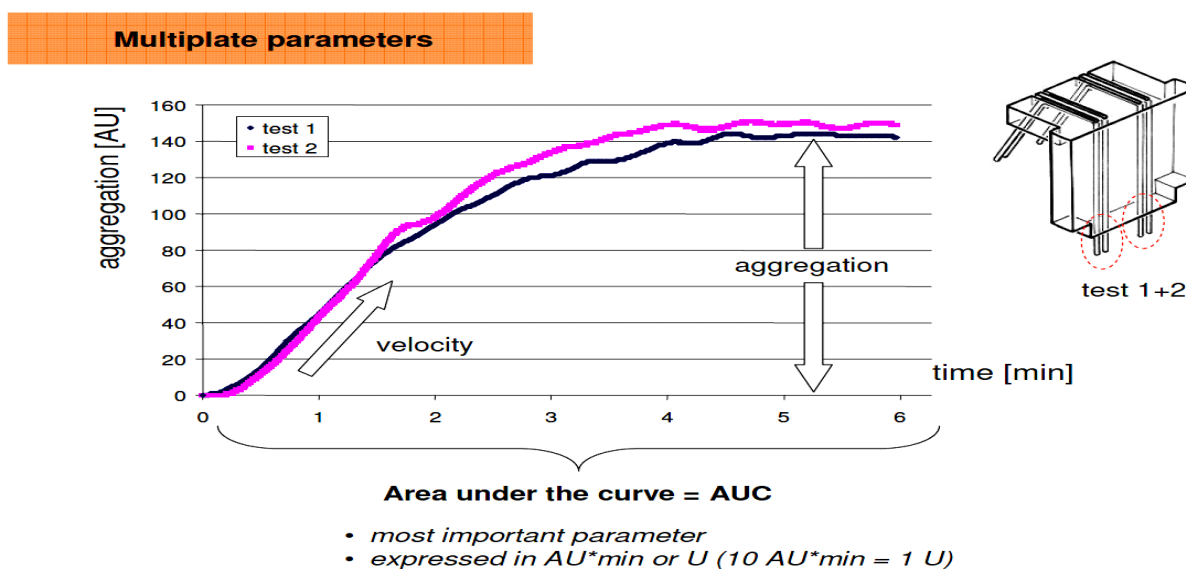


Figure 1. The curve of platelet aggregation on the device Multiplate and schematic view of the sensor to test blood

- ASPI test - containing arachidonic acid which is a substrate of platelet cyclooxygenase enzyme. Cyclooxygenase converts arachidonic acid to TxA₂, a potent platelet activator. When the cyclooxygenase is blocked, thromboxane formation is inhibited and also platelets activation. That is why the test is sensitive to cyclooxygenase-blockers such as ASA.

- TRAP assay - represents the natural potential of platelet aggregation, comprising a thrombin receptor activating peptide, and is sensitive only to the IIb / IIIa antagonists, such as abciximab.

Statistical analysis was performed using Statistical Package for Social Science (SPSS Software GmbH, Germany), version 15.0. The results are presented in tables and graphs, using the mean values and standard deviations (SD). Normality schedule was tested using Shapiro-Wilk test. The difference in mean values between the groups was calculated

using the Mann - Whitney test. The results were considered to be statistically significant at a $p < 0.05$.

Results

Analyzed data included the following: gender, age, number of red blood cells, platelet count, type of surgical intervention, values of ASPI and TRAP assays, the amount of intraoperative salvaged blood, the amount of returned blood-autologous and the application of allogenic red blood cells transfusion perioperatively (ml).

Table 1. shows demographic and clinical data for both CG and EG. It is noticeable that there were no significant difference in gender and age between groups. Also, red blood cells count and platelet count were not significantly different preoperatively between groups ($p > 0.05$).

Table 1.

Basic demographic and clinical data of patients in the study

Demographic and clinical data	Data, number (%) of patients, mean values $\pm$ SD, range		p value
	FM group, N = 31 (51.7%)	M group, N = 29 (48.3%)	
Gender (Female / Male)	25.8 % / 74.2 %	24.1 % / 75.8 %	
Age (mean, range)	65.1 $\pm$ 7.31	62.3 $\pm$ 7.38	>0.05
Eritocytes (n x 10 ¹² /l)	4.46 $\pm$ 0.44	4.37 $\pm$ 0.41	> 0.05
Platelets (n x 10 ⁹ /l)	242.9 $\pm$ 60.83	221.7 $\pm$ 45.85	> 0.05
Received ASA* (% of patients)	100 %	100 %	
ASPI test(AU min)**	1056 $\pm$ 229.44	416.7 $\pm$ 195.95	< .0001
TRAP test(AU min)**	1451.6 $\pm$ 170.47	1348.3 $\pm$ 259.22	> 0.05
CABG II / CABG III(%)	54.8 % / 45.2 %	51.7 % / 48.3 %	
Amounts of perioperative blood loss (ml)	980.6 $\pm$ 199.86	1527.5 $\pm$ 637.74	< .0001
Autotransfusion (ml)	388.3 $\pm$ 76.07	587.6 $\pm$ 210.87	< .0001
Allogeneic transfusion (ml)	180.6 $\pm$ 253.53	253.4 $\pm$ 294.27	> 0.05

* acetilsalicylic acid, **aggregation unit per minute

Mean values of ASPI test in CG were 1056 $\pm$ 229.44 AU/min, and showed statistically significant difference compared to the EG (416.7 $\pm$ 195.95 AU/min), (p<0.0001). There was no statistically significant difference between values of TRAP test measured in both groups (p>0.05).

As we expected, group of patients with impaired platelet function in ASPI test and with presence of the residual antiplatelet effect of ASA (EG) had a higher amounts of blood loss perioperatively 1527,5 $\pm$ 637,74 ml compared with CG, 980,6 $\pm$ 199,86 ml (p<0.0001). Intraoperatively collected blood in cell saver was processed in a few minutes and patients were transfused with their own washed red blood cells. The difference in amount of autotransfused blood between groups was statistically significant, 587,6 $\pm$ 210.87 ml in EG vs 388,3 $\pm$ 76.07 ml in CG (p<0.0001).

If the levels of perioperative hemoglobin were less than 80g/L, patients from both groups also received allogeneic red blood cells transfusion during the intervention. Compared data did not significantly differ between the groups (p>0.05).

Discussion

The authors opinions on the discontinuing or continuing of ASA before elective cardiac interventions are contradictory, which is not in case when patients had received thienopyridines in therapy (9). One proof of the benefits of ASA is on the postoperative course (the graft potency, mortality, the development of renal failure, length of stay in the ICU), which prevail over the risk of bleeding (10), while others are in favour of an increased risk for perioperative bleeding and related complications (11). It is a fact that the discon-

tinuation of ASA 5 days before open heart surgery by itself is not a sufficient guarantee that the residual effects of preoperative use of ASA will not cause complications in the form of bleeding during surgery. Impedance aggregometry can resolve this dilemma for clinicians and provide insight into the preservation of platelet function (12). Some researches investigated association between preoperative platelet function tested with impedance aggregometer and postoperative bleeding in cardiac surgery. *Petrićević et al* reported about the usefulness of preoperative examination of platelet function (ADP, ASPI test) in predicting increased postoperative bleeding after elective cardiac surgery and administration of allogeneic red blood cells perioperatively (13). Their study showed that aggregometry is a useful method for predicting CABG patients with excessive postoperative bleeding. *Mengistu et al* also showed that the impedance aggregometry is preferred method for preoperative testing residual effect of AS, indicator for the assessment of increased bleeding after the cardiac surgery and the need for the application of allogeneic transfusion (14). Preoperative aspirin increases post-operative bleeding, but this may be avoided by the use of aspirin doses less than 325 mg/day, concluded *Sun et al.* (4). They did not suggest preoperative platelet function testing. Our research showed that also smaller doses of ASA (100mg) may impair platelet function and increase bleeding, because patient's response to the drug is strongly individual.

Other authors showed importance of platelet function testing before cardiac surgery, and its role in predicting the risk for increased bleeding during the operation (15). Residual anti-platelet effects of preoperatively used ASA is successfully detected with ASPI test, which may be of great clinical importance, and the TRAP test is not significantly changed (16). *Fitchett et al* pointed in their research on the importance of the use of pre

operative aggregometry in determining the risk of perioperative bleeding in cardiac surgery patients previously treated with antithrombotics such as platelet ADP receptor antagonists and suggested the value of preoperative *in vitro* platelet aggregometry in order to determine perioperative bleeding risk (6). Their study did not include effects of ASA on perioperative bleeding. *Görlinger et al* described that the aggregometry is suitable method for the detection of platelet inhibition in cardiac surgery and its role in evaluation of intraoperative bleeding (12).

In literature some researchers suggested no discontinuation of aspirin before surgery except for some special interventions. Cases where aspirin should be stopped include patients undergoing intracranial, middle ear, posterior eye, intramedullary spine and transurethral prostatectomy surgery. Other patients have minimal risk for bleeding during surgery and discontinuation of acetylsalicylate is not necessary which was suggested by *Gerstein et al* (17). In our study we have shown that preservation of platelet function and the absence of residual antiplatelet effect of ASA preoperatively results in a significantly lower amount of intraoperative bleeding and lower amounts of autologous transfusion, which is of great importance for the course and outcome of the surgery. Therefore, the timely elimination of acetylsalicylates and platelet function testing should be a priority in the clinical practice of surgical treatment of coronary artery disease (18,19).

Conclusion

Considering the complexity of on pump cardiac surgery operations, as the bleeding is one of the most serious complications in the perioperative and postoperative period, the use of impedance aggregometry before the intervention should not be ignored. Further researches are needed to track the impact of

the residual effect of acetylsalicylates in the term of postoperative bleeding and the long-term survival of patients underwent revascularization methods.

The fact is that although there are opposing views in the scientific community about the described issue, our results clearly indicate the usefulness of preoperative utilization of aggregometry as an independent test to assess perioperatively increased bleeding in cardiac surgery.

References

1. Cao L, Young N, Liu H, Silvestry S, Sun W, Zhao N, et al. Preoperative aspirin use and outcomes in cardiac surgery patients. *Ann Surg* 2012; 255(2): 399-404.
2. Gligorićević V, Balint B. Clinical transfusiology. Belgrade: Institute for textbooks, 1998; 229-42.
3. Elezović I. Clinical haemathology. Belgrade: Institute for textbooks, 2013; 834-9.
4. Sun JC, Whitlock R, Cheng J, Eikelboom JW, Thabane L, Crowther MA, Teoh KH. The effect of pre-operative aspirin on bleeding, transfusion, myocardial infarction, and mortality in coronary artery bypass surgery: a systematic review of randomized and observational studies. *Eur Heart J* 2008; 29(8): 1057-71.
5. Zuern C, Lindemann S, Gawaz M. Platelet Function and Response to Aspirin: Gender-Specific Features and Implications for Female Thrombotic Risk and Management. *Semin Thromb Hemost* 2009; 35(3): 295-306.
6. Fitchett D, Mazer CD, Eikelboom J, Verma S. Antiplatelet therapy and cardiac surgery: review of recent evidence and clinical implications. *Can J Cardiol* 2013; 29(9): 1042-47.
7. Antić A, Stanojković Z, Stanojević G, Mačukanović-Golubović L. Laboratorijsko praćenje efekta primene aspirina i klopidoğrela. *Bilt Transfuziol* 2011; 57(1-2): 64-9.
8. Ferraris VA, Ferraris SP, Joseph O, Wehner P, Mentzer RM Jr. Aspirin and postoperative bleeding after coronary artery bypass grafting. *Ann Surg* 2002; 235(6): 820-7.
9. Ranucci M, Baryshnikova E, Soro G, Ballotta A, De Benedetti D. Multiple Electrode Whole-Blood Aggregometry and Bleeding in Cardiac Surgery Patients Receiving Thienopyridines. *Ann Thorac Surg* 2011; 91(1): 123-429.
10. Mangano D: Multicenter Study of Perioperative Ischemia Research Group. Aspirin and mortality from coronary bypass surgery. *N Engl J Med* 2002; 347(17): 1309-17.
11. Myles P. Stopping aspirin before coronary artery surgery. *Circulation* 2011; 123: 571-3.
12. Görlinger K, Shore-Lesserson L, Dirkmann D, Hanke AA, Rahe-Meyer N, Tanaka KA. Management of hemorrhage in cardiothoracic surgery. *J Cardiothorac Vasc Anesth* 2013; 27(4): 20-34.
13. Petrićević M, Biocina B, Milicic D, Konosic S, Ivancan V, Milosevic M, et al. Bleeding risk assessment using multiple electrode aggregometry in patients following coronary artery bypass surgery. *J Thromb Thrombolysis* 2013; 35(1): 31-40.
14. Mengistu AM, Mayer J, Boldt J, Rohm KD, Suttner SW. Usefulness of monitoring platelet function by multiple electrode aggregometry in primary coronary artery bypass surgery. *J Cardiothorac Vasc Anesth* 2011; 25(4): 755-7.
15. Schimmer C, Hamouda K, Sommer SP, Özkur M, Hain J, Leyh R. The predictive value of multiple electrode platelet aggregometry (multiplate) in adult cardiac surgery. *Thorac Cardiovasc Surg* 2013; 61(8): 733-43.
16. Velik-Salchner C, Maier S, Innerhofer P, Kolbitsch C, Streif W, Mittermayr M, et al.

- An assessment of cardiopulmonary bypass-induced changes in platelet function using whole blood and classical light transmission aggregometry: the results of a pilot study. *Anesth Analg* 2009; 108(6): 1747-54.
17. Gerstein NS, Schulman PM, Gerstein WH, Peterse TR, Tawil I. Should More Patients Continue Aspirin Therapy Perioperatively? *Ann Surg* 2012; 255: 811-9.
18. Poston R, Gu J, Manchio J, Lee A, Brown J, Gammie J, et al. Platelet function tests predict bleeding and thrombotic events after off-pump coronary bypass grafting. *Eur J Cardiothorac Surg* 2005; 27(4): 584-91.
19. Janssen P, Jurriën M, Hackeng C. The use of platelet function testing in PCI and CABG patients. *Blood reviews* 2014; 28(3): 109-21.

Corresponding author: Stanojković Zoran, PhMD
Blood Transfusion Institute Niš
Boulevard dr Zoran Đinđić 48, Niš, Serbia
e-mail: mizoz1@gmail.com



MONITORING OF PLATELET FUNCTION

Ana Antić¹, Zoran Stanojković^{1,2}, Miodrag Vučić^{2,3}, Milan Lazarević³

¹ Blood Transfusion Institute of Niš, Serbia

² Medical faculty Niš, University of Niš, Serbia

³ Clinic for Hematology, Clinical Center of Niš, Serbia

⁴ Clinic for Cardiovascular and Transplant Surgery, Clinical Center of Niš, Serbia

Summary

Antiplatelet therapy agents are medications or pharmaceutical drugs that interfere with the process that forms blood clots and inhibit the clumping together with platelets. They are widely used in primary and secondary prevention of thrombotic cerebrovascular or cardiovascular disease. The most common antiplatelet agents are acetylsalicylic acid (ASA) and clopidogrel.

Platelet aggregation, as a laboratory test for a platelet function, is very efficient for optimal antiplatelet treatment and also to identify individuals who have suboptimal response to antiplatelet drugs. This suboptimal platelet response is defined as a platelet resistance and is associated with clinical outcome. Insufficient exposure to an antiplatelet drug taken to prevent atherothrombotic disease entails increased risk for an adverse event whereas overexposure to an antiplatelet drug increases the risk for adverse effects such as fatal bleeding.

Currently, many tests are available to measure platelet function affected with antiplatelet drugs, such as aspirin and clopidogrel. Multiplate and PFA-100 are assays that measure platelet aggregation resulting from ex vivo stimulation of the platelets using a variety of platelet agonists. Clinical studies are required to show which parameter of platelet function correlates best with an elevated risk for thromboembolism in patients stratified as aspirin and/or clopidogrel non-responders in a laboratory assay.

Key words: platelets, aggregation, aspirin, clopidogrel

Sažetak

Antitrombocitni terapijski agensi su lekovi ili farmaceutski preparati koji se uključuju u proces stvaranja krvnih ugrušaka i inhibiraju agregaciju trombocita. Široko se primenjuju u primarnoj i sekundarnoj prevenciji cerebrovaskularnih i kardiovaskularnih trombotičnih bolesti. Najčešće primenjivani antitrombocitni agensi su acetilsalicilna kiselina (ASK) i klopidoogrel.

Agregacija trombocita, kao laboratorijski test za procenu funkcije trombocita, je vrlo efikasan za optimalno vođenje antitrombocitne terapije, kao i za izdvajanje pacijenata koji pokazuju suboptimalni odgovor na primenu antitrombocitnih lekova. Ovaj suboptimalni odgovor se definiše kao rezistencija trombocita i povezan je sa nepovoljnim kliničkim ishodom. Nedovoljan efekat antitrombocitnog leka koji se uzima u cilju prevencije antitrombotičnih bolesti povećava rizik neželjenih događaja, pri čemu nepravilno povećanje doze leka povećava rizik ozbiljnih krvarenja.

Danas su dostupni brojni testovi za procenu funkcije trombocita i efekat antitrombotičnih lekova, kao što su aspirin i klopidoogrel. Multiplate i PFA-100 se koriste za merenje agregacije trombocita koja nastaje ex vivo stimulacijom trombocita korišćenjem različitih trombocitnih agonista. U budućnosti su potrebne kliničke studije koje bi pokazale koji parametar trombocitne funkcije najbolje korelira sa povećanim rizikom za tromboembolizam kod pacijenata koji su izdvojeni kao aspirin i/ili klopidoogrel „non-responder“-i u laboratorijskim testovima.

Ključne reči: trombociti, agregacija, aspirin, klopidoogrel

Introduction

The fluid organ blood is in constant motion to deliver cells, chemical substances and heat into all regions of the organism. Platelets are flowing constantly along the vessel wall, monitor the vasculature for defects and react immediately upon vessel injury with adhesion and aggregation (1).

Usually, the inner lining of blood vessels consist of endothelial cells, which under normal conditions form an interface towards the flowing blood resistant to adhesion of circulating cells. Disruption of the continuous endothelial layer exposes subendothelial matrix proteins triggering a fast platelet response (2).

The role of platelets in primary haemostasis

Primary haemostasis, as the first line of defense against bleeding from an injured vessel, consists of all these processes: initial platelet arrest, platelet adhesion, and platelet aggregation. Platelets have a key role in mechanism of atherothrombosis. Since platelets can not distinguish between a traumatized and a pathologically altered vessel, a chronic degenerative process like atherosclerosis with a ruptured plaque can trigger a physiological mechanism leading to fatal ischaemia. Platelets adhere to the atherosclerotic place through the process of adhesion, involving a series of

glycoprotein

(GP) receptors on the platelet surface and their corresponding adhesive proteins including: GP VI – collagen, GP complex Ib-V-IX – von Willebrand factor, integrin α IIb β 3 – fibrinogen. Upon adhesion subsequent shape change occurs with accompanying thromboxane (TxA₂) production and platelet granule release, the contents of which include adenosine diphosphate (ADP). TxA₂ and ADP are soluble agonists that further activate the adhered platelets in addition to activating local free circulating platelets, so secondary platelet activation occurs by means of three principal agonist pathways: thromboxane (TxA₂), adenosine diphosphate (ADP) and thrombin, independent of or in combination with each other (2,3). Thrombin activation results in a cross linked platelet plug as fibrinogen strands bind to glycoprotein α IIb β 3 receptors. Upon activation the α IIb β 3 receptors physically alter their conformation producing the high affinity fibrinogen binding site GPIIb/IIIa on the platelet membrane. The activated platelets present in such aggregates exhibit a membrane surface rich in phosphatidylserine, which is an acceleration factor for blood coagulation and not found in resting platelets. In particular, assembly and activation of tissue factor, factor VII, the tenase complex and the prothrombinase complex are fostered by activated membranes,

and thus mediate secondary haemostasis. The final result is a fibrin stabilized platelet aggregate that occludes the vessel injury and prevents serious bleeding (4,5).

The entire array of described interactions and processes occurs at the interface between flowing blood and the stationary thrombogenic surface of the injured blood vessel. A fact often underestimated in laboratory tests that usually try to mimic the *in vivo* situation, is the major role of flow in bringing the reaction factors together. This is well illustrated by the phenomenon that anaemia, e.g. a haematocrit of <30%, can increase bleeding time (6). The rheological or haemodynamic explanation is, that the diminished effect of erythrocyte axial migration at low red cell counts leads to reduced platelet concentration in the boundary layer adjacent to the vessel wall.

The assessment of platelet function

Platelet aggregation as a laboratory test for platelet function was developed by *Gustav VR Born* in 1962. The original method measures the transmittance of light in turbid platelet rich plasma (PRP). When the platelets aggregate after stimulation with various agonists, the turbidity decreases and more light passes through the PRP. These changes in

light transmittance can be analyzed and correlated with platelet shape change, aggregation and desaggregation if present. Weak agonists such as epinephrine or ADP at low concentration show a biphasic aggregation curve, i.e. an initial shape change wave followed by the aggregation wave. Strong agonists like collagen, thrombin or ADP at high concentration mostly override the first phase of shape change and generate a rapid aggregation response (7,8).

Determinants of aggregometry are the platelet function disorders, which are rarely congenital but mostly acquired. Acquired platelet disorders are frequently caused by drugs or uraemia (9). The widely used acetylsalicylic acid and many other non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) inhibit the platelet enzyme cyclooxygenase, which converts arachidonic acid into thromboxane (Tx) A₂. TxA₂ is a short-living platelet agonist. The effect of a single dose of acetylsalicylic acid persists for 5 to 7 days, since it irreversibly inhibits the cyclooxygenase. Only the appearance of newly synthesized platelets in the circulation abates its effect. NSAIDs can either act by reversibly inhibiting the cyclooxygenase or by other modes of action (10). A list of diseases and drugs causing acquired platelet disorders is given in Table 1.

Table 1.

Diseases and drugs associated with platelet disorders

Diseases	Drugs
Uraemia	Antihistamines
Myeloproliferative disorders	Indomethacin
Essential thrombocythemia	Acetylsalicylic acid
Polycythaemia vera	Low molecular-weight dextran
Chronic myelogenous leukemia	Chlorpromazine
Acute leukemia/myelodysplastic syndrome	Mithramycin
Dysproteinaemias	Clofibrate
Cardiopulmonary bypass	Nitrofurantoin
Acquired von Willebrand syndrome	Dipyridamole

Acquired storage pool deficiency
Antiplatelet antibodies
Liver disease

Penicillins
Ethanol
Phenylbutazone
Guaifenesin
Sulfinpyrazone
Heparin
Tricyclic antidepressants
Hydroxychloroquine
Vinca alkaloids

Antiplatelet drugs

For over 100 years acetylsalicylic acid (ASA) has been available for use as an anti-inflammatory and antipyretic drug. The means by which aspirin achieves its cardiovascular benefit is attributed to its ability to inhibit TxA₂ production, as it affects enzyme cyclooxygenase COX-1 and COX-2, which convert arachidonic acid to TxA₂ (11). Aspirin acetylates serine residue 529 in the polypeptide chain of the prostaglandin H-synthase (PGH-synthase), thus inhibiting the production of PGH₂ which is the direct precursor of TxA₂. Because platelets are anucleate they do not readily regenerate protein. The effect of aspirin on COX-1 is irreversible and lasts for the lifetime of the platelet thereby relying on the generation of new platelets to recover cyclooxygenase activity at a rate of approximately 10 % per day in normal healthy individuals. Low dose aspirin is sufficient to suppress greater than 95 % of TxA₂ production by COX-1 and such suppression is capable of inhibiting platelet aggregation. However, aspirin affected platelets may still aggregate in the presence of potent platelet agonists such as collagen and thrombin (12). COX-2 has been identified in human atherosclerotic plaques and in newly formed platelets. COX-2 is largely responsible for prostacyclin production which counteracts the effects of thromboxane by preventing platelet aggregation and stimulating vasodilation. Higher doses of aspirin are capable of inhibiting COX-2 production of

prostacyclin in endothelial cells while converting the PGH-synthase-2 enzyme into a lipooxygenase. 15(R) hydroxy-eicosatetraenoic acid (HETE) is produced and invokes the anti-inflammatory effect associated with high dose aspirin. It is noteworthy that selective COX-2 inhibition sufficient to suppress prostacyclin production can promote arterial thrombosis. However, COX-2 present in endothelial cells maintains the ability to regain prostacyclin production only a few hours after exposure to aspirin due to the ability of nucleated cells to resynthesize enzymes (13,14).

Clopidogrel in addition to aspirin has proven especially effective in this venue for the prevention of both restenosis and stent thrombosis in the treatment of acute coronary syndrome. Clopidogrel is a member of the thienopyridine class of drugs that target the purino - receptors on the platelet surface. More specifically, they irreversibly bind to the adenosine diphosphate receptor P2Y₁₂ thus inhibiting platelet aggregation by diminishing signal transduction and subsequent activation of the GPIIb/IIIa receptors as well as diminishing the amplification of platelet activation through the dense granule release of ADP (15,16). Clopidogrel is a prodrug which must be metabolized in the liver to its active metabolites. Metabolism occurs through CYP3A4, one of the cytochrome P450 enzymes responsible for drug metabolism. Clopidogrel must

go through two oxidation steps in order to produce an active metabolite capable of irreversibly binding to the platelet ADP receptor P2Y₁₂ (P2Y₁₂ and P2Y₁ are two G-protein coupled receptors that are expressed on platelet membranes and combined action is necessary for a full activation and aggregation response to stimulation by ADP) (15).

Numerous large scale clinical studies support the safety and efficacy of single or dual antiplatelet treatment in specific clinical

settings. In addition to these studies a number of guidelines have been written to promote educated decisions when considering antiplatelet therapy in daily practice. Table 2 provides an overview of indications for aspirin and clopidogrel use based on suggestions from the American Heart Association (AHA), the American College of Cardiology (ACC), and the European Society of Cardiology (ESC) (1,17,18).

Table 2.

Indications for use of aspirin and clopidogrel

Clinical indication	Drug	Comment
Primary prevention high risk		
• Diabetes mellitus	aspirin	
• Hypertension	aspirin	
Peripheral vascular disease	aspirin/ clopidogrel	Clopidogrel as an alternative to aspirin
Atrial fibrillation	aspirin	Intermediate risk or high risk not on warfarin
Valve		
• surgery	aspirin	With warfarin for mechanical valves in notwarfarin candidates
• disease	aspirin	
Ishaemic heart disease		
• stable angina	aspirin/ clopidogrel	More effective than aspirin alone
• akute coronary syndrome		
- no ST segment elevation	aspirin	More effective than aspirin alone
-with PCI	aspirin/ clopidogrel	
-without PCI	aspirin	
-ST segment elevation in acute myocardial infarction (MI)	aspirin/ clopidogrel	
Previous MI	aspirin/ clopidogrel	Clopidogrel as an alternative to aspirin
Elektive PCI	aspirin	
-resulting in stent placement	aspirin/ clopidogrel	
Postcoronary bypass	aspirin	
Acute ishaemic stroke /TIA	aspirin	
Previous stroke/TIA	aspirin/ clopidogrel	Clopidogrel as an alternative to aspirin

AHA 2010 evidence-based practice guidelines recommend both aspirin in daily dose of 100 mg and oral anticoagulants for patients with mild cardiovascular risk. For patients undergoing primary percutaneous coronary intervention (PCI) with or without stenting, the guide

lines suggest clopidogrel in addition to aspirin with a recommended initial dosing of at least 300 mg followed by 75 mg daily. It is also recommended early (within 48 hour of stroke onset) aspirin therapy (initial dose 150 mg to 325 mg) for acute ischemic stroke patients

who are not receiving thrombolysis treatment. For long-term stroke prevention in patients who have experienced a noncardioembolic stroke or transient ischemic attack (TIA), aspirin (50 mg to 100 mg daily) or clopidogrel (75 mg daily) are all acceptable options for initial therapy (1).

This is not a definitive list, additional antiplatelet drugs may be indicated in specific clinical settings. Prasugrel is a relatively new platelet aggregation inhibitor and has shown better efficacy compared to clopidogrel in preventing MI and stent thrombosis in ACS patients undergoing PCI. Prasugrel is a thienopyridine P2Y₁₂ platelet inhibitor which is converted to an active metabolite primarily by CYP3A4 and CYP2B6. This prodrug inhibits platelet action by irreversibly binding to the platelet ADP receptor (16).

GPIIb/IIIa receptor inhibitors (abciximab - Reopro, eptifibatide - Integrilin, tirofiban - Agrarstat) are agents that have been developed to block the final common pathway that results in platelet aggregation and provide marked protection from ischemic events in patients undergoing percutaneous coronary intervention (PCI) (17). Tirofiban and eptifibatide are non-peptide molecules with marked specificity for the GP IIb/IIIa receptor. Abciximab is a large monoclonal antibody that binds to GP IIb/IIIa receptor as well as to $\alpha_v\beta_3$ integrin receptor of endothelial and smooth muscle cells, and to $\alpha_m\beta_2$ integrin found in leucocytes. Thus, only abciximab has the potential for direct inhibition of adhesion of platelets and endothelial cells, and of platelets and white cells, and as a consequence, to inhibit or limit the inflammatory process invariably present in acute coronary syndrome (ACS) and after PCI (1,18).

Resistance to antiplatelet therapy

Antiplatelet therapy has demonstrated significant clinical benefit in the treatment of

acute coronary syndrome, but, as with any treatment strategy, it has been unable to prevent all cardiovascular events. This is far from surprising when considering the complexity of arterial thrombosis and more specifically platelet physiology. This lack of treatment success has provoked the introduction of various diagnostic tests and testing platforms with the intent of guiding and optimizing clinical treatment. Such tests have resulted in the generation of clinical data that suggest suboptimal response to antiplatelet agents such as aspirin and clopidogrel. In the case of both aspirin and clopidogrel, this suboptimal response has been termed resistance (13,16).

Several mechanisms have been identified to explain the incidence of aspirin and clopidogrel resistance: improper drug compliance or early discontinuation, possible drug interactions, inadequate dose, increased platelet turnover, genetic polymorphisms and potential bypass mechanisms. The definition of aspirin resistance is quite variable in the literature and has been described as the failure to prevent a thrombotic event, the inability of aspirin to inhibit TxA₂ formation, or the inability of the drug to cause prolongation of bleeding time (13,19). A lack of any effect on *in vivo* tests of platelet activity, including no prolongation of the bleeding time, may also be defined as aspirin resistance, usually explained with individual platelet recovery after aspirin taking, platelet hyperreactivity, COX-1 molecular genetic variants and interactions with other drugs (12). On the other hand, clopidogrel resistance may be due to pre-existing variability in platelet response to adenosine diphosphate (ADP), genetic variability (polymorphisms in the hepatic enzymes involved in clopidogrel metabolism or within the platelet P2Y₁₂ receptor), or drug interactions (e.g. proton pump inhibitors) (20). There appears to be an association between a CYP2C19 variant and recurrent thrombotic coronary events in patients taking clopidogrel.

Clopidogrel is converted to its active form by the CYP2C19 enzyme. Some patients are poor metabolizers of the drug and do not effectively convert clopidogrel to its active form. In these patients, clopidogrel has less effect on platelets, and therefore less ability to prevent heart attack, stroke, and cardiovascular death (21,22).

Methods for monitoring platelet Aggregation

The *Platelet Function Analyzer (PFA-100)* (Siemens, Deerfield, IL, USA) monitor conducts a modified quantitative *in vitro* bleeding time under artificially created high-shear conditions. Whole blood is placed on a test cartridge and a vacuum perfuses the blood across a collagen-coated membrane. An aperture is created in the membrane by a “punch” in the presence of either epinephrine (Col/EPI) or ADP (Col/ADP) as agonist. The shear force of whole blood being drawn through a vacuum

activates platelets and promotes platelet adherence and aggregation. The time it takes for a clot to form inside the glass tube and prevent further blood flow is measured as “closure time” (23). Initial platelet arrest from fast flow is mediated by von Willebrand factor (vWF) bound to the collagen and acting as ligand for the platelet receptor GPIb. The following permanent adhesion and aggregation is dependant on the integrin $\alpha 2\beta 3$ (GPIIb/IIIa). Therefore, PFA-100 is very sensitive system for the detection of the von Willebrand-Jurgens syndrome as well as for the aggregation-blocking effects of the acetylsalicylic acid. Col/EPI closure time is prolonged to more than 300 sec in patients who are on platelet prevention therapy (aspirin or GPIIb/IIIa inhibitors), which is the highest values PFA-100 can register. Col/ADP closure time is normal in patients taking aspirin and is prolonged in patients taking GPIIb/IIIa inhibitors (3). Platelet function assessed on PFA-100 is shown on table 3.

Table 3.

PFA-100 assessed platelet function

		Col/EPI	Col/ADP
Platelet disorders	<i>Glanzman trombastenia</i>	↑	↑
	<i>Bernard-Soulier syndome</i>	↑	↑
	<i>vWD pseudoplatelet type</i>	↑	↑
	<i>Storage pool dosease</i>	↑	variable
	<i>Primary disorder of secretion</i>	↑	normal
Antiplatelet drugs	<i>Aspirin</i>	↑	normal
	<i>Ticlodipin</i>	variable	normal
	<i>Clopidogrel</i>	variable	variable
	<i>Anti-GPIIb/IIIa</i>	↑	↑
Von-Willebrand disease	<i>Mild type I</i>	↑	variable
	<i>Type I</i>	↑	↑
	<i>Type 2 (not 2N)</i>	↑	↑
	<i>Type 2N</i>	normal	normal
	<i>Type 3</i>	↑	↑

As Col/ADP and Col/EPI have the lack of sensitivity to P2Y₁₂ inhibition, the INNOVANCE PFA P2Y cartridge has therefore been recently developed. A prospective evaluation of the clinical performance of the INNOVANCE PFA P2Y demonstrated that it not only detects P2Y₁₂ inhibition but it also demonstrated a trend to potentially identify patients at a higher risk of major adverse clinical events after PCI suggesting the potential utility of this test (24). A more recent study has shown that this test is sensitive for detecting clopidogrel responsiveness *in vivo* (25).

Slaughter and colleagues demonstrated that the PFA-100 closure time has only a high negative predictive value and thus must help in identifying patients who are unlikely to need platelet transfusions to reduce bleeding. Its positive predictive value is low and thus it is not very useful in transfusion algorithms to direct transfusion therapy as many „false-positive“ patients would be transfused (26). *Cammerer* and colleagues have prospectively studied a group of cardiac surgical patients using measurement of platelet function to predict bleeding. They reported that thromboelastography (TEG) was a better predictor of bleeding time than the PFA-100 (27). When suspecting a platelet function defect, PFA-100 is very useful combined with an array of other tests. The therapeutic effect of desmopressin (DDAVP) that elevates vWF concentration in plasma by releasing it from endothelial cells can also be assessed by this method. Perioperative use and application in ICU are not recommended since platelet aggregates developed perioperatively as well as haemodilution can interfere with accurate

test results. Closure time will become abnormally prolonged when either the platelet count falls below 50.000/ μ L or when the haematocrit is less than 25 % (28).

Multiplate analyzer (Dynabyte medical, Germany) is POC device based on impedance aggregometry that measure platelet aggregation resulting from *ex vivo* stimulating of the platelet using a variety of platelet agonists (ADP, prostaglandin E1, arachidonic acid, TRAP-6, collagen, ristocetin). The testing provides rapid results as compared with traditional light transmittance aggregometry. Whole blood is measured in a disposable test cell, which contains two independent impedance sensors, each composed of two silver-coated electrodes. The sample is stirred using a teflon-coated magnetic stirrer. When platelets get activated they adhere onto the sensor wires and enhance the electrical impedance between them. Impedance raise is registered and recorded over 6 minutes. The increase in impedance is transformed to arbitrary aggregation units (AU) and plotted against time (7,9). Three parameters are calculated: area Under the Aggregation Curve (AUC) – is affected by the total height of aggregation curve and is best suited to express the overall platelet activity, the height of the curve- determines platelet aggregation, the maximum slope of the curve-determines the velocity (29). Two curves are assessed using the two independent sensors in the test cell. The parameters calculated by the software are the mean values of the parameters determined with each curve. The correlation coefficient between the values of the 2 individual curves is determined. The frequently used tests are shown on table 4.

Table 4.

Multiplate tests

test	activation	sensitivity	not sensitive for
ASPItest	arachidonic acid: is converted to TXA2 by platelet-own cyclooxygenase	aspirin, IIb/IIIa antagonists	clopidogrel, vWF
ADPtest	ADP: binds onto platelet ADP receptors	clopidogrel, IIb/IIIa antagonists	aspirin, vWF
ADPtest HS	ADP + prostaglandin E1 (Prostaglandin is a natural inhibitor and enhances the sensitivity of the assay for clopidogrel)	clopidogrel, IIb/IIIa antagonists	aspirin, vWF
TRAPtest	TRAP-6 (thrombin receptor activating peptide): TRAP-6 is a potent agonist which mimicks the platelet-activating action of thrombin	IIb/IIIa antagonists	vWF, aspirin, clopidogrel (weak effect on TRAPtest)
COLtest	collagen: collagen activates platelet and triggers a release of arachidonic acid from the platelet membrane, which is converted to TXA2 by the Cyclooxygenase	aspirin, IIb/IIIa antagonists	clopidogrel, vWF
RISTOtest	Ristocetin: vWF dependent platelet activation via the Gplb receptor	Bernard-Soulier syndrome, severe vWD, aspirin	mild vWD

Platelet dysfunction may cause haemorrhagic complications during invasive procedures. On the other hand, the ability to monitor platelet response to antiplatelet drugs may have a major impact on patient care resulting in a significant decrease in morbidity and mortality. The largest study to date evaluating the clinical impact of clopidogrel resistance has shown that patients stratified as inadequate responders according to Multiplate testing, exhibited 9,4 fold increased risk of early stent thrombosis (20).

The use of term resistance should not be taken lightly, as it may have detrimental effects when misinterpreted. Falsely identified, it may infer an increased risk of thrombosis if treatment were discontinued or alternatively an increased risk of haemorrhage if dosage were mistakenly increased. A good correlation was found by *Tantry US et al.*

when comparing classical aggregometry and modified thromboelastography for detection of aspirin resistance (30). *Sibbing D et al.* showed a significant correlation for ADP-induced platelet aggregation when using classical or impedant aggregometry in patients scheduled for coronary angiography and receiving a single dose of 600 mg clopidogrel ($r^2=0,5$; $p<0,0001$) (31). *Seyfert UT et al.* investigated healthy volunteers and blood donors not taking anti-platelet drugs and found no correlation between these two methods (32). *Linnemann B et al.* have shown that the INNOVANCE PFA P2Y can be used to monitor the influence of clopidogrel *ex vivo* and its sensitivity for detecting non-responders or responders is comparable to Multiplate ADP-HS test (33). Investigations conducted in Blood Transfusion Institute Niš showed that Multiplate is more sensitive to dual antiplatelet

let therapy ($p < 0,05$ for aspirin; $p < 0,001$ for clopidogrel) and to clopidogrel alone ($p < 0,001$) than PFA-100, but there is not significant difference for patients treated with aspirin alone (34). On the other hand, INNOVANCE PFA P2Y is sensitive to P2Y₁₂ inhibition and compares well with all other currently available platelet function tests in determination of resistance to clopidogrel and is an improvement upon the classic PFA-100. Panicia R showed that the imprecision of the method for the Multiplate is less than 5 % in control subjects and 7% in patients undergoing antiplatelet treatment (35). According to the literature data prevalence of aspirin resistance vary from 5 % to 80 %, depending on applied diagnostic method.

Conclusion

Monitoring of antiplatelet therapy is necessary in patients with adverse cardiovascular events. Clinical studies are required to show which parameter of platelet function correlates best with an elevated risk for thromboembolism in patients stratified as aspirin and/or clopidogrel non-responders in a laboratory assay.

References

1. Lloyd-Jones D, Adams R, Brown T, et al. Heart disease and stroke statistics - 2010 Update: A report from the American Heart Association Statistics Committee and Stroke Statistics: available at <http://circ.ahajournals.org/cgi/reprint/circulationaha.109.192667>; accessed February 15th 2019.
2. Reininger AJ. Primary haemostasis and its assessment by laboratory tests. *Hämostaseologie* 2006; 26: 42–7.
3. Guyer KE. The present state of aspirin and clopidogrel resistance. *Hämostaseologie* 2009; 29: 285–90.
4. Akkermen WJ. Platelet signalling: GTP-binding protein. In: Gresele P, Page C, Vermeylen J, editors. *Platelets in thrombotic and non-thrombotic disorders: pathophysiology, pharmacology and therapeutics*. Cambridge University Press, 2002.
5. Falati S, Gross P, Merrill-Skoloff G, Sim D, Flaumenhaft R, Celi A, Furie B, Furie B. In Vivo Models of Platelet Function and Thrombosis: Study of Real-Time Thrombus Formation. *Methods in Molecular Biology* 2004; 272: 187-97.
6. Livio M, Gotti E, Marchesi D. Uraemic bleeding: role of anamia and beneficial effect of red cell transfusions. *Lancet* 1982; 2: 1013-5.
7. Harrison P, Frelinger AL III, Furman MI, et al. Measuring antiplatelet drug effects in the laboratory. *Thromb Res* 2007; 120:323-36.
8. Michelson AD, Frelinger AL III, Furman MI. Current options in platelet function testing. *Am J Cardiol* 2006; 98:4-10.
9. Toth O, Calatzis A, Penz S, et al. Multiple electrode aggregometry: a new device to measure platelet aggregation in whole blood. *Thromb Haemost* 2006; 96:781-8.
10. Refaai MA, Laposata M. Platelet aggregation. In: Michelson AD (ed). *Platelets*. San Diego: Academic Press 2002: 291-6.
11. Campbell CL, Streinhuyl SR. Variability in response to aspirin: do we understand the clinical relevance? *J Thromb Hemost* 2005; 3: 665-9.
12. Antić A, Stanojković Z, Vučić M, Lazarević M, Vacić N. Comparison of pharmacodynamic properties of three different aspirin formulations in patients with stable coronary disease. *Vojnosanit Pregl* 2018 OnLine-First (00): 34-34; <https://doi.org/10.2298/VSP180110034A>.

13. Zimmerman N, Hohlfeld T. Clinical implications of aspirin resistance. *Thromb Haemost* 2008; 100: 379-90.
14. Lordkipanidze M, Pharand C, Schampaert E, et al. A comparison of six major platelet function tests to determine the prevalence of aspirin resistance in patients with stable coronary artery disease. *Eur Heart J* 2007; 28: 1702-8.
15. Geisler T, Langer H, Wydymus M, et al. Low response to clopidogrel is associated with cardiovascular outcome after coronary stent administration. *Eur Heart J* 2006; 27: 2420-5.
16. De Miguel A, Inanez B, Badimon JJ. Clinical implications of clopidogrel resistance. *Thromb Haemost* 2008; 100: 196-203.
17. Patrono C, Bachman F, Baigent C. Expert Consensus Document on the Use of Antiplatelet Agents. *Eur Heart J* 2004; 25: 166-81.
18. Ibanez B, James S, Agewall S, et al. 2017 ESC Guidelines for the management of acute myocardial infarction in patients presenting with ST-segment elevation: The Task Force for the management of acute myocardial infarction in patients presenting with ST-segment elevation of the European Society of Cardiology (ESC). *Eur Heart J* 2018; 39(2): 119-77.
19. Shantsila E, Watson T, Lip GYH. Aspirin resistance: what, why and when?, *Thromb Research* 2007; 119 (5): 551-4.
20. Paniccia R, Antonucci E, Gori AM. Different methodologies for evaluating the effect of clopidogrel on platelet function in high-risk coronary artery disease patients. *J Thromb Haemost* 2007; 5:1839-47.
21. Angilillo DJ, Fernandez-Ortiz A, Bernardo E, Alfonso F, Macaya C, Bass TA, Costa MA. Variability in individual responsiveness to clopidogrel: clinical implications, management, and future perspectives. *J AM Coll Cardiol* 2007; 49:1505-16.
22. Buonamici P, Marucci R, Migliorini A, et al. Impact of platelet reactivity after clopidogrel administration on drug-eluting stent thrombosis. *J Am Coll Cardiol* 2007; 49: 2312-7.
23. Paniccia R, Antonucci E, Gori AM. Comparison of different methods to evaluate the effect of aspirin on platelet function in high-risk patients with ischemic heart disease receiving dual anti-platelet treatment. *Am J Clin Pathol* 2007; 128:143-9.
24. Edwards A, Jakubowski J, Rechner A, Sugidachi A, Harrison P. Evaluation of the PFA P2Y cartridge: Sensitivity to P2Y12 blockade and influence of anticoagulant. *Platelets* 2011; 1-10.
25. Koessler J, Kobsar AL, Rajkovic MS, Schafer A, Flierl U, Pfoertsch S, et al. The new PFA P2Y cartridge is sensitive to the detection of the P2Y12 receptor inhibition. *Platelets* 2010; 22: 19-25.
26. Slaughter TF, Sreeram G, Sharma AD, et al. Reversible shear-mediated platelet dysfunction during cardiac surgery as assessed by the PFA-100 platelet function analyzer. *Blood Coagul Fibrinolysis* 2001; 12:85-93.
27. Cammerer U, Dietrich W, Rampf T, Braun SL, Richter JA. The predictive value of modified computerized thromboelastography and platelet function analysis for postoperative blood loss in routine cardiac surgery. *Anesth Analg* 2003;96:51-7.
28. Franchini M. The platelet function analyzer (PFA-100): an update on its clinical use. *Clin Lab* 2005; 51(7-8): 367-72.
29. Gorlinger K, Jambor C, Hanke AA, et al. Perioperative coagulation management and control of platelet transfusion by point-of-care platelet function analysis. *Transfus Med hemother* 2007; 34:396-411.

30. Tantry US, Bliden KP, Gurbel PA. Overestimation of platelet aspirin resistance: Detection by thrombelastograph platelet mapping and validation by conventional aggregation using arachidonic acid stimulation. *J Am Coll Cardiol* 2005; 46:1705-9.
31. Sibbing D, Braun S, Jawansky S, Vogt W, Mehilli J, Schömig A, et al. Assessment of ADP-induced platelet aggregation with light transmission aggregometry and multiple electrode platelet aggregometry before and after clopidogrel treatment. *Thromb Haemost* 2008; 99(1):121-6.
32. Seyfert UT, Haubelt H, Vogt A, Hellstern P. Variables influencing Multiplate(TM) whole blood impedance platelet aggregometry and turbidimetric platelet aggregation in healthy individuals. *Platelets* 2007; 18(3): 199-206.
33. Linnemann B, Schwonberg J, Rechner AR, Mani H, Lindhoff-Last E. Assessment of clopidogrel non-response by the PFA-100 system using the new test cartridge INNOVANCE PFA P2Y. *Ann Hematol* 2010; 89: 597-605.
34. Antić A, Stanojković Z, Stanojević G, Mačukanović-Golubović L. Laboratorijsko praćenje efekta primene aspirina i klopidoigrela. *Bilt Transfuziol* 2011; 57(1-2): 64-9.
35. Paniccia R, Antonucci E, Maggini N, Romano E, Gori AM, Marucci MD, et al. Assessment of platelet function on whole blood by multiple electrode agregometry in high-risk patients with coronary artery disease receiving antiplatelet therapy. *Am J Clin Pathol* 2009; 131: 834-42.

Corresponding author: Ana Antić, PhMD
Blood Transfusion Institute Niš
Boulevard dr Zoran Đinđić 48, Niš, Serbia
e-mail: drana.antic@gmail.com

REVIEW OF PULMONARY ARTERIOLE HYPERTENSION (PAH) WITH AN EMPHASIS ON TREATMENT METHODS INVOLVING BIOENGINEERING

Kristina Fritz ¹, Milena Todorovic ², Bela Balint ^{3,4,5} and Mirjana Pavlovic ¹

¹ Department of Computer Science and Electrical Engineering /Bioengineering FAU, Boca Raton, FL, 33431, USA;

² Clinic for Hematology, Clinical Center of Serbia, Belgrade, Serbia;

³ Department of Medical Sciences, Serbian Academy of Sciences and Arts;

⁴ Department of Transfusion Medicine, Institute of Cardiovascular Diseases "Dedinje";

⁵ Institute for Medical Research, University of Belgrade, Serbia.

Key words: Hypertension, Pulmonary, Treatment, Bioengineering

1. Introduction

The intention of this paper is to review the current diagnostic and treatment options for patients with Pulmonary Arteriole Hypertension (PAH) with an emphasis on bioengineering. Pulmonary Arteriole Hypertension is a rare genetically-based progressive and fatal disease that describes an increase in pulmonary vascular pressures caused by progressive endothelial cell growth, smooth muscle hypertrophy, and adventitial expansion in the smallest pulmonary arteries.^{1,2,3} Patients symptoms, characterized by shortness of breath, chest pain, dizziness and little exercise capability, are seen in multiple diseases and thus correct diagnosis is the first step to help treat patients. By reviewing the literature new insights can lead to improvements in the current designs, techniques, and/or can inspire new methods that may better diagnose and treat patients with Pulmonary Arteriole Hypertension. This paper is organized in sections as follows; (2) Defining Pulmonary hypertension and the importance of developing new diagnostic and treatment tools, (3) reviewing current methods/techniques used to diagnose PAH, including immunoassays, echocardiograms, and in

vasive techniques respectively, (4) reviewing treatment designs, including stem cell, pharmaceutical, gene based, and bioengineered tissue therapies, (5) outlining the success of individual therapies and testing alternatives, (6) discussing the issues and barriers of using specific therapies, and (7) concluding remarks and future suggestions for PAH diagnostic and treatment methods.

2. Pulmonary Hypertension and the Importance of Developing New Options for Diagnosis and Treatment

2.1 Pulmonary Hypertension

Pulmonary Arteriole Hypertension (PAH) is a rare disease that corresponds to a group of pulmonary vascular pathologies.¹ PAH is characterized by the remodeling of small pulmonary arteries in a way that infringes on the body's ability to exchange oxygen, causing shortness of breath, limited exercise capacity, elevated pulmonary artery pressure and eventually right heart failure.^{2,3} Unusually, pulmonary hypertension affects more females, nearly 2 females to every 1 male diagnosed

and typically diagnosed during middle age.^{3,4} However, the various nature of pulmonary hypertension affects individuals young and old and in varying severities.³ Similar to the unique statistics of who is affected, the cause of pulmonary hypertension is also not clearly defined. Pulmonary hypertension is organized into five groups, called the Dana Point classification designed in 2008, based on cause of the disease.⁵ Group I includes individuals who have the disease with no identified risk factors or family members with PAH in addition to individuals who have inherited the disease.⁵ Risk factors include drug and toxin induced PAH, PAH associated with connective tissue disease, HIV infection, portopulmonary hypertension, congenital heart disease, Schistosomiasis and hemolytic anemia.^{1,2,5} Group II includes PAH due to left heart disease.⁵ Group III includes PH due to lung diseases and or hypoxia.⁵ Group IV includes chronic thromboembolic PH and group V includes individuals who have multifactorial etiologies and an unclear cause.⁵

Most research is done on group I patients as the PAH they experience is not secondary to another disease. Determining the genetic and/or other causes of individuals in group 1 is of main concern as it will help with treatments of all five group. Genetic research has found that pulmonary hypertension is autosomal dominant disease with reduced penetrance, female predominance and genetic anticipation.⁴ A mutation found in many (60-80%) heritable PAH patients include a genetic defect on chromosome 2q31-32 encoding bone morphogenetic protein receptor type 2, a member of the TGF-beta receptors. Although this mutation is heritable and is associated with individuals with heritable PAH the disease expressivity is variable in severity and age of onset.⁴ Genetic testing includes screening for BMPR2 mutations as well as others that have shown to have some commonality in HPAH patients, including EIF2AK4, ALK1,

ENG, SMAD9, CAV1, and KCNK3.^{4,6,7} Additionally, patients diagnosed with idiopathic pulmonary hypertension often do not have the mutation.

Pulmonary hypertension does not have a sole cause, however diagnosis is assigned to patients with a pulmonary artery pressure greater than 25mmHg at rest who do not have another condition that may cause elevation in the artery, such as left-heart disease, chronic hypoxia, pulmonary veno-occlusive disease, chronic obstructive pulmonary disease, and chronic thromboembolic pulmonary disease.^{2,3} Thus, pulmonary hypertension is hard to classify, diagnose and treat.

2.2 Importance of Developing Diagnostic and Treatment Options

Most of the pulmonary hypertension research is very recent. In the 1960's it was found that there was a link between PAH and toxic chemicals, such as the weight loss drug aminorex fumarate, toxic rapeseed oil, and fenfluramine.^{9,10} Since the 1980's, PAH was known to complicate a plethora of diseases, such as HIV, hemolytic anemia, etc.³ The tentacles of this disease are far reaching and affect a large population since it affects much more than the rare idiopathic cases. In the 80's patients diagnosed with pulmonary hypertension had a limited quality of life and a bleak prognosis; the median survival after diagnosis was 2.8 years.³ Starting in the 1990's there were improvements on individuals with PAH, in the form of intravenous epoprostenol treatment, which increased the quality of life and survival rate.³ It was clear that the limited efficacy of the vasodilators, diuretics and anticoagulants and the success of epoprostenol characterized pulmonary hypertension as a progressive irreversible remodeling of the small pulmonary vessels caused by the overexpression of endothelin-1.¹¹ Since the 1990's different vasodilators

and vasoconstrictor antagonists have been developed, such as treprostinil, iloprost, endothelin-1 receptor antagonists, and phosphodiesterase type 5 inhibitors.^{12,13,14} Unfortunately, these treatments are not curative and have not been compared side by side to determine an optimal therapy. Perhaps the different responses suggest different stages/severity of the disease require different treatments. Additionally, the treatments are expensive, and some patients do not respond immediately or become less responsive over time leading to the last treatment option, lung transplantation.^{3,15} Lung transplants are difficult to acquire and have had limited success and survival rates.¹⁵

Current research suggests that the differences in PAH patients can be determined with more specific testing and genetic testing. Creating better and more accurate ways to correctly diagnose individuals with PAH will help individualize patient care and better treat the disease. In addition to creating better diagnostic tools, new treatment options are vital to the increased survival and quality of life. Current studies in tissue engineering and regenerative medicine have led to possible new treatment options for individuals with PAH. Whilst the idiopathic form of PAH is rare, pulmonary hypertension as a result of other diseases or health risks such as hypoxia, amphetamines use, and exposure to diesel pollution makes new methods to diagnose and treat pulmonary hypertension critical to the health of people worldwide and thus focus on developing new options for diagnosis and treatment is imperative.^{3,8}

3. Studies in Design and Development of Diagnostic Tools

3.1 Diagnosing PAH

Diagnosing pulmonary hypertension has always been challenging because of the

histological basis of the disease and the mortality associated with biopsy as well as the slow buildup of symptoms caused by the underlying histological changes.^{5,10} Vascular remodeling that can be seen in PAH describes thickened endothelial cells in the tunica media of the small blood vessels in the lung and causes pulmonary vascular resistance, right heart failure and eventually death.¹⁶ Due to the contraindication of lung biopsy alternative methods to assess the symptoms of the vascular remodeling are used. Currently diagnosis of pulmonary hypertension is based off results of right heart catheterization, an invasive procedure that provides information on the pressure inside the pulmonary artery and the heart. Beyond right heart catheterization there are still very few methods that are used to diagnose and monitor PAH with varying degree of efficacy; symptomology, chest radiograph, chest computed tomography (CT) scans, positron emission topography (PET) scans, magnetic resonance imaging (MRI), electrocardiogram (ECG), pulmonary function test, cardiopulmonary exercise testing, gas exchange tests, and blood tests.^{16,17}

3.2 Symptomology and Physical Testing

Symptoms of individuals are often nonspecific making it very difficult to diagnose a patient through their symptoms. The most common symptoms for people with PAH is fatigue and dyspnea, chest pain, dizziness, palpitations, cough and edema.^{16,17} Due to the common nature and sometimes unnoticeable early symptoms it takes nearly 2 years since onset of symptoms for proper diagnosis.¹⁶ Early diagnosis is preferred for patients with PAH because the stress placed on the right side of the heart due to increased pulmonary vascular resistance causes irreversible damage to heart muscle tissue, particularly after enlargement of the heart (cardiomegaly) occurs.¹⁷

In addition to utilizing symptoms to help diagnose an individual with PAH a 6-minute walking test and pulmonary function testing are used. 6-minute walking tests are used to measure exercise capability as a common diagnostic tool, as well as severity indicator and an indicator of progress during treatment.^{16,17} Pulmonary function testing measures how well gases are exchanged (spirometry) and are also helpful when diagnosing and monitoring patients.¹⁶ While both of these tests are listed as diagnostic indicators and are shown to be inversely correlated with PAH it is clear that neither of them provide an exact source of what is causing the limited exercise capability or impaired lung functioning, thus requiring more exact forms of diagnosis.

3.3 Electrocardiograms

Electrocardiograms can tell a provider a large amount of information regarding the electrical conductivity of the heart. In regards to PAH, electrocardiograms will show the right-heart chamber adaptations because of the increased pulmonary vascular resistance.¹⁶ These adaptations include right axis deviation seen 79% of the time and right ventricle hypertrophy seen 87% of time.¹⁶ Although ECG's are an important observation tool, electrocardiograms are insufficient as a stand-alone diagnostic tool because ECGs cannot distinguish the cause of the abnormalities to be pulmonary hypertension.

3.4 Imaging

Imaging is a helpful diagnostic tool that helps the doctor visualize what is taking place inside the body without invasive surgery. The imaging techniques that are commonly used in diagnosing PAH are echocardiogram, radiography, chest computed tomography scans, magnetic resonance imaging, and positron emission tomography scans.^{16,17} While

each of these imaging technologies provides different information, the two that provide the most information and are used the most often are transthoracic Doppler echocardiography that can provide an estimation of pulmonary pressure, tricuspid jet velocity, tricuspid regurgitant jet and the MRI which can accurately measure the structure and function of the right ventricle.¹⁶ While MRI and Doppler echocardiograms are routinely used the MRI is much more reliable at correct diagnosis than echocardiograms. Echocardiograms have been shown to produce many false positive and worse, false-negatives due to the misinterpretation of the results based on the computational algorithms.¹⁸ Both Echocardiograms and MRI's are used to help diagnose, but they cannot completely help a physician distinguish between subcategories within pulmonary hypertension, like category 1' that includes pulmonary veno-occlusive disease (PVOD) and pulmonary capillary hemangiomatosis (PCH). Diagnosing these two subcategories of PAH are extremely important because traditional treatment options for IPAH can lead to death in patient with PVOD and PCH.⁷ It should be noted that current research to better echocardiogram diagnosis is currently being done by improving the Bernoulli algorithm by evaluating an uncertainty impact into the equation and revising criteria to provide a more accurate diagnosis, particularly for those individuals with PAH.^{18,19}

3.5 Blood analysis and Genetic Testing

Beyond the use of imaging and electrocardiography and physical testing, blood analysis and genetic testing are used to help diagnose PAH. Although there is no specific blood tests that are currently used to diagnose PAH, many biomarkers such as uric acid, brain natriuretic peptide, N-terminus pro-BNP

fragment, anticentromere antibodies, serum creatinine, thyroid function, antiscavenger antibodies, low titer antinuclear antibodies, plasma von Willebrand factor antigen, endothelin-1, D-dimer, as well as cardiac troponin T have been shown to indicate pulmonary hypertension.^{16,17,20-25} Although there are many biomarkers, such as BNP, NT-proBNP, and Troponin T, can be elevated for pulmonary hypertension they are not specific to PAH and could indicate other diseases that cause injury or tension to the ventricular wall.¹⁶ Current research shows that in addition to general cardiovascular biomarkers, PAH specific biomarkers exist and could be used to test for PAH.^{25,26} Endothelin-1, Th2 kinase response, and plasma von Willebrand factor antigen are useful to determine if there is pulmonary remodeling and survival of the patient and up-regulated caveolin-1, filamin A, and cathepsin D combined with increased macrophagocytes and downregulated GSTM1 could help determine the severity of PAH caused by congenital heart disease.^{25,26} However, current research still urges the use of the invasive right ventricle catheterization.

Although blood testing is very helpful to rule out diseases and help diagnose PAH additional research needs to be done to lead to a specific biomarker that can directly diagnose PAH with one robust test. Current research on a bedside test performed on an endothelial progenitor cell capture chip has shown the ability to determine the severity of PAH and check progress of treatment by using an immunoassay that can determine the number of EPC's that is correlated to cardiovascular risk.²⁷ Additionally, a microfluidic chip has been used to successfully differentiate individuals with PAH from a control group by counting the number of circulating endothelial cells (CECs) and endothelial progenitor cells (EPCs) that could potentially help diagnose PAH.²⁸

Specific and accurate tools used for diagnosing PAH include genetic testing. It is

very hard to distinguish between the type of PAH without trying different treatment or postmortem biopsy, however genetic testing can change that. Current research has shown that certain mutations, such as EIF2AK4, can distinguish PVOD and PCH from pulmonary hypertension, which would save lives by avoiding inappropriate treatments.⁶ Currently, the diagnostic capacity provided by genetic testing is limited by our knowledge of how genetics plays a role in PAH and the subpopulation of patients with heritable PAH. More research on the genetic origins of PAH will quicken the diagnosis and help make diagnosis more specific.

4. Studies in Design and Development of Treatment Options

4.1 Pharmaceutical Studies

Since the dawn of pulmonary hypertension, the pharmaceutical response was to promote vasodilation to counteract the increased vasoconstriction caused by the thickening of the endothelial tissue.¹⁶ The original vasodilators used were prostenoids, epoprostenol, trepostinil, iloprost, phosphodiesterase-5 inhibitors, sildenafil and tadalafil, endothelin receptor antagonists, bosentan and ambrisentan, and calcium channel blockers.^{16,17} Each vasodilation drug varies in efficacy and may not work for all patients. Current research to increase the number of treatment options for PAH, benefits from knowledge of how the disease works and trying to provide a solution that slows or halts the progression of endothelial thickening, increases the efficacy of certain medicines in hopes to help those who are unaffected, and better the delivery of the medicine.

Current research is being done to develop therapies that slow or halt the progression of endothelial thickening. Use of anti-inflammatory drugs to reduce the amount of

endothelial thickening caused by perivascular macrophages may be a potential treatment option in the future. A study conducted in 2018 by Florentine et al. demonstrated that in both human and murine subjects showed an increase in blood monocytes, increased chemokine expression responsible for monocyte recruitment, specifically Ccl2 and Cx3cl1, and an increase in interstitial lung macrophages.²⁹ The researchers argue that the blood monocytes are recruited and differentiate into inflammation causing macrophages in the perivascular spaces that leads to inflammatory thickening and could be alleviated if provided pharmaceutical anti-inflammatory therapies.²⁹ The thickening would be reduced by decreasing blood monocytes or inhibiting the expression of monocyte recruitment.²⁹

Additional research shows that nanoparticles loaded with rapamycin could be used as a future pharmaceutical method to slow or halt the progression of endothelial thickening. mTOR, a pathway that promotes smooth muscle cell proliferation, is hyperactive in PAH patients.³⁰ Rapamycin, an inhibitor of mTOR was shown in a murine model to accumulate in the lung and stop slow the change in arteriole thickness with no ventricular remodeling and reduced side-effects compared to the control.³⁰

Recent bioengineering research has also aided advancement in pharmaceutical treatment by increasing the efficacy and delivery of certain pharmaceutical treatment options. A study conducted by Ni et al. in 2017 showed that the length of sustainable drug release could increase dramatically with the change in shape of aerosol drugs by using polyvinyl pyrrolidone as a progeny to engineer large porous PLGA microparticles.³² The new porous design allowed for more efficient drug encapsulation and drug release and was shown to maintain sustained drug delivery for 168 hours in the mini-pig pulmonary hypertension model and 36 hours in the rat pulmonary hy-

pertension model.³² Increasing the length of sustained drug delivery could greatly improve the health of individuals with pulmonary hypertension because it will allow pulmonary hypertension patients to limit the amount of fluctuation between drug delivery as well as increase the quality of life.

Current studies have also shown a way to advance pharmaceutical treatment for individuals with PAH by providing better designs for aerosol delivery.³³ Aerosols are an alternative administration method that can directly administer the drug to the affected area of pulmonary hypertension patients. Unfortunately, when drugs are safely converted into aerosols, the drug needs to be taken more often because it quickly degrades.^{32,33} Comparable to increasing the efficacy by changing the length of sustainable drug administration, designing a unique powder that can deliver the medicine to the smallest regions of the lung, alveoli, greatly improves the treatment of individuals with PAH. A study conducted in 2016 by Muralidharan, Hayes, Black, & Mansour, showed the capability of a dry powder drug to reach the lower airways.³³

The study engineered the powder into particles to work best with the lungs aerodynamic properties for the single component and two-component spray dried dry powder inhalers and found that deposition patterns could reach lower airways.³³ By increasing the area of dispersion in the lungs, pharmaceutical drug delivery and administration is enhanced.

4.2 Gene-based Therapy Studies

In this era of bio-engineering, gene-based therapies, stem cells and tissue engineering are making large strides. Although we are still seeing advancements in pharmaceutical treatments with increased knowledge of the disease, enhanced efficacy and delivery methods with the use of nanoparticles and powder engineering, medicine is turning away

from chemical treatments of symptoms and towards biological solution to correct the source of the problem. The first of these biological methods is gene-based therapy. Gene based therapy is the use of genetic modification to directly affect the cellular processes. Currently we do not have a full proof method to modify genes in our cells with extreme accuracy, but we can genetically modify cells and inhibit or express genes that would help alleviate symptoms and work as a form of therapy.

Current research in gene-based therapy has shown that different cells can be genetically modified to be hyperactivated by stimulus and reinserted into PAH models and have a therapeutic benefit. Kim, Folcher, Charpin-El Hamri and Fussenegger in 2015 used designer cell that included a engineered a transcription factor that created additional cGMP molecules that help with vaso-dilation in treatment of PAH.³⁴ By fusing bacterial cGMP to the herpes simplex transactivation domain the researchers created a cGMP sensing transcription factor that activates synthetic promoters that create cGMP.³⁴ The designer cells that included this transcription factor could also be activated by Brain Natriuretic peptide (BNP), which is also upregulated in PAH cases.³⁴ The cGMP concentration can be further increased with the inhibition of phosphodiesterase 5 inhibitors, a current treatment of PAH.³⁴ These designer cells make it possible to continually maintain a higher baseline level of vasodilation as well as decrease the amount of PDE5 inhibitors taken by PAH patients.³⁴

Other gene-based therapy studies show that instead of using genetically modified cells, a protein or biomolecule can be used to alleviate disease progression directly or indirectly by inducing transcription. Bone morphogenic proteins play a large part in development and the common mutation of BMPR2 found in pulmonary hypertension makes it an

easy target for research. Current research has shown that BMPR2 upregulation via in situ delivery or engineered endothelial progenitor cells can improve PAH in animal models.^{35,36} Heterozygous loss of function mutations in KCNK3 gene is also found in PAH patients and has been shown to help improve PAH conditions if upregulated.³⁷ KCNK3 is an acid-sensitive potassium channel that helps maintain the resting potential of the smooth muscle in the pulmonary artery.³⁷ By activating the KCNK3 or a very similar KCNK9 gene or encouraging the two proteins to co-assemble PAH could be alleviated.³⁷ Another activation technique that has helped lung repair was found by Takeda et al. (2018), who found that if mesenchymal stem cells used for therapy with all-trans retinoic acid then the p70S6k1 signaling pathways is activated and leads to the repair of lung tissue.³⁸ Alternatively, inhibiting proteins instead of activating them can also be used as a potential therapy, like that of heat shock protein 90 that has been seen to help improve arteriole remodeling when inhibited.³⁹

4.3 Stem Cell Therapy Studies

Stem cell therapy has been shown to be promising in pulmonary hypertension treatment studies. There are several types of stem cells that exist naturally in the lungs that can be naturally directed to differentiate by the introduction of various biomolecules to repair injured tissue. A few stem cells that exist in the lungs include basal stem cells, alveolar distal stem cells, broncho-alveolar stem cell, mesenchymal stem cells (recruited) and endothelial progenitor cells.⁴⁰ All of these stem cells in the lung can be differentiated into pseudostratified epithelium found in the lungs.⁴⁰ Some stem cells that do not exist naturally, but are very important to stem cell and tissue engineering are induced pluripotent stem cells (iPSCs), embryonic stem cells

(ESCs), and very small embryonic-like stem cells (VSELs).⁴⁰

Stem cells have been shown to be detrimental to health if injected into the body without the proper biological instructions to help it differentiate, thus the use of stem cells as a therapy are limited to those naturally occurring in the lungs or recruited to the lungs because of injury. Engineered endothelial and mesenchymal stem cells have been rather successful at treating pulmonary hypertension and its consequences.⁴¹⁻⁴⁶

Studies have shown that different cells that are modified to express genes that create proteins used for treatment can ameliorate PAH symptoms; reduce pulmonary arterial thickening and right ventricle hypertrophy. A study conducted in 2010 by Takemiya et al. indicated that the insertion of mesenchymal cells, which are recruited naturally to the places of injury (the lungs for patients with PH), that are transduced with prostacyclin synthase could be used as a vector for prostacyclin treatment.⁴³ Additionally, a study by Zhou et al. in 2011 and 2013 and a study conducted in 2017 by Tsilimigras et al. showed that bone marrow derived endothelial-like progenitor cells that were engineered to express an engineered fusion protein that include prostacyclin synthase and cyclo-oxygenase 1 activities could also be used as a therapy vector.^{41,42,44} Prostacyclin, while shown effective at treating pulmonary hypertension is not a feasible intravenous drug option because of its short half-life and cost because of constant intravenous inject.⁴¹⁻⁴⁴ However, these studies found that a genetically modified cells can be used as a vector to continuously provide prostacyclin to the lungs in PAH murine models. Takemiya et al. (2010) even claims to have increased the survival rates 50% compared to the control group.³⁴

In addition to stem cells used as vectors for treatment, they have also been used successfully to treat the consequences of PAH.

Secondary to endothelial thickening, right ventricle dysfunction or failure often occurs.⁴⁵ Stem cells have been used in multiple studies for congestive heart failure and right ventricle heart failure and have shown to be beneficial, but not a replacement for surgery.^{45,46}

4.4 Bioengineered Tissue Therapy Studies

The last type of therapies offered to a patient with pulmonary hypertension are the surgical ones; atrial septostomy and lung transplantation.^{16,17} These therapies are the last resort only used if no other method of treatment would respond or if a patient's condition had deteriorated to critical point. Both atrial septostomy and lung transplants have a high mortality and morbidity rate with many complications; atrial septostomy only provides limited relief and lung transplants are hard to acquire, match and requires lots of post-operative care.^{16,17,47} Better than an allogeneic donor, bioengineering has provided a method for patients own cells to be used to make tissues that genetically match, making immune-compatibility much better. The engineering of lung tissue is complicated and has not been yet been mastered, but some studies have indicated the current nature of this therapeutic method and what to expect in the future.

There are three important variables to consider when engineering tissue, the cell source, type of scaffold and the composition of the extracellular matrix.⁴⁰ Scaffolds maintain the 3D structure by being both biological and often bio-degradable, while the extracellular matrix is what provides the mechanical support, a platform for cellular support and chosen biomolecules to help the proliferation and proper growth of cells.⁴⁰ Scaffolds for the lung have been very difficult because of the unique specialization and architecture of the lungs, hydrogels and 3D printing is not ideal for lungs made for transplant, but much success has been seen with decellularization of

lungs and recellularization with addition of extracellular matrix and the subjects cells in animal models.^{40,48,49,50} This breakthrough will increase the number of viable lungs for transplant because xenotransplantation will be possible via decellularization process.

In contrast to the limited research on transplantation of entirely engineered lungs, organoids and engineered vasculature grafts have been used. The use of harvested saphenous veins that are cultured and seeded have been used as vasculature grafts including the pulmonary artery of a child successfully.^{51,52} Scaffolds and Extracellular matrix are just as important for building blood vessels. Ding et al. (2018) created a biomimetic fibrous hydrogel with composition made to resemble the native vascular tissue environment by making it tunable and stiff and encourage the proliferation of smooth muscle cells.⁵³ Many studies are done before the engineering of a tissue to ensure that the cells can be cultured and differentiated to the desired result. Studies that help inform the tissue engineering process include the growth of organoids to understand growth and development of a tissue in the organism. An experiment conducted by Miller et al. in 2018 studied the growth of in vitro induction an in vivo engraftment of lung bud tip progenitor cells derived from human pluripotent stem cells to examine the biomolecules and sequential differentiation of cells to create lung tissue.⁵⁴

Pharmaceutical therapy, cell-based therapy, stem cells and engineering tissues are all being studied to increase the knowledge and treatment of pulmonary hypertension. While no one treatment method is considered the best, it is clear many of the treatment options are still in the experimental phase and require more research to ensure the methods are safe and long lasting.

5. Testing Alternatives and Studies on Implementation of Treatment Options

Stem cells and tissue engineering are quick advancing revolutionary methods that could be used for the treatment and possible cure for pulmonary hypertension, but they can also be useful for the study of drugs in vitro without using a live animal model.^{47,55} Making lung mimics, such as air-liquid interface cultures, organoids, or lung-on-a-chip devices, can be a preferred method and very useful to create patient-specific disease models and conduct drug-screening.^{39,56} Air-liquid interfaces allows basal stem cells to grow in media with the laminal surface exposed to air to test for the patient specific-interactions to a treatment options, pathogenesis, as well as test toxicological damage of new drugs.^{39,57} Organoids allow stem cells to differentiate and self-organize into a 3D structure.^{39,58} Organoids are very helpful in understanding development and regeneration, but are not exposed to air and are less similar to a real lung environment.³⁹ Lung-on-a-chip is the most similar to a lung as it is exposed to both an endothelial membrane and air and allows for stretch during inhalation and exhalation.^{39,59} While there are limitations to these bioengineered techniques, they provide researchers with a way to test many treatments and methods on human lung cells with specific diseases without risking lives. Outside of stem cells large 3D models can be made and used for treatment options using decellularized lungs as discussed above.

In addition to testing alternatives, Noymer, Shaked, and Newel (2018), published a study regarding the user-friendliness and safety of a novel treprostinil infusion pump.⁶⁰ Many of the studies discussed published are experimental trials and very rarely do the papers discuss the patients or caregiv

ers' perspectives about the usability and feasibility of the device or procedure. In this study the ease and safety of a new pump created to fix the shortcomings of the existing parenteral therapy for pulmonary hypertension was discussed. The implementation of the drug via the new pump was well received by the patients, caregivers and nurses and found to be safe and preferred.⁶⁰

Pulmonary hypertension is a very harsh disease that presents itself in various severities with multiple causes. Not all treatments options can be applied to everyone with pulmonary hypertension. Some people respond to calcium channel blockers and need to look no further for a feasible treatment option, some individuals do not respond well to any of the current treatment options and require lung transplantation. New therapies and betterment of currently studied therapies will help provide more options to PAH patients.

6. Issues and Barriers

With new technology for diagnosis and treatment options for PAH, drawbacks exist; controversial information about endothelial progenitor cells, contradictory desired effects, overestimating the similarity of model species to human physiology, and needing more information. Some studies findings about the identity and function of lung epithelial progenitor cells in mice and humans differ and have been considered controversial.⁶¹ The variability in findings has been suggested to be caused by the limited lineage markers, tools used to isolate populations of cells in different laboratories and the difference in flow cytometry and cell sorting in different labs.⁶¹

Contradictory desired effects have been suggested to be a barrier in studies using dry powder inhalers, hypoxic conditions to induce stem cells, and problematic stem cells when building tissues. Research suggests that the use of nanoparticles may be detrimental to

an individual's health and create a response similar to dust.^{62,63} A study conducted by Dubes et al in 2017 showed that nanoparticles can have a vasoconstrictive response particularly when loaded with silicon dioxide.⁶⁴ If nanoparticles are to be used for either diagnosis biomarkers or drug delivery vectors it may be counterproductive for PAH patients, who suffer from chronic vasoconstriction, if nanoparticles creates an inflammatory vasoconstrictive response. Marsboom et al. (2008) published a study that suggests using hypoxic conditions to mobilize stem cells throughout the body for recruitment in stem cell treatment or study can actually damage and stop the reparative process at a certain limit, requiring an upper limit of hypoxia for successful treatment of PAH stem cell proliferation.⁶⁵ Lastly, an individual requiring a lung transplant or another tissue graft may not have as beneficial results if that individual has heritable PAH with similar developmental stimuli that will progress the new tissue to demonstrate pulmonary hypertension.⁶⁶

An issue that is always confronted when comparing studies that use model species, experiments using murine models should not be thought to represent exactly what happens in human PAH. Gomez-Arroyo et al. (2012), discuss at length the fault of the murine PAH model to be completely comparable to human PAH.⁶⁷ Specifically, murine PH does not contain three integral characteristics that human PAH including the obliteration of blood arterioles, non-reversibility of PAH and the development of right ventricle heart failure.⁶⁷ Mice do not naturally develop pulmonary hypertension and do not develop it when mutations are made in locations that would usually cause PAH in humans, so the induction of PH in mice via monocrotaline that causes endothelial thickening or pulmonary artery constriction/banding is required.⁶⁷ Thus, mice are not able to truly show complete recovery because the arterioles are not com

pletely remodeled, as seen in human PAH, the mice cannot reverse PAH because they continue to have the band or monocotiline side effects, and cannot have right ventricular failure because the disease does not progress to add additional stress to the right ventricle, it is constant and unchanging.⁶⁷

The last issue confronting advancement and perfection of current treatment and diagnosis is the limited knowledge known about PAH. The exact developmental pathways, biomarkers, and genes that influence the development, severity and cause of PAH is still unknown.⁶⁸ The current studies are limited by the knowledge unknown that may be the best indicator of pulmonary hypertension or the breakthrough needed for a cure without needing a lung transplant.

7. Conclusion

After reviewing the importance of developing new options for diagnosis and treatment for pulmonary hypertension, the different techniques used to diagnose pulmonary hypertension, the techniques that are or could be used to treat pulmonary hypertension, explored alternative treatments and the outcomes of implementation of treatment and diagnostic tools, and the reviewed the issues and barriers of PAH studies we can draw a few simple conclusions; (1) the preferred diagnostic method for pulmonary hypertension is still invasive cardiac catheterization, (2) there are a many new and promising treatments for pulmonary hypertension beyond pharmaceuticals, like gene-based treatments, stem cell treatments, and engineered pulmonary and vascular tissues, (3) testing can be patient-specific and (4) implementation of PAH treatments may not elicit the same response in all patients with PAH. In spite of these conclusions, pulmonary arteriole hypertension is still not completely understood and difficult to diagnose and treat. Diagnosis of patients with pulmo-

nary hypertension after symptoms begin is long, about two years. The variability of severity and progression is still not fully understood, and model species may not be the best for PAH studies.

Advancements are already being made to fix many of these shortcomings, like alternative testing (lung-on-a-chip) that can be patient specific, more research is being done and spreading awareness of the disease and its symptoms and continued research is being done on developmental biology to determine pathophysiological differences in vivo and in vitro (organoids). However, further research can be done on pulmonary hypertension to continue advancement in both diagnosis and treatment.

Directions for new research in pulmonary hypertension may be therapeutic treatment of the Warburg effect, developmental proteins, all-trans retinoic acid as a therapy, and the use of VSELs for transplantation. The Warburg effect is a shift from mitochondrial oxidative phosphorylation to glycolysis in certain tissues.⁶⁹ In pulmonary hypertension the Warburg effect is seen to occur in the pulmonary vessels and right ventricle.^{31,69} Successful treatment of the Warburg effect has been seen with the use of α -lipoic acid and hydroxycitrate in many animal models and is thought to help with similar problems affecting people with cancer.^{31,69} Although more research needs to be done to understand why mitochondria in the lungs switch to glycolysis and ensure that they are still functional and can respond to treatment, α -lipoic acid and hydroxycitrate may be a potential research candidate for new pharmaceutical therapies.⁶⁹ Future research should also be done to increase our understanding of how developmental proteins work with together to result in pulmonary hypertension. Research has shown that in both Zebrafish and Mice VEGFR3 interacts with BMPR2 during development and could possibly help explain and help stop the

development of PAH in humans by using VEGF to discourage the development of PAH.⁷⁰ VSEL proliferation should also be researched. If VSELs are mobilized and proliferate in large enough numbers in PAH patients, then they could be used as pluripotent stem cells for tissue engineering that could heal or cure the condition.⁷¹

References

1. G. Simonneau, M.A. Gatzoulis, I. Adatia, D. Celermajer, C. Denton, A. Ghofrani, et al. Updated clinical classification of pulmonary hypertension. *J Am Coll Cardiol*. 2013; 62 (suppl) :D34–D41. doi: 10.1016/j.jacc.2013.10.029.
2. J.R. Runo and J.E. Loyd, Primary pulmonary hypertension, *Lancet*, vol. 361, pp. 1533-1544, 2003.
3. M. Humbert and J.P. Lynch, *Pulmonary hypertension*. New York: Informa Healthcare, 2009.
4. E.D. Austin, J.E. Loyd, and J.A. Phillips III, "Genetics of PAH," *Pulmonary hypertension*, New York: Informa Healthcare, pp. 83-91, 2009.
5. G. Simonneau, N. Calie, L.J. Rubin et al., "Clinical classification of pulmonary hypertension," *J Am Coll Cardiol*, 43, pp. 5S-12S, 2004.
6. C. Hadinnapola, M. Bleda, M. Haimel, et al, "Phenotypic Characterization of EIF2AK4 Mutation Carriers in a Large Cohort of Patients Diagnosed Clinically with Pulmonary Arterial Hypertension," *Circulation Research*, 136(21), 2022+, 2017.
7. E.D. Austin, and J.E. Loyd, "The Genetics of Pulmonary Arterial Hypertension," *Circulation Research*, 115(1), 189–202,
8. J. Liu, X. Ye, D. Ji, X. Zhou, C. Qiu, W. Liu and L. Yu, "Diesel exhaust inhalation exposure induces pulmonary arterial hypertension in mice," *Environmental Pollution*, 237, pp.747-755, 2018.
9. H.P. Gurtner, Pulmonary hypertension, "plexogenic pulmonary arteriopathy) and the appetite depressant drug aminorex: post or propter?, *Bulletin europeen de physiopathologie respiratoire*, 15, pp 897-923, 1979.
10. G. Simonneau, M. Fartoukh, O. Sitbon, et al, Primary pulmonary hypertension associated with the use of fenfluramine derivatives. *Chest*, 114, pp. 195S-199S, 1998.
11. O. Sitbon. "Pulmonary Arterial Hypertension: Conventional Therapy," in M. Humbert and J.P. Lynch III, *Pulmonary Hypertension*, pp.325-337, New York: Informa Healthcare USA, 2009.
12. P. Forfia and V. McLaughlin, "Medical Treatment of PAH: Prostacyclins," in M. Humbert and J.P. Lynch III, *Pulmonary Hypertension*, pp.325-337, New York: Informa Healthcare USA, 2009.
13. N. Galie, "Phosphodiesterase Type 5 Inhibitors," in M. Humbert and J.P. Lynch III, *Pulmonary Hypertension*, pp.325-337, New York: Informa Healthcare USA, 2009.
14. K. Kemp and M. Humbert. "Medical Treatment of Pulmonary Arterial Hypertension: Endothelin Receptor Antagonists," in M. Humbert and J.P. Lynch III, *Pulmonary Hypertension*, pp.325-337, New York: Informa Healthcare USA, 2009.
15. P.G. Dartevelle, E. Fadel, S. Mussot, D. Fabre, O. Mercier, M. Humbert and G. Simonneau, "Surgical Management of Pulmonary Hypertension," in M. Humbert and J.P. Lynch III, *Pulmonary Hypertension*, pp.325-337, New York: Informa Healthcare USA, 2009.
16. Agustí, G.A. Silvestri, and S.G. Spiro, *Clinical respiratory medicine expert consult (4th ed.)*. Philadelphia, PA: Saunders, 2012. Retrieved from <http://ezproxy.fau.edu/login?url=http://www.clinicalkey.com.ezproxy.fau.edu/dura/browse/bookChapter/3-s2.0-C2010066874X>.
17. R. Saggar, R. Saggar, J.A. Belperio, D. Zisman, J.P. Lynch III, and J. Aboulhosn, "Diagnosis and Hemodynamic Assessment of Pulmonary Arterial Hypertension," in M. Humbert and J.P. Lynch III, *Pulmonary Hypertension*, pp.325-337, New York: Informa Healthcare USA, 2009.
18. R. Morello, C. De Capua, F. Lamonaca and M.G. Belvedere, "Experimental validation of revised criteria for pulmonary hypertension diagnosis by uncertainty evaluation," *IEEE Transactions on Instrumentation and Measurement*, 63(3), 592-602, 2014. doi:10.1109/TIM.2013.2281559
19. Opatowsky AR, Ojeda J, Rogers F, et al. A simple echocardiographic prediction rule for

- hemodynamics in pulmonary hypertension. *Circ Cardiovasc Imag.* 2012;5:765–75. [PMC free article] [PubMed]
20. A.K. Andreassen, R. Wergeland, S. Simonsen, et al, “N-terminal pro-B-type natriuretic peptide as an indicator of disease severity in a heterogenous group of patients with chronic precapillary pulmonary hypertension, *American Journal of Cardiology*, 98, pp. 525-529, 2006.
 21. S.J. Shah, T. Thenappan, S. Rich, et al., “Association of serum creatinine with abnormal hemodynamics and mortality in pulmonary arterial hypertension, *Circulation*, 117, pp. 2475-2483, 2008.
 22. J.W. Chu, P.N. Kau, J.L. Faul, et al., “High prevalence of autoimmune thyroid disease in pulmonary arterial hypertension, *Chest*, 122, pp. 1668-1673, 2002.
 23. S. Rich, K. Kieras, K Hart, et al., “Antinuclear antibodies in primary pulmonary hypertension, *Journal of American College of Cardiology*, 8, 1307-1311, 1986.
 24. R.A. Isern, M. Yanea, E. Weiner, et al., „Autoantibodies in patients with primary pulmonary hypertension: association with anti-Ku, *American Journal of Medicine*, 93, pp. 307-312, 1992.
 25. A.A. Lopes, A.C. Barreto, N.Y. Maeda, C. Cicero, R.P.S. Soares, S.P. Bydlowski, and S. Rich, “Plasma von Willebrand factor as a predictor of survival in pulmonary arterial hypertension associated with congenital heart disease,” *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 44, pp 1269-1275, 2011.
 26. L. Huang, L. Li, E. Hu, G. Chen, X. Meng, C. Xiong, and J. He, “Potential biomarkers and targets in reversibility of pulmonary arterial hypertension secondary to congenital heart disease: an explorative study, *Pulmonary Circulation*, vol 8, 2, 2018. <https://doi.org.ezproxy.fau.edu/10.1177/2045893218755987>
 27. G. Hansmann, B.D. Plouffe, A. Hatch, A. von Gise, H. Sallmon, R.T. Zamanian, and S.K. Murthy, “Design and validation of an endothelial progenitor cell capture chip and its application in patients with pulmonary arterial hypertension,” *Journal of Molecular Medicine*, 89(10), pp. 971-983, 2011. doi:10.1007/s00109-011-0779-6
 28. Sallmon, H., Hatch, A., Murthy, S. K., Plouffe, B. D., & Hansmann, G. (2017). Circulating Endothelial Cell Quantification by Microfluidics Chip in Pulmonary Arterial Hypertension. *American journal of respiratory cell and molecular biology*, 56(5), 680-682.
 29. J. Florentin, E. Coppin, S.B. Vasamsetti, J. Zhao, Y. Tai, et al., “Inflammatory Macrophage Expansion in Pulmonary Hypertension Depends upon Mobilization of Blood-Borne Monocytes,” *Journal of Immunology*, 200 (10), pp. 3612-3625, 2018.
 30. V. Segura-Ibarra, J. Amione-Guerra, A.S. Cruz-Solbes, F.E. Cara, D.A. Iruegas-Nunez, S. Wu, E. Blanco, “Rapamycin nanoparticles localize in diseased lung vasculature and prevent pulmonary arterial hypertension,” *International Journal of Pharmaceutics*, 524, pp.257-267, 2017.
 31. M.K. Culley and S.Y. Chan, “Mitochondrial metabolism in pulmonary hypertension: beyond mountains there are mountains,” *Journal of Clinical Investigation*, 9, pp.3704, 2018.
 32. R. Ni, U. Muenster, J. Zhao, L. Zhang, E. Becker-Pelster, M Rosenbruch and S. Mao, “Exploring polyvinylpyrrolidone in the engineering of large porous PLGA microparticles via single emulsion method with tunable sustained release in the lung: In vitro and in vivo characterization,” *Journal of Controlled Release*, 249, pp. 11-22, 2017.
 33. P. Muralidhara, D. Hayes Jr., S.M. Black, and H.M. Mansour, “Microparticulate/nanoparticulate powders of novel Nrf2 activator and an aerosol performance enhancer for pulmonary delivery targeting the lung Nrf2/Keap-1 pathway,” *Molecular Systems Design and Engineering*, 1, vol. 1, pp. 45-68, 2016.
 34. T. Kim, M. Folcher, G. Charpin-El Hamri, and M. Fussenegger, “A synthetic cGMP-sensitive gene switch providing Viagra®-controlled gene expression in mammalian cells and mice,” *Metabolic Engineering*, 29, pp. 169-179, 2015.
 35. R. Harper and P. Reynolds, “BMP2 upregulation via in situ gene delivery or via engi-

- neered endothelial progenitor cells alleviates pulmonary arterial hypertension (PAH) in a rat model,” *Respirology*, 20, 30-30, 2015.
36. M. Kim and S. Choe, “BMPs and their clinical potentials,” *Bmb Reports*, 44(10), pp. 619-634, 2011.
 37. M.S. Bohnen, D. Roman-Campos, C. Terrenoire, J. Jnani, K.J. Sampson, W.K. Chung, and R.S. Kass, “The impact of heterozygous KCNK3 mutations associated with pulmonary arterial hypertension on channel function and pharmacological recovery,” *Journal of the American Heart Association* 6(9), e006465, 2017.
 38. K. Takeda, F. Ning, J. Domenico, M. Okamoto, S. Ashino, S. Kim, and E.W. Gelfand, “Activation of p70S6 kinase-1 in mesenchymal stem cells is essential to lung tissue repair,” *Stem Cells Translational Medicine*, 7(7), pp.551-558, 2018.
 39. K.A.A. Schilders, E. Eenjes, S. van Riet, A.A. Poot, D. Stamatielis, R. Truckenmuller, and R.J. Rottier, “Regeneration of the lung: Lung stem cells and the development of lung mimicking devices,” *Respiratory Research*, 17, 44, 2016.
 40. Study Findings on Hypertension Are Outlined in Reports from Second Military Medical University, “Inhibition of heat shock protein 90 improves pulmonary arteriole remodeling in pulmonary arterial hypertension,” *Obesity, Fitness & Wellness Week*, pp. 1256, 2017.
 41. L. Zhou, Z. Chen, P. Vanderslice, S. So, K. Ruan, J.T. Willerson, and R.A.F. Dixon, “Endothelial-like progenitor cells engineered to produce prostacyclin rescue monocrotaline-induced pulmonary arterial hypertension and provide right ventricle benefits,” *Circulation* 128(9), pp.982-994, 2013.
 42. J.R. Lavoie, and D.J. Stewart, “Genetically Modified Endothelial Progenitor Cells in the Therapy of Cardiovascular Disease and Pulmonary Hypertension,” *Current Vascular Pharmacology*, 10(3), pp. 289-299, 2012.
 43. K. Takemiya, H. Kai, H. Yasukawa, N Tahara, S. Kato, and T. Imaizuma, “Mesenchymal stem cell-based prostacyclin synthase gene therapy for pulmonary hypertension rats,” *Basic Research in Cardiology*, 105 (3), pp. 409-417, 2010.
 44. L. Zhou, Z. Chen, P. Vanderslice, S. So, K. Ruan, J.T. Willerson, and R.A.F. Dixon, “Prevention of monocrotaline-induced pulmonary arterial hypertension using bone marrow-derived endothelial-like progenitor cells expressing and engineered protein with combined cyclooxygenase-1 and prostacyclin synthase activities,” *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 183, 2011.
 45. D.I. Tsilimigras, E.K. Oikonomou, D. Moris, D. Schizas, K.P. Economopoulos, and K.S. Mylonas, “Stem Cell Therapy for Congenital Heart Disease: A Systematic Review,” *Circulation*, 136(24), pp. 2373-2385, 2017.
 46. K. Liu, R. Liu, G. Cao, H. Sun, X. Wang and S. Wu, “Adipose-derived stromal cell autologous transplantation ameliorates pulmonary arterial hypertension induced by shunt flow in rat models,” *Stem Cells and Development*, 2011.
 47. P. Anversa, M.A. Perrella, S. Kourembanas, A.M.K. Choi, and J. Loscalzo, “Regenerative Pulmonary Medicine: Potential and Promise, Pitfalls and Challenges,” *European Journal of Clinical Investigation*, 42(8), pp. 900-913, 2012.
 48. A.P. Price, K.A. England, A.M. Matson, B.R. Blazar, and A. Panoskaltsis-Mortari, “Development of a Decellularized Lung Bioreactor System for Bioengineering the Lung: The Matrix Reloaded,” *Tissue Engineering Part A*, 16, pp. 2581-91, 2010.
 49. A.J. Booth, R. Hadley, A.M. Cornett, A.A. Dreffs, S.A. Matthes, J.L. et al., “Acellular Normal and Fibrotic Human Lung Matrices as a Culture System for in vitro Investigation,” *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 186, pp. 866-76, 2012.
 50. J.E. Nichols, J.A. Niles, S.P. Vega, L.B. Argueta, A. Eastaway and J. Cortiella, “Modeling the Lung: Design and Development of Tissue Engineered Macro- and Micro- Physiologic Lung Models for Research Use, Experimental Biology and Medicine, 239, pp. 1135-69, 2014.

51. G. Matsumara, N. Hibino, Y. Ikada, H. Kurosawa, and T. Shin'oka, "Successful Application of Tissue Engineered Vascular Autografts: Clinical Experience, Biomaterials, 24, pp. 2303-2308, 2003.
52. T. Shin'oka, Y. Imai, and Y. Ikada, "Transplantation of a Tissue-engineered Pulmonary Artery," *New England Journal of Medicine*, 344, pp. 532-533, 2001.
53. Y. Ding, X. Xu, S. Sharma, M. Floren, K. Stenmark, S.J. Bryant, and W. Tan, "Biomimetic Soft Fibrous Hydrogels for Contractile and pharmacologically Responsive Smooth Muscle," *Acta Biomaterialia*, 74, pp. 121-130, 2018.
54. A.J. Miller, D.R. Hill, M.S. Nagy, Y. Aoki, B.R. Dye, A.M. Chin and J.R. Spence, "In Vitro Induction and In Vivo Engraftment of Lung Bud Tip Progenitor Cells Derived from Human Pluripotent Stem Cells," *Stem Cell Reports*, Vol 10, Issue 1, pp. 101-119, 2018.
55. D. Huh, G.A. Hamilton and D.E. Ingber, "From 3D Cell Culture to Organs-on-Chips," *Trends in Cellular Biology*, 21, pp. 745-754, 2011.
56. M. Aufderheide, C. Forster, M. Beschay, D. Branscheid, and M. Emura, "A New Computer-Controlled Air-Liquid Interface Cultivation System for the Generation of Differentiated Cell Cultures of the Airway Epithelium, *Experimental and Toxicological Pathology*, 68(1), pp. 77-87, 2015.
57. N. Gjorevski, A. Ranga, M.P. Lutolf, "Bio-engineering Approaches to Guide Stem Cell-Based Organogenesis," *Development*, 141, pp. 1794-1804, 2014.
58. R.R. Nadkarni, S. Abed and J.S. Draper, "Organoids as a Model System for Studying Human Lung Development and Disease," *Biochemical and Biophysical Research Communications*, S0006-291X(15)31096-2, 2015.
59. A.O. Stucki, J.D. Stucki, S.R.R. Hall, M. Felder, Y. Mermoud, R.A. Schmid, et al., "A Lung-on-a-chip Array with an Integrated Bio-Inspired Mechanism," *Lab on a Chip*, 15, pp. 1302-1310, 2015.
60. P. Noymer, A. Shaked and K. Newell, "Human factors and usability engineering in the development of SMT-101 for the treatment of pulmonary arterial hypertension," *Expert Opinion on Drug Delivery*, 15(4), pp. 325-333, 2018.
61. D.J. Weiss, "Concise review: Current status of stem cells and regenerative medicine in lung biology and diseases," *Stem Cells*, 32(1), pp. 16-25, 2014.
62. M.R. A-Gwinn and V. Vallyathan, "Nanoparticles: Health Effects—Pros and Cons," *Environmental Health Perspectives*, 114(12), pp. 1818-1825, 2006.
63. L. Aragao-Santiago, A. Bohr, M. Delaval, A.C. Dalla-Bona, T. Gessler, W. Seeger, W. and M. Beck-Broichsitter, "Innovative formulations for controlled drug delivery to the lungs and the technical and toxicological challenges to overcome," *Current Pharmaceutical Design*, 22(9), pp. 1147-1160, 2016.
64. V. Dubes, T. Parpaite, T. Ducret, J. Quignard, S. Mornet, N. Reinhardt, A. Courtois, et al., "Calcium signaling induced by in vitro exposure to silicium dioxide nanoparticles in rat pulmonary artery smooth muscle cells," *Toxicology*, 375, pp. 37-47, 2017.
65. G. Marsboom, P. Pokreisz, O. Gheysens, P. Vermeersch, H. Gillijns, M. Pellens and S. Janssens, "Sustained endothelial progenitor cell dysfunction after chronic hypoxia-induced pulmonary hypertension," *Stem Cells*, 26(4), pp. 1017-1026, 2008.
66. Y. Zhu, X. Chen, X. Yang and A. El-Hashash, "Stem cells in lung repair and regeneration: Current applications and future promise," *Journal of Cellular Physiology*, 233(10), pp. 6414-6424, 2018.
67. J. Gomez-Arroyo, S.J. Saleem, S. Mizuno, A.A. Syed, H.J. Bogaard, A. Abbate and N.F. Voelkel, "A brief overview of mouse models of pulmonary arterial hypertension: Problems and prospects," *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology*, 302(10), pp. L977-L991, 2012.
68. S.S. Pullamsetti, R. Schermuly, A. Ghofrani, N. Weissmann, F. Grimminger and W. Seeger, "Novel and emerging therapies for pulmonary hypertension," *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 189(4), pp. 394-400, 2014.
69. L. Schwartz, T. Seyfried, K.O. Alfarouk, J. Da Veiga Moreira and S. Fais, "Out of Warburg Effect: An Effective Cancer Treatment

- Targeting the Tumor Specific Metabolism and Dysregulated pH, 2017. doi: <https://doi.org/10.1016/j.semcan.2017.01.005>
70. C. Hwangbo, H. Lee, K Kang, H. Ju, D.S. Wiley, I. Papangeli and S. Jin, "Modulation of Endothelial Bone Morphogenetic Protein Receptor Type 2 Activity by Vascular Endothelial Growth Factor Receptor 3 in Pulmonary Arterial Hypertension," *Circulation*, 135(23), 2288+, 2017.
71. C.L. Guerin, A. Blandinieres, B. Planquette, J.S. Silvestre, D. Israel-Biet, O. Sanchez and D.M. Smadja, "Very Small Embryonic-like Stem Cells Are Mobilized in Human Peripheral Blood during Hypoxemic COPD Exacerbations and Pulmonary Hypertension. *Stem Cell Reviews and Reports*, (4), 561, 2017.

Corresponding author: Mirjana Pavlovic MD, PhD,
Dept. of Computer Science and Electrical Engineering /Bioengineering
Boca Raton, FL, 33431, USA
Tel: + 561-297-2348
e-mail mpavlovi@fau.edu

FUNKCIONISANJE I AKREDITACIJA CENTRA ZA TRANSPLANTACIJU MATIČNIH ĆELIJA U KONTEKSTU IMPLEMENTACIJE ISO STANDARDA

Milena Todorović Balint ^{1,2}, Bela Balint ^{3,4}, Irena Đunić ^{1,2}, Mirjana Pavlović ⁵,
Milena Šantrić Milićević ^{6,2}

¹Klinika za hematologiju Kliničkog centra Srbije;

²Medicinski fakultet Univerzitet u Beogradu;

³Institut za kardiovaskularne bolesti Dedinje, Beograd, Srbija;

⁴Srpska akademija nauka i umetnosti;

⁵Department of Computer and Electrical Engineering and Computer Science, FAU, FL, USA;

⁶Institut za socijalnu medicinu

Program transplantacije matičnih ćelija hematopoeze započet je pre više od četiri decenije, a 2013. godine, Svetska mreža za transplantaciju krvi i kostne srži (WBMT) objavila je izveštaj o sprovedenih milion transplantacija na svetskom nivou.

Sadašnja tendencija, a u skorijoj budućnosti i obaveza svakog transplantacionog centra u okviru EBMT-a (European Group for Blood and Bone Marrow Transplantation) je potpuna kadrovska i strukturna opremljenost, i spremnostistog da se uključi u proces akreditacije od strane stručnog neprofitabilnog akreditacionog tela: JACIE (Joint Accreditation Committee International Society for Cellular Therapy (ISCT) koje reguliše rad u oblasti translantacije.

Ulazak u postupak akreditacije transplantacionog centra podrazumeva pored implementacije procesa edukacije i obuke osoblja, zadovoljavanje određenih standarda kontrole kvaliteta, kao što su: ISO 9001:2015 (sistemi menadžmenta kvalitetom) [1], ISO 13485 (standardi za infrastrukturu i medicinsku opremu u sterilnim sobama i laboratorijama za standardizovanu aferezu i kriokonzervaciju matičnih ćelija) [2], ISO 15189 (sistem standarda za medicinske laboratorije)[3]. i ISO 17025 (standardi za testiranje i kalibraciju laboratorijske opreme)[4,5].

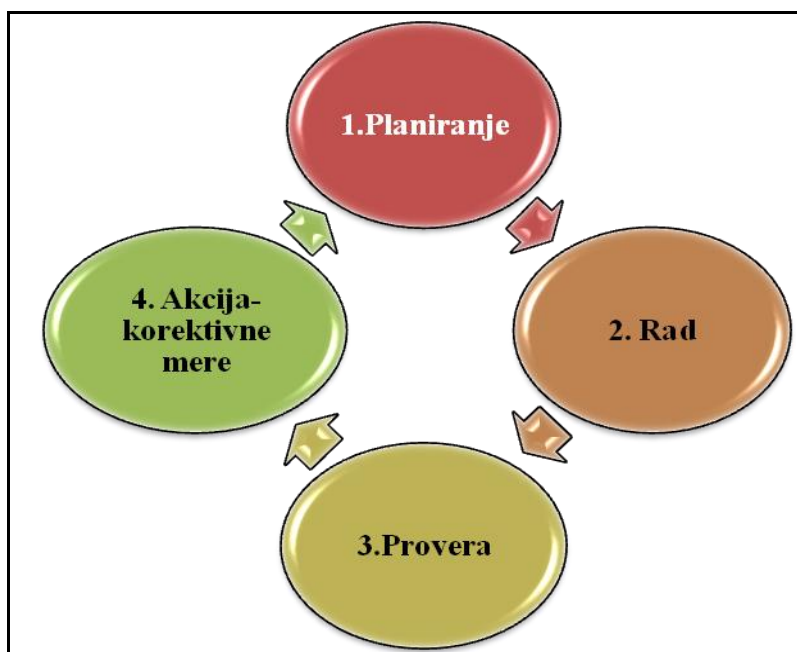
ISO standardi vezani za funkcionisanje Centra za transplantaciju

ISO (International Organization for Standardization-Međunarodna organizacija za standardizaciju) je nezavisna, nevladina međunarodna organizacija sa članstvom od 162 nacionalnatela za standarde. Kroz ekspertsko mišljenje stručnjaka članova ove organizacije, donose se standardi koji podržavaju inovacije i pružaju rešenja za globalne izazove. ISO je objavio više od 21000 internacionalnih standarda i srodnih dokumenata koji se odnose na sve grane industrije, od tehnologije do sigurnosti hrane, a takođe i na oblast poljoprivrede i zdravstva [6].

Standard ISO 9001:2015 Upravljanje kvalitetom u transplantaciji

ISO 9000:2007, a potom ISO 9001: 2015 predstavljaju standarde koji definišu upravljanje kvalitetom (QM - quality management) u smislu zahteva. Ovaj koncept se razvio se sredinom dvadesetog veka, uz postizanje sve većeg značaja u medicini u proteklih 20 godina. Šematski prikaz funkcionisanja strukture ISO:9001:2015 odnosi se na integrativne QM mehanizme: planiranja, rada, provjere i preduzimanja upravljanja kvalitetom određenih akcija u smislu poboljšanja kvaliteta.

Grafikon 1. Shematski prikaz sistema tipa:planiranje-rad-provera-sprovođenje akcije ("Plan-Do-Check-Act") [7].



Pomenuti trend je posebno izražen u oblasti transplantacije matičnih ćelija hematopoeze tj. transplantacije kostne srži, uglavnom kroz napore profesionalnih organizacija kao što su: Američko udruženje krvnih banaka (AABB), EBMT, ASBMT i Među-narodno društvo za ćelijsku terapiju (ISCT) uz njihove pionirske standarde i šeme akreditacije, npr. AABB-a [8], JACIE-a, kao zajedničkog odbora za akreditaciju u okviru ISCT i EBMT [9], zatim Fondacije za akreditaciju ćelijske terapije [9], NetCord-a [10]. kao i Vodiča Saveta Evrope za kvalitet i sigurnost tkiva i ćelija [11].

Kvalitet se postiže usaglašavanjem sa zahtevima na tri različita nivoa, a to su:

- (1) Pravni okvir
- (2) Sistem upravljanja kvalitetom (QMS)
- (3) Tehnički zahtevi specifični za svaku

Vrstu tkiva ili ćelija koji obezbeđuju kvalitet, sigurnost i efikasnost.

Sistem upravljanja kvalitetom (QMS) u transplantaciji

Sistem upravljanja kvalitetom (QMS) "je formalizovani sistem koji dokumentuje procese, procedure i odgovornosti za postizanje kvalitetnih politika i ciljeva." [12]. U kontekstu sprovođenja programa transplantacije matičnih ćelija, to je sistem za upravljanje i kontrolu svih aspekata vezanih za pružanje transplantacije kao terapijske strategije uz mehanizam obezbeđivanja tačnosti svih rezultata. QMS treba da bude: (1) globalan, da pokrije sve povezanosti; (2) fleksibilan, kako bi se prilagodio napretku u medicinskoj i naučnoj praksi; i (3) treba da stvara stalno poboljšanje [13]. QM u transplantaciji takođe se može shvatiti kao tekuća procena stabilnosti, reproducibilnosti i efikasnosti kritičnih procesa kako bi se kontinuirano poboljšala efikasnost programa i ishod lečenja pacijenata. Rezultati procene upravljanja kvalitetom (QM) upoređuju

se sa unapred utvrđenim specifikacijama, koje kada nisu ispunjene, zahtevaju sprovođenje korektivnih mera ili poboljšanje aktivnosti sa nadzorom kroz praćenje da bi utvrdi efikasnost sprovođenjem određenih promena [12].

Bez QMS-a, teško je da program transplantacije prati svoje sopstvene performanse, osigurava konzistentnost procesa, identifikuje oblasti za poboljšanje i demonstrira njegovu operativnu efektivnost prema internim i eksternim entitetima. Sada postoje dokazi da QM u transplantaciji matičnih ćelija značajno utiče na ishod lečenja pacijenta. Gratwohl i sar. [14] navode da "rad koji uključuje implementaciju QMS-a pokreće dinamičan proces povezan sa značajnim smanjenjem mortaliteta i značajno poboljšava preživljavanje nakon alogene transplantacije matičnih ćelija".

Uspostavljanje QMS-a

Među preprekama za uspostavljanje QMS-a u zdravstvenoj zaštiti uopšte, a posebno u programu transplantacije, jeste potreba da se resursi i vreme posvete njegovom uspostavljanju i održavanju. U tom kontekstu, upostavljanje QMS-a zahteva finansijsku potporu, ali pitanje koje bi možda trebalo postaviti nije koliko košta QMS, već koliko će koštati loš kvalitet?

Propisi: pravni i zakonski okvir

Većina zemalja ima pravni, odnosno zakonski okvir u okviru koga se reguliše odvijanje programa transplantacije. Ovi zakoni i podzakonska akta, tamo gde postoje, trebali bi biti prva referenca za sprovođenje QMS-a.

Kada ne postoji nacionalni pravni okvir, program treba prvo da se pozabavi međunarodnim smernicama i standardima dobre kliničke prakse koji se koriste na drugim mestima. Takođe se u uspostavljanju

QMS-a možemo rukovoditi smernicama već pomenutih stručnih udruženja ili smernicama koje ustanovljavaju međunarodne organizacije, kao što je Svetska zdravstvena organizacija (WHO) [WHO., 2010 ili Savet Evrope (CoE) [11].

Ostali resursi uključuju dokumente i linkove dostupne na Internetu Alijanse za harmonizaciju akreditacije ćelijske terapije (AHCTA) [15].

Odgovornost

Upravljanje kvalitetom je odgovornost svih koji rade u program transplantacije. Jedno određeno lice treba da bude koordinator i da upravlja sistemom kvaliteta. Ta osoba neće moći da napiše sve procedure i izvrši sav neophodan nadzor. To je direktor programa transplantacije koji je na kraju odgovoran za sprovođenje svih ranji, uključujući i QM. Direktor programa može delegirati izvršavanje zadataka na druge članove programskog tima, ali odgovornost ostaje njegova ingerencija [13].

Komponente sistema za upravljanje kvalitetom (QMS-a)

QMS obično obuhvata sledeće komponente [12]:

- Ljudi i organizacija
- Objekti, oprema i materijali
- Sporazumi
- Dokument i vođenje evidencije (Document and record-keeping)
- Praćenje proizvoda i sledivost (Product tracking and traceability)
- Revizije (Audits)
- Validacija i verifikacija
- Istraživanje i izveštavanje o neusaglašenosti, neželjenim događajima, žalbama i reakcijama (Investigation and reporting of non-conformance, adverse events, complaints, and reactions).

Ljudi i organizacija

U okviru transplantacionog centra trebalo bi da postoji dovoljno osoblja za obavljanje svih definisanih zadataka u skladu sa održavanjem zadatog kvaliteta i poštovanjem bezbednosti radnih procesa. Osoblje treba da bude obučeno i kompetentno i da ima jasne i koncizne opise posla koji obavlja. Zbog svega navedenog mora postojati organogram transplantacionog centra koji opisuje strukturu organizacije sa jasno objašnjenom odgovornošću, strukturom izveštavanja i pružanja usluga. Takođe, svaka eksterna organizaciona celina sa kojom je uspostavljena saradnja pružanja/davanja usluga vezanih za transplantaciju treba da bude predstavljena.

Obuka i obrazovanje

Važno je da organizacija osigura da osoblje ima znanja i iskustvo, uz obuku za obavljanje potrebnih zadataka. Trebalo bi da postoji plan obuke kompletnog osoblja da održi odgovarajući nivo kompetentnosti. Za svaku ulogu unutar programa postoji osnovna obrazovna struktura, iskustvo i opis posla. Obuka treba da bude dokumentovana i treba da sadrži sve oblasti na koje se odnosi. Treba definisati detaljan obrazovni program za svo osoblje. Osoblje treba proceniti na godišnjem nivou uz redovno ažuriranje svih potrebnih znanja i procedura.

Kompetentnost

Kompetentnost je sposobnost da se izvrši zadatak efikasno i sigurno u skladu sa uspostavljenim procedurama. Kompetentnost za obavljanje kritičnih zadataka mora biti procenjena i dokumentovana. Procena kompetentnosti može utvrditi potrebu za daljom obukom, koju treba obezbediti pre nego što osoba ponovo izvrši te zadatke.

Sporazumi

Ako transplantacioni program sarađuje sa eksternim organizacijama ili trećim licima, ove odnose treba regulisati pisanim sporazumima. Sporazumi objašnjavaju ko je odgovoran za svaku aktivnost ili deo procesa. Svi sporazumi trebaju biti datirani i redovno pregledani. Sporazumima se takođe definiše nivo usluga koje se pružaju van matične institucije, a u vidu sporazuma tj. ugovora o saradnji. Obzirom da institucionalne politike variraju, nadležni mogu zahtevati sporazume i za neke unutrašnje usluge.

Dokumentacija i vođenje evidencije

Dokumenta koje se koriste za potrebe QMS-a su višenamenska i imaju strukturu neophodnu za obezbeđivanje kvaliteta ("quality assurance") putem smernica i procedura. Kritični dokumenti se pridržavaju sistema kontrole kvaliteta. Svaki deo programa zahteva pisana uputstva o tome kako izvršiti ključni proces. Sva službena lica transplantacionog centra treba da koriste važeće verzije dokumenta za obavljanje zadataka. Dokumenti suosnove QMS-a, jer objašnjavaju kako se svaki od zadataka preduzima, i kada su grupisani zajedno, čine program efikasnim. Program bi trebao razviti proceduru za formatiranje, pisanje, pregled, implementaciju i kontrolu dokumentacije. Ovaj dokument se ponekad naziva "SOP" (standardni operativni postupak).

Plan upravljanja kvalitetom

Plan upravljanja kvalitetom često predstavlja priručnik, koji može biti štampan ili elektronski, a sastoji se od sledećih stavki:

- Kratak opis aktivnosti programa, uključujući populaciju, istoriju, glavne indikacije za transplantaciju, obim aktivnosti, važeće regulative, okvir i ključni

- odnosi.
- Organizaciona shema ili organogram koji definišu tim i pojedinačne uloge /odgovornosti.
 - Opis odgovornosti QMS-a, tima za upravljanje kvalitetom, edukacije, iskustva i obuke, postupke za detekciju neželjenih događaja, istraživanje, izveštavanje i rešavanje, itd.

Standardne operativne procedure

Transplantacioni program treba da održava SOP priručnik koji predstavlja zbirku politika i procedura koje sadrže detaljno napisan postupak potrebna za obavljanje procedura. Priručnik SOP-a bi trebao biti lako dostupan kompletnom osoblju.

Prvi korak u razvoju SOP-a je mapiranje odgovarajućeg procesa: npr. put tj. sledivost matičnih ćelija od donora ka pacijentu od početka do kraja. Važno je da su svi ključni procesi jasno opisani i da osoblje radi prema ovim SOP-ovima. Oni treba da odražavaju kako organizacione jedinice zaista rade, a ne kako misle da treba da rade.

Iako menadžer kvaliteta može da pomogne u izradi nacrtu, svi zaposlenici moraju prepoznati svoju odgovornost u tom procesu. Program treba da obezbedi da ključne grupe zaposlenika imaju značajan udeo u pisanju dokumenta koji je relevantan za njihov rad.

Zapisi

Obrasci, radni listovi i etikete postaju zapisi kada se završe. Zapisi sadrže ključne informacije koja se odnose na osobu ili proizvod. Objekti treba da definišu zadržavanje zapisanih arhivski period u skladu sa važećim standardima i propisima.

Kontrola dokumenata

Svrha kontrole dokumenata je osigurati da se

samo trenutno odobreni dokumenti ili njihove verzije koriste. Sistem za kontrolu dokumentacije sadrži detalje o tome kakosu ključni dokumenti koncipirani, generisani, implementirani, distribuirani, pregledani, i skladišteni. Zamena i uklanjanje zastarelih dokumenata, uključujući etikete, takođe spada u kontrolu dokumenata. Odgovornost za kontrolu dokumenata se nalazi kod menadžera kvaliteta. Svi dokumenti bi trebali biti odobreni od strane odgovarajućih direktora, autora, recenzenta.

Praćenje proizvoda i sledivost

Jedan od najvažnijih procesa transplantacionog programa je osigurati sigurno praćenje puta matičnih ćelija od sakupljanja kod donora do infuzije kod pacijenta. Praćenje biološkog proizvoda treba dokumentovati i uključiti nekoliko procesa, uključujući:

- Pravilno obeležavanje kako bi se olakšalo praćenje donora / primaoca
- Upotreba jedinstvene identifikacije donora i ćelijskog proizvoda
- Prevoz u validiranom kontejneru za transport
- Vizuelni pregled kontejnera
- Zadržavanje evidencije o dokumentu koja validira poreklo i određište distribuiranog biološkog materijala (matične ćelije, limfociti donora).
- Prijem ćelija, uključujući verifikaciju pošiljke i stanje proizvoda pre prijema i tokom prevoza (kontrola broja ćelija, procenat vijabilnosti, makro-biološka sterilnost, temperatura tokom transporta).
- Pismene procedure i prateća dokumenta treba jasno definisati kako bi se osiguralo ko taj proizvod naručuje, označava, pakuje, isporučuje / rukovodi i administrira.

Revizije

Prema Američkom društvu za kvalitet (American Society of Quality), revizije su: "verifikacija aktivnosti na licu mesta, kao što je inspekcija ili ispitivanje, procesa ili sistema ..., kako bi se osigurala usaglađenost sa zahtevima. Revizija se može primeniti:

- na celu organizaciju
- ili možebiti specifična za funkciju, proces ili proizvodni korak" [9].

Revizija je dokumentovano, sistematsko vrednovanje QM aktivnosti u cilju provere i ispitivanja objektivnih dokaza, odnosno stepena usklađenosti s kvalitetom programa koji se razmatra.

1. Izbor kriterijuma revizije

U kontekstu revizije, potrebno je razmotriti razne oblasti, uključujući:

- (a) Tačnost podataka u obrascima prikupljanja podataka
- (b) Pregled donora, pismena saglasnost i testiranje
- (c) Provera hemoterapije i doze prema protokolima
- (d) Upravljanje ćelijskim proizvodima sa pozitivnim rezultatima mikrobiološke kulture
- (e) Rezultati usluga koje vrše spoljni objekti ili izvođači radova
- (f) Engraftment, morbiditet / mortalitet

2. Frekvencija revizije

Intervale revizije treba definisati, a izvršenje revizije pregledati i prijavljivati redovno, najmanje jednom godišnje.

3. Definisanje kriterijuma i postavljanje standard

Programske procedure uključuju merljive ishode, kao što su:

- (a) Ciljno vreme za dobijanje produkta

matičnih ćelija

- (b) Ciljni ćelijski prinos iz kolekcije matičnih ćelija periferne krvi ili koštane srži
- (c) Ciljno vreme za uzimanje na bazi odabira pacijenata, tipa transplantacije, režima kondicioniranja i infuzije određene doze matičnih ćelija

3. Merenje prema standardima

Procedura i evidencija se procenjuju da bi utvrdili da li Centar postiže ciljeve ili merljive rezultate.

4. Sažetak rezultata revizije sa ciljevima / merljivim rezultatima

Centar sumira rezultate revizije i identifikuje da li su ispunjeni ciljevi. Ako su primećeni netačni koraci ili oni koji nedostaju, oni su adresirani u akcionom planu. Rezultati revizije informišu program o eventualnim problemima, odstupanjima ili percepcijama servisa.

5. Formulisanje akcionih planova

Akциони planovi mogu biti razvijeni u različito vreme tokom procesa revizije.

Revizija u smislu poboljšanja

Proces revizije se ne završava sa završetkom, izveštavanjem i akcijom. Jednoplementirane, promene treba revidirati, jer program traži kontinuitet u procesu poboljšanja. Promene i modifikacije prakse treba razviti na kontrolisan način, pod nazivom kontrola promene, Ovu tezu objašnjava šematski ciklus PDCA (Plan-Do-Check-Act), što predstavlja osnovu sistema QMS-a u okviru ISO9001:2015.

Validacija i verifikacija

Validacija je potvrda ispitivanjem i pruža-

njem objektivnih dokazada se određeni zahtevi mogu dosledno ispuniti. Validirani proces pomaže da se osigura da biološki produkt ispunjava svoje unapred utvrđene specifikacije.

Verifikacija je potvrda da su ispunjeni navedeni zahtevikoristeći validiran proces ili postupak. Aktivnost verifikacije treba preduzeti u skladu sa procedurama koje su dogovorene od strane QM-a i odgovarajućeg osoblja koji preduzimaju sve korake validacije i prihvataju kriterijume za njenu primenu. Procedura validacije može obuhvatiti aspekte dizajna opreme, instalacije, početnog rada i performansiprocena u rutinskom okruženju. Izveštaj koji rezimira dobijene rezultate, daje i zaključak i treba da bude pregledan od strane tima za kontrolu kvaliteta, ili od strane medicinskog direktora (po potrebi), kao deoprocasa autorizacije, a pre same implementacije.

Istraživanje i izveštavanje o neusaglašenosti, neželjelim događajima, prigovorima i neželjenim reakcijama

Primeri neslaganja uključuju odstupanja od SOP-a, greške i nesreće. Trebalo bi da postoji SOP na mestu koji definiše kako organizacija upravljaneusaglašenostima i treba da postoji evidencija o svim neusa-glašenostima, detaljna dokumentacija istra-ge, korenska analiza i korektivno / preventi-vneakcije preduzete i dokumentovane.

Postoje procedure za identifikovanje odgovarajućih korektivnih i preventivnih aktivnosti, kao i za obaveštavanje relevantnih organa po potrebi. Prijavljivanje grešaka i incidenata nekaznenom kontekstu treba podsticati radi pomoći u postizanju poboljšanja u kliničkoj praksi. Ozbiljni neželjeni događaji i ozbiljne neželjene reakcije obavezno treba da budu prijavljene.

Žalbe

Sve žalbe treba dokumentovati, pažljivo istražiti i rešavati blagovremeno. U postupku žalbe treba uzeti u obzir žalbeod strane donora, osoblja, trećih zdravstvenih radnika i pacijenata. Potreban je mehanizam za kategorizaciju, praćenje i tretiranje žalbi. Kategorizacija i preispitivanje pritužbi treba-lo bi da dovedu do procene da li je žalba opravdana i da li je povezana sa potencijalnom neusklađenošću tokom revizije. U drugom slučaju, tužbu treba detaljno istražiti, uključujući analizu uzroka i identifikaciju korektivnih mera.

Povlačenje produkta

SOP za povlačenje materijala i proizvoda, koji uključuje korake za njegov povratak, ponovno izdavanje i obaveštavanje dobavljača i distributera ili registara, mora postojati. Za neke subjekte, opoziv proizvoda može biti retka pojava, dok za one koji distribuiraju proizvode, ovakve situacije mogu biti veće verovatnoće, ali plan za nepredviđene slučajeve treba da bude pripremljen bez obzira.

Standard ISO 13485

Standardi za infrastrukturu i opremu u jedinicama za aferezu i kriokonzervaciju matičnih ćelija

Iako je ISO 13485 [2]. samostalni standard, sličan je po obimui ciljevima standardu ISO 9001, koji reguliše sisteme upravljanja kvalitetom. Sadržidodatne zahteve specifične za organizacije uključene uživotni ciklus medicinskih uređaja. Kao svi ISO standardi sistema upravljanja, on je dizajniran da bude integrisanu postojeće sisteme upravljanja organizacije, a u okviru toga i svakog transplantacionog centra sa postojećom labora-

torijskom opremom.

Transplantacioni centar, naime pored tzv. "sterilnog bloka" tj. odeljenja gde se nalaze bolesnici u programu transplantacije u posebnim uslovima pozitivnog vazdušnog pritiska sa pridruženim HEPA filterima (prečišćavaju sterilni vazduh ubačen pod povišenim pritiskom), ima i ambulantu za sprovođenje standardizovane afereze matičnih ćelija i ostalih terapijskih procedura. Takođe, kao poseban deo u okviru Centra nalazi se laboratorija za kriokonzervaciju matičnih ćelija, sa sledećim medicinskim uređajima: zamrzivačima na -140°C do -196°C , aparatom za programirano zamrzavanje matičnih ćelija, laminarnom komorom klase A ili B za manipulaciju sa matičnim ćelijama u toku njihove pripreme za programiranu kriokonzervaciju. U okviru laboratorije za kriokonzervaciju, nalaze se rashladni klima uređaji sa posebnim filterima za prečišćavanje vazduha, koji omogućavaju određen stepen sterilnosti prostorije koja je neophodna pri manipulaciji sa biološkim produktima.

Obzirom na visokospecijalizovanu opremu, kao i prostor sa posebnim režimom funkcionisanja, potrebno je kontinuirano nadgledanje svih performansi ovakvog sistema, uz validaciju, nadzor, servisiranje i podnošenje izveštaja nadležnim telima koji vrše superviziju rada, kao što je Uprava za biomedicinu Ministarstva zdravlja Republike Srbije.

Standard ISO 13485, takođe odražava povećane regulatorne zahteve za transplantacioni centar preko snabdevanja medicinskih uređaja, na sledeći način:

Fokusiranje na odgovarajućoj infrastrukturi, posebno za proizvodnju sterilnog medicinskog materijala, uz dodatne zahteve za njihovu validaciju

1. Povećano usklađivanje sa regulatornim zahtevima, sa posebnim osvrtnom na dokumentaciju

2. Više fokusiranja na post-marketingne aktivnosti, uključujući postupanje sa žalbama i regulatorno izveštavanje

- Dizajn i razvoj ili popravak i održavanje medicinskih uređaja
- Snabdevanje sirovina, komponenti ili podsklopova
- Izvođenje usluga kao što je izrada ugovora, sterilizacija, logistika ili kalibracija merne opreme
- Uvoz i distribucija medicinskih uređaja
- Dodatni zahtevi u projektovanju i razvoju medicinskih uređaja, uzimajući u obzir njihovu upotrebljivost, korišćenje standarda i planiranje vezano za verifikaciju, validaciju, prenos i evidenciju održavanja dizajna i razvojne aktivnosti

3. Usklađivanje zahteva za validaciju sa različitim softverskim aplikacijama, kao što je QMS softver, softver za kontrolu procesa, softver za praćenje merenja.

Standard ISO 15189:2003

Sistem standarda za medicinske laboratorije

ISO 15189[3], međunarodni standard za akreditaciju medicinskih laboratorija postaje široko prihvaćen kao optimalni pristup osiguranju kvaliteta u medicinskom testiranju [16].

Akreditacija definisana od strane ISO jeste "Postupak kojim autoritetno telo daje zvanično priznanje da je neko telo ili osoba nadležna za obavljanje određenih zadataka". Iako akreditacija takođe uzima u obzir sistem upravljanja kvalitetom, ona ima dodatne formalne zahteve tehničke nadležnosti, uključujući početnu i kontinuiranu obuku osoblja, validaciju metoda i instrumenata, kao i unutrašnju i eksternu kontrolu kvaliteta.

Dobar QMS u laboratoriji ima puno

prednosti, a to su povećana transparentnost, sledivost, ujednačenost, zadovoljstvo radom i fokusiranje na kritične probleme.

Svi suštinski elementi QS-a pokriveni su standardom ISO 15189 za akreditaciju u dva različita dela, a to su: zahtevi za upravljanje i tehnički zahtevi. Tehnički elementi obuhvataju; kadrove i obuku, smeštaj, opremu, validaciju i obezbeđivanje kvaliteta ispitivanih procedura putem internog nadzora kvaliteta (IQC), eksternog nadzora kvaliteta (EQA), održavanje i kalibraciju.

Dijagnostička validacija je formalni zahtev standarda za akreditaciju, uključujući ISO 17025 i ISO 15189, a ti testovi / metode i instrumenti moraju biti validirani pre dijagnostike kako bi se osigurali pouzdani rezultati za pacijente, kliničare ili referentne laboratorije, i njihov kvalitet se mora se održavati tokom upotrebe [3-5].

Opšti metodi vrednovanja analitičkih metoda uključuju sledeće:

- Definicija protokola koji registruju rezultate merenja
- Utvrđivanje raspona primene i mehanizama razblaženja
- Identifikacija komponenata preciznosti u toku svakog dana
- Određivanje osetljivosti metode
- Procena granice detekcije i kvantifikacije
- Proučavanje specifičnosti metode
- Uspostavljanje referentnog opsega
- Dokumentovanje validnosti metode

Proces validacije, kao i bilo koji drugi, zahteva seriju planiranja, izvršenja i kontrole.

a. Planiranje:

- Definicija odgovorna za obavljanje procesa validacije

- Definisanje ciljeva i internih zahteva (svrha, parametri koji se mere u matrici ili matricama koje treba odrediti)
- Definicija i dokumentovanje metode (postupak validacije)

b. Implementacija

- implementacija aktivnosti, dobijeni i evidentirani rezultati (datum, operateri i rezultati).

c. Kontrola:

- Verifikacija usaglašenosti sa ciljevima
- Završna deklaracija o podobnosti definisane procedure

Zbog potrebe da se izvrši akreditacija transplantacionog centra koji u okviru svoje funkcionalne organizacione celine sadrži laboratoriju za aferezu i kriokonzervaciju matičnih ćelija, potrebno je imati dokumentovane procedure za validaciju metoda izvođenja procedura rada.

Standard ISO/IEC 17025:2006/2017

Standard za testiranje i kalibraciju laboratorijske opreme

ISO/IEC 17025:2006 [4,5], kao međunarodni standard utvrđuje opšte zahteve za obavljanje ispitivanja i/ili etaloniranja, uključujući uzorkovanje. On obuhvata ispitivanje i etaloniranje korišćenjem standardnih metoda, nestandardnih metoda i metoda razvijenih u laboratorijama. Ovaj međunarodni standard primenjiv je na sve organizacije koje obavljaju ispitivanje i/ili etaloniranje.

ISO/IEC 17025:2017 [4,5], utvrđuje opšte zahteve za kompetentnost, nepristrasnost i konzistentnost u radu laboratorija, na način definisan u ovom standardu. Ovaj međunarodni standard je primenjiv na sve organizacije koje obavljaju laboratorijske aktivnosti, bez obzira na broj osoblja u laboratoriji. Njega takođe mogu da koriste korisnici laboratorijskih usluga, zakonodavni organi, organizacije i šeme koje se koriste za kolegijsko ocenjivanje, akreditaciona tela i

ostali, a prilikom usaglašavanja ili priznavanja kompetentnosti laboratorije.

Iz ISO/IEC 17025:2006, proizilazi sledeće:

- Laboratorijske aktivnosti mogu da obuhvataju etaloniranje, ispitivanje i uzorkovanje, povezano sa naknadnim etaloniranjem ili ispitivanjem
- Stavljanje akcenta na nepristrasnost umesto na nezavisnost
- Orijentisanost na procesni pristup
- Stavljanje akcenta na rezultate procesa, umesto na detaljan opis zadataka i koraka
- Smanjivanje obima potrebne dokumentacije
- Uvođenje rizika i prilika, kao novih zahteva
- Isticanje mogućnosti podugovaranja
- Uvođenje aspekta informacionih tehnologija u domenu rizika, integriteta podataka, validacije softvera, elektronske dokumentacije
- Uvođenje novog termina „metrološka sledljivost”
- Omogućavanje laboratorije da izdaje izjavu o usaglašenosti sa aspekta: zadovoljava/ne zadovoljava

Obzirom na ultimativno visoke standarde koji su specifičnost radnog procesa transplantacionog tima, upravljanje kvalitetom postalo je neophodan alat u upravljanju kompleksnom medicinskom intervencijom, kao što je transplantacija matičnih ćelija. Ono omogućava timu za transplantaciju da prati svoje aktivnosti i identifikuje oblasti za poboljšanje, da omogućava komunikaciju, kako unutar tima, tako i sa eksternim pružiocima usluga.

Menadžment kvalitetom pomaže u predviđanju i odgovoru na neželjene događaje i poboljšanje procesa izbegavanja ponovljene greške. Novi ili nedavnouspostavljeni programi snažno se podstiču da uključe QM u svoje planoverane faze, u pogledu najefikasnije upotrebe resursa sa fokusom na sigurnost donora i pacijenta [17].

Uspostavljanje SOP-a u funkcionisanju transplantacijskog tima, tekoće mora da se bazira na konceptu QM-a, za svaki transplantacioni centar koji potencijalno želi da se uključi u program akreditacije koju diktira JACIE [17].

Literatura

1. ISO9001:2015 Quality management systems – Requirements
2. ISO 13485:2016-Medical devices- QMS. <https://www.iso.org/standard/59752.html>
3. ISO 15189:2007. Medical laboratories-Particular requirements for quality and competence.
4. ISO/IEC 17025:2017. Best ISO17025 quality manual. www.globalmanagergroup.com
5. ISO: General requirements for the competence of testing and calibration laboratories. ISO/IEC 17025:2005.
6. www.iso.org
7. <https://www.bulsuk.com/2009/02/taking-first-step-with-pdca.html>
8. AABB. Standards for cellular therapy services. 7th ed. Bethesda: AABB; 2015. Definition of the American Society for Quality <http://asq.org/learn-about-quality/quality-managementsystem/>.
9. FACT-JACIE International Standards for Hematopoietic Cellular Therapy Product Collection, Processing, and Administration Accreditation Manual. 6th ed. Version 6.1. 2017. Definition of the American Society of Quality <http://asq.org/learn-about-quality/auditing/>. 07 Jul 2018.
10. NetCord & FACT. NetCord-FACT International Standards For Cord Blood Collection, Banking, and Release For Administration. 6th ed. 2016. p. 1–183.
11. Keitel S. Guide to the quality and safety of tissues and cells for human application. Strasbourg: European Directorate for the Quality of Medicines & HealthCare (EDQM); 2015.
12. McGrath E and Loper K. Quality Management. In. Establishing a Hematopoietic Stem Cell Transplantation Unit. edited by Gluckman E, Niederwieser D, Aljur M. Springer, 2018. ISBN 978-3-319-59358-6 (eBook).

13. Cardwell L, Sugrue MW. Quality and process control. In: Areman EM, Loper K, editors. Cellular therapy: principles, methods, and regulations. 2nd ed. Bethesda: AABB; 2016. p. 897.
14. Gratwohl A, Brand R, McGrath E et al. Joint Accreditation Committee (JACIE) of the International Society for Cellular Therapy and the European Group for Blood and Marrow Transplantation, and the European Leukaemia Net. Use of the quality management system "JACIE" and outcome after hematopoietic stem cell transplantation. *Haematologica*. 2014;99(5):908–15.
15. www.ahcta.org.
16. Alvarez SI and Bernabeu Andreu FA. Procedures for Validation of Diagnostic Methods in Clinical Laboratory Accredited by ISO 15189. In *Modern Approaches To Quality Control*. Source InTech- 2011; 209-28.DOI:10.5772/19762.
17. Todorović Balint M. Edukativne potrebe zaposlenih u kontekstu implementacije ISO standarda u Centru za transplantaciju matičnih ćelija. Master rad iz menadžmenta u sistemu zdravstvene zaštite. Univerzitet u Beogradu Fakultet organizacionih nauka i Medicinski fakultet, Beograd, 2018.

Corresponding author: Prof. dr Milena Todorović Balint, MD, PhD
Clinic for Hematology, Faculty of Medicine, University of Belgrade,
Koste Todorovica 2,
11000 Serbia,
Tel/Fax: +381 (11) 306-5112,
E-mail: bb.lena@gmail.com



HEMOTERAPIJA: AUTENTIČNI PRISTUPI – KONCENTROVANI ERITROCITI, TROMBOCITI, KRIOPRECIPITAT, FIBRINSKI LEPAK I SELEKTIVNA AFEREZA

Bela Balint^{1,2,3}, Milena Todorović⁴, Snežana Janković¹, Dragica Samardžić¹,
Tamara Devrnja¹, Jelena Žunić¹, Dušan Vučetić⁵, Gordana Ostojić⁵, Marika Ljubenov⁶,
Mirjana Pavlović⁷

¹ Institut za kardiovaskularne bolesti "Dedinje", Beograd;

² Institut za medicinska istraživanja, Univerzitet u Beogradu;

³ Srpska akademija nauka i umetnosti;

⁴ Klinika za hematologiju KCS, Beograd;

⁵ Institut za transfuziologiju i hemobiologiju VMA, Beograd;

⁶ GAK "Narodni Front", Beograd;

⁷ Department of Computer and Electrical Engineering and Computer Science, FAU, USA.

Ključne reči: Eritrociti, Trombociti, Krioprecipitat, Fibrinski Lepak, Selektivne Afereze

Sažetak

Od kada su transfuzije eritrocita uvedene u lečenje bolesnika sa anemijom, jedan od najvažnijih ciljeva jeste definisanje kriterijuma za njihovu terapijsku primenu. Uz postizanje terapijskog efekta, treba obezbediti maksimalni stepen sigurnosti transfuzija. Zato je tokom proteklih decenija jedno od ključnih pitanja bilo određivanje kritičnog "praga" za uvođenje transfuzija.

Spomenuti "prag" nije isti za bolesnike sa "akutnom" ili "hroničnom", kao ni sa normovolemijskom ili hipovolemijskom anemijom. Uglavnom se uzimaju u obzir vrednost hematokrita (Hct) i koncentraciju hemoglobina (Hb) u perifernoj krvi, kao merilo prilikom donošenja odluke o transfuziji. Ukoliko se "prag" za terapijsku primenu eritrocita determiniše na osnovu Hct i Hb, pretpostavlja se da je reč o normovolemijskoj anemiji. Pri tome, dugo važeći kriterijumi ($Hct \geq 0,30$ i $Hb \geq 100$ g/L) za transfuziju eritrocita, poslednjih decenija često podležu revizijama zbog moguće imunomodulacije (aloantigenima) ili prenosa uzročnika infektivnih bolesti. Zato su bitno pooštreni kriterijumi za primenu eritrocita, ali i drugih alogenih hemoprodukata.

Spontana krvarenja su relativno retka kod bolesnika sa brojem trombocita iznad 20×10^9 /L periferne krvi. Međutim, neki bolesnici ne krvare ni sa trombocitama 5×10^9 /L u cirkulaciji. To govori u prilog tzv. "individualnog trombocitopenijskog praga", kritičnog za nastanak krvarenja. Terapijska primena koncentrovanih trombocita omogućila je primenu tzv. visokodozne citostatske terapije. Pored toga, korisne su i u zbrinjavanju drugih trombocitopenijskih ili trombocitastenijskih (urođeni ili artefijalni deficit njihove funkcije – na primer, primena antiagregacijskih lekova) stanja. Važno je istaći da broj transfuzija koncentrovanih trombocita je u SAD tokom poslednje dve do tri decenije udvostručen, dok je u istom vremenskom periodu broj transfuzija eritrocita povećan za svega oko 20%. Krioprecipitat je koncentrat plazmatskih proteina velike molekulske mase koji se talože na niskim temperaturama (krioprecipitacija) i među kojima se naalaze FVIII, vWF, fibrinogen, činilac

XIII i fibronektin. Fibrinski lepak je dvokomponentni biološki sistem, namenjen postizanju lokalnog hemostaznog, adhezivnog i "zaptivnog" efekta, a može služiti i kao "matrix" za lokalnu primenu nekih aktivnih supstanci (na primer, faktora rasta fibroblasta, antibiotika i drugo).

U ovom revijalnom radu biće opisani aktuelni pristupi i kriterijumi za izvođenje hemoterapije u tretmanu bolesnika sa anemijom, principi terapijske upotrebe koncentrovanih eritrocita, trombocita, krioprecipitata i fibrinskog lepka – uz kratak osvrt i ilustraciju sopstvenih rezultata, uključujući i neke procedure selektivne izmene plazme.

Kratak istorijat i osnovni principi hemoterapije

Ideja o mogućnosti prenošenja krvi iz krvnog suda jedne životinje ili osobe u krvni sud druge, datira iz šesnaestog veka – iako je bilo i ranije pokušaja za postizanje povoljnog "terapijskog" efekta (npr. podmlađivanje) različitim postupcima. Koncept transfuzije krvi nije mogao biti razvijen pre nego što je

Harvey (1578–1657) dao detaljan opis krvotoka čoveka. Zasluga za prvu uspešno obavljenju transfuziju od jedne životinje drugoj pripisuje se Lower (1631–1691). Nakon eksperimenata na životinjama, pokušavano je sa primenom krvi i kod ljudi. Tako je Denis 1667. godine obavio prvu dokumentovanu (istina terapijski neuspešnu) transfuziju životinjske krvi jednoj osobi (1–3).



Slika 1. Transfuzija animalne krvi – shematski istorijski prikaz

Zbog neuspeha, transfuzije su obavljane vrlo retko sve do epohalnog otkrića nobelovca Landsteiner (1868–1943). On je ispitivao interakciju eritrocita i seruma različitih osoba i nastale reakcije objasnio postojanjem tri krvne grupe koje je označavao simbolima A, B, O. Sledećih godina, njegovi saradnici Decastello (1872–1960) i Sturli (1873–1966) saopštili su otkriće i četvrte krvne grupe – AB. Rous i saradnici su 1916. godine opisali novi metod konzervacije eritrocita u in vitro uslovima pomoću rastvora citrata i dekstroze. Nekoliko godina kasnije Robertson na zapadnom frontu u Prvom svetskom ratu u okviru vojne bolnice formirao je prvu “banku skladištene krvi”. Za ime istog čoveka je vezano konstruisanje i prvog seta za uzimanje, čuvanje (staklene boce čuvane na ledu) i transfundovanje krvi (3–9).

Već je rečeno da prikupljanje, čuvanje i terapijska upotreba cele krvi bila je karakteristika ranog perioda transfuzijske ere. Tokom šezdesetih godina, naponi su bili usmereni ka prikupljanju dovoljnih količina plazme za pripremanje rastvora humanog albumina – pri čemu su neke transfuziološke ustanove “žrtvovala” (odbacile), a druge “spasile” (sačuvale) koncentrovane eritrocite za terapijsku upotrebu. Na taj način, “spašeni” eritrociti su u proteklom periodu postepeno zamenili celu krv u lečenju bolesnika sa anemijom. Danas u većini zemalja primenjuje se usmerena hemoterapija, a da bi potrebe u eritrocitima za transfuziju bile zadovoljene, godišnje je potrebno prikupiti 40–50 “standardnih” jedinica cele krvi na 1 000 stanovnika (3, 8, 9).

Sredinom šezdesetih godina započeto je sa pripremanjem i krioprecipitata – prvenstveno za nadoknadu FVIII:C, vWF i fibrinogena. Tada istraživanja su bila usmerena u pravcu usavršavanja separatora krvnih ćelija radi prikupljanja dovoljnih količina plazme za frakcionisanje. Hemoprodukti koji sadrže činioce ili faktore koagulacije (na primer, FVIII i FIX) u koncentrovanom obliku su se najpre dobijali prečišćavanjem iz plazme (plazmatski

derivati). Krajem osamdesetih godina, uvođenjem rekombinantne biotehnologije, započeto je sa sintezom rekombinantnih preparata (rHuFVIII i rHuFIX). Mogućnost primene ovih preparata (prečišćenih i/ili rekombinantnih) i u vanbolničkim uslovima, uz stabilnost preparata (bezbedno čuvanje na temperaturama 4 ± 2 °C i/ili 20 ± 2 °C) dali su im veliku prednost i popularnost (3, 8).

Profilaksa i lečenje patoloških stanja usled hemostaznih poremećaja je efikasna, zahvaljujući boljem poznavanju svojstava krvi i osvojenim metodama pripremanja hemoprodukta u koncentrovanom obliku. Suština te terapije jeste nadoknadna terapija. Pri tome, najpre je potrebno utvrditi deficitarni krvni sastojak, a potom kvantifikovati stepen smanjenja aktivnosti jer od toga zavisi izbor i doziranje hemoprodukata i trajanje lečenja. Terapiju treba započeti što ranije radi svođenja neželjenih sekvela na minimum. U ovom radu neće biti reči o detaljima hemoterapije davanjem pojedinačnih hemostatskih preparata, niti kompleksa koagulacijskih činilaca. Iz oblasti hemoterapije hemostaze, biće dat kratak prikaz pripremanja i terapijske upotrebe krioprecipitata i fibrinskog lepka (9).

Tokom prošlog veka uvedene su nove procedure transfuzijskog lečenja – kao što su terapijske i donorske afereze i transplantacija kostne srži (odnosno matičnih ćelija), uz brojne druge imuno- i hemomodulacijske postupke. O izdvajanju plazme iz eksfundovane krvi životinja, sa sledstvenom reinfuzijom krvnih ćelija prvi put je saopštavano 1914. godine, a postupak je nazvan plazmaferezom. Povoljan učinak terapijske izmene plazme (TIP) u lečenju bolesnika sa makroglobulinemijskim hiperviskoznim sindromom opisan je 1960. godine (9). Potom, izveštavano je o citaferezama kod bolesnika sa leukemijom. Uvođenje separatora krvnih ćelija, namenjenih prvenstveno prikupljanju krvnih ćelija, datira iz sedamdesetih godina prošlog veka. Počev od sredine sedamdesetih godina, separatorima se izvode i TIP, najpre u

tretmanu bolesnika sa Goodpasture-ovim sindromom, odnosno mijastenijom gravis. Uvođenjem granulocitnog faktora rasta hematopoeze (rHuG-CSF), stvoreni su uslovi za prikupljanje matičnih ćelija iz periferne krvi posle njihove mobilizacije. Tokom poslednjih decenija, uvedene i usavršene su terapijske procedure selektivnog (adsorpcijskog) otklanjanja specifičnog patogena iz bolesnikove

plazme (3, 8).

U ovom radu neće biti opisane konvencionalne terapijske afereze. Biće ukratko prikazani neki postupci selektivne TIP, kao što su, ekstrakorporalna imunoadsorpcija (ECIA) i afinitetna hromatografija za selektivno otklanjanje aloantitela ABO ili vezivanje ekscesnih količina bilirubina i drugih metabolita iz plazme.

*

*

*

Cilj hemoterapije je ponovno uspostavljanje hemobiološke homeostaze – nadoknadom deficitarnih hemoprodukata (sastojci krvi, derivati plazme ili njihovi zamenici, odnosno rekombinantni analozi), terapijskim aferezama, transplantacijom i/ili implantacijom matičnih i drugih imunokompetentnih ćelija – i njeno održavanje. To se postiže posredstvom rekonstitucije hemodinamskih i hemoreoloških, oksiformne, hemostazne, imunskih i drugih funkcija krvi, uz bolje funkcionisanje i plazmatskih sistema – uključujući i kompleksnu citokinsku mrežu. To znači da pored unošenja deficitarnih sastojaka krvi, transfuziološko lečenje podrazumeva i otklanjanje patološki izmenjenih krvnih ćelija, plazme ili njenih konstituenata aferezom. Postoji mogućnost i za izvođenje složenih postupaka *ex vivo* modulacije funkcija eksfundovanih sastojaka (prvenstveno, leukocita) krvi, uz njihovu naknadnu (re)infuziju bolesniku (1–4, 9).

Pored cele krvi – čije su indikacije danas veoma retke, ograničene su uglavnom za terapiju bolesnika sa (akutnim) masivnim gubitkom krvi ili na primenu kod eksangvinotransfuzije – za terapiju bolesnika sa anemijskim sindromom danas stoje na raspolaganju različiti koncentrovani eritrociti. Od njih, najčešće se koriste tzv. resuspendovani eritrociti, zatim filtrirani i isprani eritrociti. Kriokonzervisani i aferezom prukupljeni eritrociti se praktično ne (ili veoma retko) primenjuju u radu.

Hemoterapija bolesnika sa anemijom

Sa aspekta hemoterapije, anemiju je moguće definisati kao patološko stanje sa smanjenom ukupnom zapreminom (masom) eritrocita u cirkulaciji u kome su transfuzije eritrocita korisne ili neophodne. Poslednjih nekoliko decenija, kada je reč o "transfuziji krvi", uglavnom se misli na terapijsku primenu eritrocita – koja, po potrebi, može biti dopunjena upotrebom i drugih hemoprodukata. Većina autora uzima u obzir vrednost hematokrita (hematocrit – Hct) i koncentraciju hemoglobina (hemoglobin – Hb) u perifernoj krvi, kao glavno ili jedino merilo prilikom donošenja odluke o transfuziji. Ukoliko se "prag" za terapijsku primenu eritrocita predominantno determiniše na osnovu Hct i Hb – pretpostavlja se da je reč o normovolemijskoj anemiji (3, 8–10).

Dugo važeći parametri ili kriterijumi ($Hct \geq 0,30$ i $Hb \geq 100$ g/L) za transfuziju, poslednjih decenija često podležu revizijama zbog potencijalne imunomodulacije (posredstvom aloantigena) ili prenosa uzročnika infektivnih bolesti, kao što su virus humane imunodeficijencije (HIV) i/ili hepatitisa tipa C (HCV). Zato su u mnogim zemljama bitno pooštreni kriterijumi za primenu alogeničkih ćelijskih hemoprodukata (3, 5–11).

Za determinisanje nekog kritičnog "praga" za uvođenje transfuzija eritrocita moguće je

krostititi vrednosti "optimalnih" i "minimalnih" vrednosti Hct i Hb. Nekada se smatralo da su one jedno isto, ali sada se zna da je reč o različitim pojmovima, kriterijumima. Tako, na primer, "minimalna" koncentracija Hb za održavanje organa u vitalnom stanju iznosi svega 30 g/L. Obrnuto, još je pre oko šest decenija određena koncentracija Hb od 100 g/L kao najniža "optimalna". Određivanje nekog univerzalnog "praga" za transfuziju je od velikog značaja – da transfuzije ne bi bile primenjivane kada nisu indikovane, odnosno radi njihovog pravovremenog izvođenja kada je to potrebno. Pri tome, treba balansirati između potencijalnih komplikacija nedovoljne koncentracije Hb i rizika od sporednih efekata transfuzije (9, 11–16).

Međutim, nije realno pridržavati se jedino nekog laboratorijskog parametra, "praga" (Hct i Hb) za uvođenje transfuzija eritrocita. Ipak, bolesnicima sa normovolemijskom anemijom čiji je $Hct \leq 0,21$ odnosno $Hb \leq 70$ g/L, treba transfundovati eritrocite. Postoje perioperacijska stanja sa još strožijim kriterijumima za uvođenje transfuzija. Tako, po nekima transfuzije su indikovane kada su vrednosti Hb ≤ 60 g/L, naročito kod hemodinamski stabilnih bolesnika. Kada je Hb između 60 i 100 g/L, intenzitet simptoma neadekvatne oksigenacije (na primer, tahikardija, hipotenzija) su presudni za donošenje odluke o transfundovanju. Ima bolesnika i sa normovolemijskom anemijom kojima je pogodniji $Hct \geq 0,24$ i koncentracija Hb ≥ 80 g/L. To se odnosi i na starije bolesnike, za koje (zavisno i od drugih parametara, na primer, opšteg stanja bolesnika) vrednosti treba da su još veće, $Hct \geq 0,30$ a koncentracija Hb ≥ 100 g/L (2–5, 15–19).

Opšte je poznato da akutni gubitak krvi izaziva istovremeno aktivisanje i delovanje više kompenzatornih mehanizama u cilju uspostavljanja što bolje tkivne perfuzije vitalnih organa (mozak, miokard i bubrezi). Zbog toga, odrasle osobe mogu dobro podneti gubitak oko jedne petine cirkulišuće krvi – što za osobu

prosečne telesne mase iznosi oko jedan litar krvi. Veći gubitak (20–30%) cirkulišuće krvi zahteva nadoknadu volumena kristaloidnim i/ili koloidnim infuzijskim rastvorima. Pri gubitku više od oko jedne trećine krvi, potrebno je poboljšati njenu oksiformnu funkciju transfuzijom eritrocita. Najzad, kada je reč o masivnom gubitku krvi – 50% ili više cirkulišuće krvi unutar tri sata ili gubitak količine koja je jednaka volumenu cirkulišuće krvi tokom 24 sata – pored eritrocita, potrebno je transfundovati i trombocite, uz nadoknadu činilaca koagulacije (3–7, 9).

Opšte načelo je da će jedna jedinica koncentrovanih eritrocita – data prosečnoj odrasloj osobi sa normovolemijskom anemijom – dovesti do porasta Hct za oko 0,03 i povećanja koncentracije Hb za oko 10 g/L – što po nekim autorima dolazi do izražaja oko 24 sata po transfuziji. Svakako od značaja je i procenatna zastupljenost mlađih (uključujući i neocite) i starijih eritrocita u hemoproduktu, kao i trajanje i uslovi njegovog skladištenja pre terapijske primene (3, 5–9, 20–23). Međutim, ima podataka da je ove promene hemograma (promene u krvnoj slici) moguće uočiti i mnogo ranije, već 30 do 120 minuta po završenoj transfuziji – u zavisnosti, među ostalima, od ravnoteže i raspodele ekstravaskulne i intravaskulne tečnosti u organizmu (3, 8, 9).

Deplazmatisana krv

Deplazmatisana krv je decenijama bila prihvaćena kao standardni hemoprodukat za poboljšanje oksiformnog kapaciteta krvi. Ona se pripremala otklanjanjem oko 70% zapremine plazme iz jedinica cele krvi. Rok terapijske upotrebljivosti jedinica deplazmatisane krvi je bio identičan onome koji je važio

za celu krv iz koje je ona pripremljena. To za krv uzetu sa antikoagulantsko-konzervišućim rastvorom ACD (Acid-Citrate-Dextrose) izno-

sio 21 dana, sa CPD (Citrate-Phosphate-Dextrose) i sa CPDA-1 (Citrate-Phosphate-Dextrose-Adenine) 35 dana. Posle transfuzije ovog hemoprodukta, očekuje se normalno preživljavanje oko 75% eritrocita u cirkulaciji primaoca (3–9). U jedinici deplazmatisane krvi $Hct \leq 0,80$ radi održavanja barem minimalnog metabolizma eritrocita u *ex vivo* uslovima. U doba, kada je bio hemoprodukat izbora, zbog znatno manjeg volumena (uz isti broj eritrocita), deplazmatisana krv bila je posebno pogodna za lečenje starijih osoba sa arterijskom hipertenzijom, odnosno kardiopulmonarnom insuficijencijom (2–5, 20–23).

Resuspendovani koncentrovani eritrociti

Otklanjanjem sloja "buffy coat" (deo bogat u leukocitima i trombocitima) posle centrifugiranja jedinica cele krvi otklonja se najveći deo plazme i oko 70–80% leukocita (proces je označen kao leukoredukcija – a hemoprodukat eritrociti osiromašivani u leukocitima); ukoliko se dodaje i neki aditivni rastvor (Additive Solution ili AS) – reč je o relativno novom hemoproduktu, koji je nazvan "resuspendovanim eritrocitima" (3, 9). Iako je opisani metod otklanjanja "buffy coat" najmanje efikasan u pogledu redukcije broja leukocita, prednost mu je u tome što njegovo izvođenje ne zahteva korišćenje "otvorenog sistema" kesa za razliku od drugih procedura leukoredukcije i leukodeplecije.

Dodavanjem nekog AS stvaraju se bolji uslovi za skladištenje resuspendovanih eritrocita (izvor materija potrebnih za njihov metabolizam *ex vivo*), a takođe se stvaraju bolji preduslovi za naknadnu filtraciju eritrocita (tzv. leukodeplecija) usled smanjenja vrednosti Hct . Na kraju, ovom procedurom može biti sprečeno *in vitro* stvaranje klinički značajnih količina inflamacijskih citokina i drugih bioaktivnih medijatora u koncentrovanim eritrocitima – usled leukoredukcije (3–5).

Resuspendovanjem eritrocita, dozvoljeni rok terapijske upotrebljivosti biće produžen do 42

dana. Osnovno je pravilo da zapremina AS ne sme biti veća od volumena otklonjene plazme – po standardima većine zemalja, ona iznosi 100 mL – tako da finalni Hct resuspendovanih eritrocita iznosi oko 0,60. Kada je volumen uzete cele krvi manji (na primer, 400 mL u Japanu), tome treba da bude prilagođena i zapremina AS (92 mL). Po standardima Francuske, zapremina AS iznosi svega 80 mL, jer se želi postići veći finalni Hct (oko 0,70) resuspendovanih eritrocita (2–9, 20–23).

Najčešće je u upotrebi rastvor natrijumovog hlorida, adenina, dekstroze i manitola (SAGM), kao AS. Od drugih AS treba spomenuti (Adsol – AS-1; Nutricell – AS-3), zatim rastvor manitola, adenina i fosfata (MAP) i neke druge. Zajednička karakteristika ovih rastvora je da u svom sastavu, kao osnovnu supstancu, sadrže natrijum hlorid (ali u nejednakim koncentracijama), zatim adenin ili guanozin. Dok se SAGM i AS-1 uglavnom koriste u kombinaciji sa rastvorom CPD, dotle je AS-3 najčešće kombinovan sa CP2D (dvostruki sadržaj glukoze). U slučaju primene antikoagulantsko-konzervišućeg rastvora CP2D, on služi kao glavni izvor glukoze, a ne AS-3 (5–9). Erythro-Sol je novi AS koji u svom sastavu ne sadrži natrijum hlorid. Naime čine ga adenin, natrijum citrat, natrijum fosfat, manitol i glukoza. Erythro-Sol najčešće se koristi u kombinaciji sa antikoagulantsko-konzervišućim rastvorom 0.5CPD (manja količina citrata i limunske kiseline). Primena Erythro-Sol obezbeđuje bolju zaštitu koncentracije difosfoglicerata (2,3-DPG) u skladištenim eritrocitima, a time i duži rok njihove terapijske upotrebljivosti do 49 dana (3, 8, 9).

Filtrovani eritrociti

Pored željenog terapijskog delovanja, transfuzije alogene krvi/hemoprodukata izazivaju i brojne sporedne biološke efekte. U njih spadaju febrilna nehemolizna transfuzijska reakcija (FNHTR), zatim transfuzijom ud

ruženo akutno oštećenje pluća (Transfusion Related Acute Lung Injury – TRALI), imunska refraktornost na transfuzije trombocita, transfuzijom udružena bolest "kalem protiv domaćina" (Transfusion-Associated Graft versus Host Disease – TA-GvHD), kao i različiti

imunomodulacijski efekti. Ovi efekti su najčešće nepovoljni za primaoca usled imunosupresije (odložene infekcije, recidiv tumora). Posebnu potencijalnu komplikaciju transfuzija čini mogućnost transmisije uzročnika (HIV, HCV, HBV) infektivnih bolesti (3, 24–28).



Slika 2a–c. Filtrovani eritrociti – faze procesa fitrovanja ("post-storage"); finalni stepen leukodeplecije = 3–5 Log₁₀

Transfuzija filtrovanih eritrocita se preporučuje za lečenje bolesnika kod kojih se želi sprečiti pojava neželjenih bioloških efekata, a posebno za tretman onih koji su ranije ispoljavali FNHTR. Učestalost i težina kliničke slike navedenih nepovoljnih efekata su u direktnoj proporciji sa brojem i vijabilnošću transfundovanih leukocita – koji tokom skladištenja mogu biti zahvaćeni procesom apoptoze, odnosno koncentracijom *in vitro* stvorenih imunoregulacijskih i/ili inflamacijskih citokina, ali i drugih bioaktivnih supstanci. Primena filtrovanih eritrocita indikovana je i u lečenju bolesnika kojima se planira transplantacija matičnih ćelija hematopoeze ili kod kojih se predviđa duži period zbrinjavanja transfuzijama eritrocita (6–8).

Otklanjanjem sloja "buffy coat" se stvaraju bolji preduslovi za filtraciju eritrocita. Pored toga, ovom procedurom može biti sprečeno *in vitro* stvaranje klinički značajnih količina proinflamacijskih citokina i drugih bioaktivnih medijatora u jedinicama eritrocita. Pripremanjem i terapijskom upotrebom filtrovanih eritrocita postižu se: 1) maksimalna redukcija broja leukocita (leukodeplecija); 2) sprečavanje razvoja ili odlaganje aloimunizacije, imunosupresije udružene sa alogenim transfuzijama, TRALI, TA-GvHD, refraktornosti na transfuzije trombocita i 3) redukcija mogućnosti transmisije virusa (citomegalovirusa) (3, 8). Danas stoje na raspolaganju posebni filteri za otklanjanje leukocita. Njihovom upotrebom se postiže redukcija broja leukocita za oko 3–5

Log₁₀ ili više. Takav stepen leukodeplecije već može sprečiti ne samo ispoljavanje FNHTR, nego i nastanak većine imunski posredovanih nepovoljnih efekata alogenih transfuzija. Filteri za otklanjanje leukocita prve, odnosno druge "generacije" delovali su mehanički (veličina pora im je iznosila 170–260 μm, odnosno 20–50 μm) zadržavajući leukocite (3–8). Neki filteri druge, a posebno filteri treće "generacije" su znatno efikasniji u redukciji broja leukocita jer pored mehaničkog zadržavanja, deluju i "adsorbujuće" na leukocite. Upotrebom savremenih filtera (leukodeplecijom) moguće je sprečiti ili odložiti nastanak aloimunizacije, a ne samo ispoljavanje FNHTR. Važeći standardi Udruženja krvnih banaka SAD (AABB) i Saveta Evrope, kao što je navedeno, predviđaju da posle leukodeplecije u jednoj jedinici filtriranih eritrocita broj rezidualnih leukocita treba da bude $\leq 5 \times 10^6$. Kada je broj rezidualnih leukocita u hemoproduktu sveden na $\leq 5 \times 10^8$, omogućeno je sprečavanje manifestne FNHR. Međutim, za prevenciju same aloimunizacije taj broj treba da bude 5×10^6 ili manji. Prednost se daje što ranijem otklanjanju leukocita ("in-line" filteri) ili odmah posle prikupljanja i obrade krvi ("pre-storage" filtracija), nasuprot leukodeplekciji neposredno pre transfuzije ("post-storage" filtracija). Veoma je bitno da "in-line" filteri omogućavaju korišćenje "zatvorenog sistema" jer su integralni deo sistema kesa za prikupljanje i obradu (procesiranje) krvi (3, 4, 8).

Isprani (autologni) eritrociti

Metodom automatizovanog (upotreba procesora krvnih ćelija) ili ispiranjem eritrocita (pomoću centrifuga) biće odstranjena rezidualna plazma i njeni sastojci, kao što su imunoglobulini i ostali plazmatski proteini, kalijum, ali biće smanjen i sadržaj antikoagulantsko-konzervirajućeg rastvora. Ispiranje se danas ne smatra dovoljno efikasnom

metodom za redukciju broja leukocita u jedinicama eritrocita.

Jedinice ispranih alogenih eritrocita treba transfundovati onim bolesnicima koji ispoljavaju alergijske (ali uglavnom ne uključujući i anafilaktoidne) reakcije kao sporedne efekte na transfuzije cele krvi, resuspendovanih i filtriranih eritrocita (3–5, 8).

Upotreba ispranih eritrocita indikovana je u lečenju osoba sa deficitom IgA. Urođeni nedostatak IgA je češća pojava, njena incidenca iznosi jedan na 700 osoba, od kojih približno svaki treći stvara specifična antitela anti-IgA. Ona su najčešće imunska koja se sintetišu posle izlaganja bolesnika aloantigena (IgA), iako mogu biti retko i prirodna antitela (3).

Primena ispranih eritrocita u terapiji bolesnika u čijoj su cirkulaciji već prisutna antitela anti-IgA (koja bi dovela do pojave teške anafilaktoidne reakcije posle transfuzije hemoprodukta koji sadrže IgA) je imperativna – ali ne i uvek dovoljno efikasna. Naime, ima mišljenja da ispiranjem nije moguće dostići potreban stepen redukcije plazmatskih proteina, neophodan za sigurnu (u imunskom pogledu) hemoterapiju ovih bolesnika.

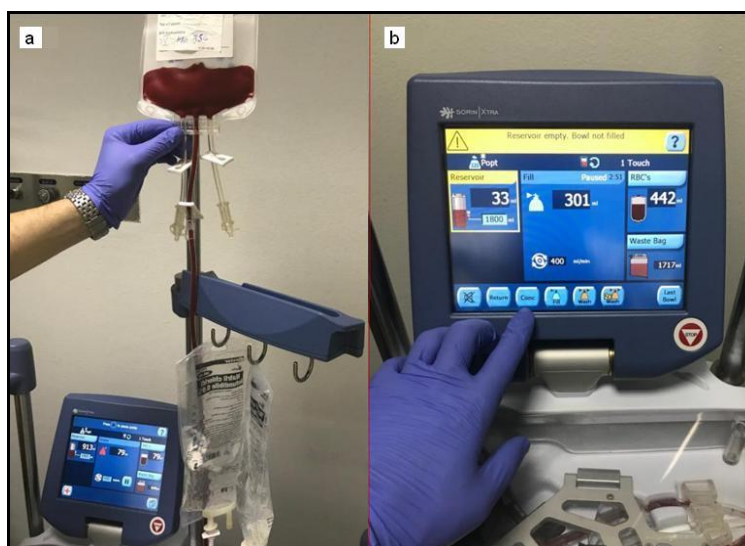
Celishodnije je pristupiti nekom drugom modalitetu lečenja, kao što su: 1) korišćenje hemoprodukta od alogenog davaoca sa deficitom IgA; 2) primena autologne transfuzije i 3) korišćenje alternative transfuzija – na primer, stimulacija pomoću rekombinantnog humanog eritropoetina (rHuEPO) (3, 8).

Zbog svega navedenih, kada je reč o ispiranim eritrocitima, danas u prvom redu radi o autolognim ćelijama, koje su prikupljene intraoperacijskim spašavanjem (videti Slike 3 i 4).

Ispiranjem se otklanjaju potencijalno prisutni fragmenati različitih tkiva – kao i brojni biološki aktivni medijatori, i/ili modulatori hemobiološkog odgovora, zatim enzimi aktivisanih neutrofilnih granulocita (elastaza) i oslobođeni sadržaj različitih granula trombocita (3–9)



Slika 3a–b. Procesiranje/ispiranje eritrocita primenom uređaja Cell Saver – transfer prikupljenog sadržaja u zvono aparata i pranje fiziološkim rastvorom NaCl



Slika 4a–b. Procesiranje/ispiranje eritrocita primenom uređaja Cell Saver – transfer ispiranih eritrocita u finalnu kesu za autolognu transfuziju i podešavanje zapremine

Na kraju, treba reći da postoje i drugi, ređe primenjeni koncentrovani eritrociti. To su eritrociti obogaćeni sa neocitima, eritrociti prikupljeni aferezom i kriokonzervisani eritrociti (dugovremensko čuvanje u zamrznutom stanju).

Neocitima obogaćeni eritrociti.

U mlađih bolesnika koji zahtevaju učestale transfuzije eritrocita tokom dužeg vremenskog

perioda često dolazi do preopterećenja gvožđem. Neociti su mladi eritrociti, izdvojeni posebnim postupcima iz jedinica cele krvi (pomoću diferencijalnog centrifugiranja) ili iz periferne cirkulacije namenskih davalaca procedurom "neocitafereze" (afereza eritrocita manje gustine) – upotrebom separatora krvnih ćelija.

Transfuzije neocita se primenjuju počev od sedamdesetih godina, kada je utvrđeno da je

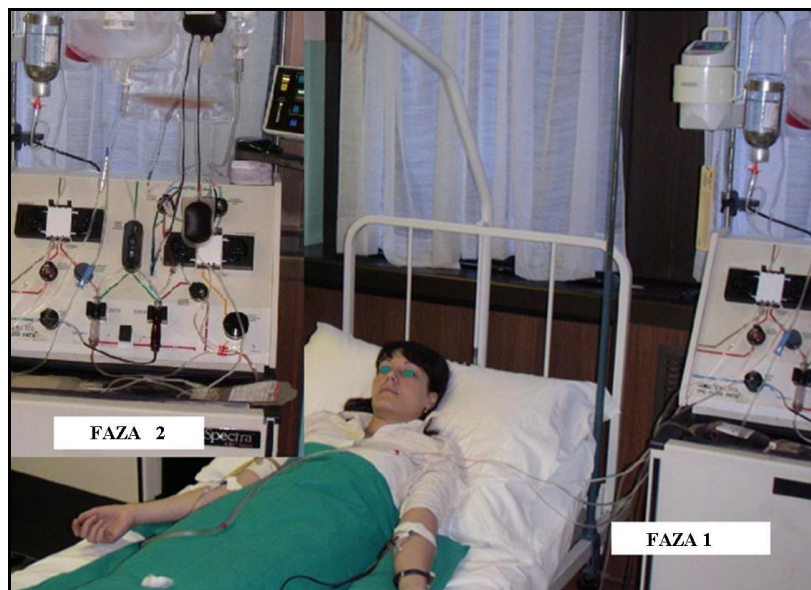
sadržaj gvožđa u njima manji, dok je koncentracija 2,3-DPG veća. Osim toga, oni duže preživljavaju posle transfuzije u odnosu na "stare" eritrocite, zbog čega transfuzije koncentrovanih eritrocita, obogaćenih neocitima, mogu značajno produžiti interval između transfuzija, te smanjiti broj potrebnih transfuzija u jedinici vremena (3).

Poludoba boravka (t50) transfundovanih eritrocita (izdvojeni iz jedinica konzervirane krvi) u cirkulaciji iznosi oko 28–30 dana, dok je t50 neocita 40–45 dana – zbog čega su manje i ređe bolesnikove potrebe za transfuzijama eritrocita. Transfuzije neocita su posebno korisne za obolele od talasemije i ređe vode do transfuzijom posredovane hemohromatoze (3–9).

Aferezom prikupljeni eritrociti.

Prikupljanje eritrocita afereznim postupkom je relativno novi postupak – prve donorske eritocitaferenze su izvedene pre tri decenije. Tako pripremani produkt ispunjava standarde AABB, Ureda za hranu i lekove (Food and Drug Administration – FDA) SAD i Saveta Evrope po morfološkim, biohemijskim i funkcionalnim karakteristikama eritrocita, ali i u pogledu broja rezidualnih leukocita prilikom upotrebe integralnog sistema za leukoredukciju tokom afereze (1–4, 8).

Izvođenjem multikomponentne donorske afereze (upotreba separatora krvnih ćelija) najčešće se kombinuju prikupljanje koncentrovanih trombocita i/ili plazme, a ponekad i eritrocita od istog donora (videti Sliku 5).



Slika 5. Multikomponentano aferežno prikupljanje hemoprodukata od jednog donora

Kriterijumi za odabir davalaca eritrocita aferezom nisu isti kao za davaoce cele krvi. Svakako, treba primenjivati opšte važeće zahteve za izbor davalaca krvi, ali i posebne kriterijume za izbor davalaca sastojaka krvi afereznim procedurama. Tako, davaoci od

kojih je predviđeno aferežno prikupljanje krvnih komponenti treba da ispunjavaju sledeće uslove: 1) opštevažeće zahteve za davaoce cele krvi; 2) da su stariji od 18 a mlađi od 65 godina; 3) da su klinički zdravi, tj. sa urednim fizikalnim i elektrokardiografskim nalazom, koncentracijom Hb ≥ 130 g/L i bro

jem trombocita najmanjim $150 \times 10^9/L$, odnosno leukocita ne manjim od $4 \times 10^9/L$ (sa normalnom leukocitarnom formulom) uz fiziološke vrednosti biohemizma krvi i koagulacijskih testova; 4) da imaju unapred utvrđene negativne rezultate testova na markere transmisivnih bolesti (3, 8, 9).

Jedna od pogodnosti multikomponentne afeze (pored imuskog benefita – jedan donor više hemoprodukata) je u tome što je njenom primenom izbegnut vremenski period od prikupljanja do procesiranja cele krvi, čime je omogućen bolji kvalitet hemoprodukata (5–10). Međutim, ovaj postupak ima i neka ograničenja. Naime, afereza je skup i relativno složen postupak – zahteva upotrebu posebne skupe aparature (separatora krvnih ćelija) i dobru edukovanost osoblja za izvođenje procedura sa vantelesnim krvotokom.

Kriokonzervisani eritrociti.

Za dugovremensko čuvanje eritrocita neophodno je njihovo skladištenje u zamrznutom stanju (kriokonzervacija). Za bolji oporavak odmrznutih ćelija neophodni su: 1) upotreba krioprotektora (glicerol); 2) korišćenje specifične kinetike hlađenja tokom zamrzavanja i 3) čuvanje jedinica na pogodno niskim temperaturama, radi sprečavanja daljih krioštećenja. Transfuzije kriokonzervisanih eritrocita nisu bile od kliničkog značaja sve do sedamdesetih godina, do uvođenja automatizovanih metoda otklanjanja (ispiranjem) rezidualnog glicerola, raspadnutih ćelija i slobodnog Hb iz suspenzije odmrznutih ćelija korišćenjem procesora krvnih ćelija transfuzije. Kriokonzervisani eritrociti su se pokazali korisnim u ratnim prilikama, pri elementarnim katastrofama, ali i kod zbrinjavanja bolesnika sa retkim eritrocitnim fenotipom (3–9).

Funkcija i terapijska upotreba trombocita

Za procese fiziološke hemostaze, uz dovoljan broj trombocita u cirkulaciji, neophodna je i

njihova funkcionalna očuvanost i sadejstvo ostalih hemostaznih činilaca. Najčešća oboljenja i patološka stanja, udružena sa poremećajima trombocita, su trombocitopenije zbog smanjene produkcije, povećane potrošnje i dilucije i trombocitastenije (poremećaj funkcije).

Aktivacija trombocita.

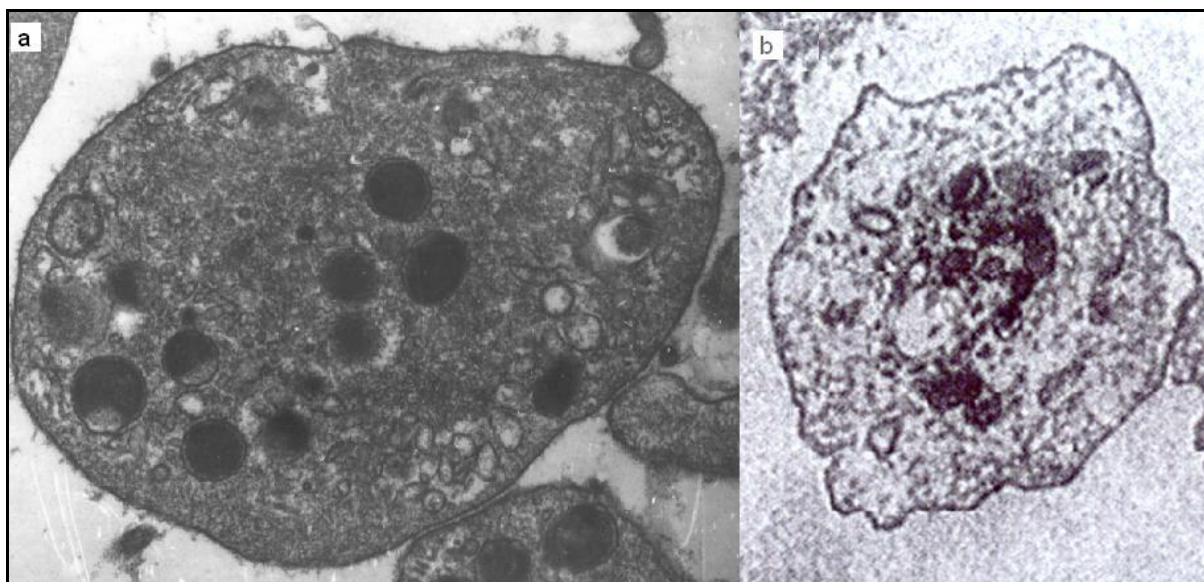
Interakcija trombocita sa subendoteljskim strukturama po pravilu vodi ka njihovoj aktivaciji, koja je funkcija: 1) delovanja aktivatora – agonista trombocita; 2) fizičkih činilaca unutar krvotoka; 3) određenih plazmatskih proteina i 4) ekspresija trombocitnih receptora. Agonisti izazivaju hidrolizu fosfata (fosfatidil-inozitola) u ćelijskoj membrani. Tome sledi formiranje intracelularnih signalnih molekula, na primer, inozitol trifosfata (IT_3) i porast koncentracije jona Ca. Pri tome, jaki agonisti trombocita (na primer, kolagen i trombin) mogu izazvati stvaranje signalnih molekula, u količini koja je dovoljna za podsticanje kompletnog odgovora trombocita. Suprotno, slabi agonisti (ADP, adrenalin, TXA_2 i drugi), samo "delimično" će aktivirati trombocite (izazvaće promenu oblika ćelije i/ili ekspresiju fibrinogenih receptora). Oni jedino posredstvom pozitivne povratne sprege (formiranjem i sinergijskim delovanjem "sekundarnih agonista" i redukcijom rastojanja između trombocita) mogu izazvati "kompletnu" aktivaciju trombocita (3–9).

Od ostalih navedenih faktora koji utiču na interakciju trombocita i subendoteljskih struktura, treba spomenuti broj cirkulišućih trombocita i viskoznost krvi (fizički činioci) i vWF. Vezivanje vWF sa trombocitima dovodi do njihove aktivacije – što je od značaja, kako za adheziju i agregaciju trombocita, tako i za kasnija događanja u procesima koagulacije, a ostvaruje se posredstvom membranskog glikoproteina Ib (GPIb) kome odgovara fenotip determinisan protočnom citometrijom (CD42b). Izmena ob-

lika trombocita predstavlja početak niza reakcija u toku njihove aktivacije (26, 31).

Naša ispitivanja su pokazala da neposredno po pripremanju, u jedinicama koncentrovanih trombocita diskoidni trombociti čine oko 60–80%, sferni oko 15–25%, a funkcionalno manje vredni oblici (dendritski i balonizirani) oko 5–15% trombocita; tada vrednost morfološkog skora iznosi 300 do 400. Tokom skladištenja,

zastupljenost diskoidnih i sfernih oblika progresivno opada, dok spomenutih funkcionalno manje vrednih raste. Zbog toga se i vrednosti morfološkog skora progresivno smanjuju. Pri tome se jedinice koncentrovanih trombocita skladištene do pet dana, sa vrednošću morfološkog skora trombocita = 200 označavaju kao još kvalitetne (3, 9, 24–31). Elektronskomikroskopski izgled trombocita ja dat u Slici 6a i b.



Slika 6a–b. Elektronskomikroskopija trombocita (ultrastruktura diskoidnog trombocita punim granulama i sferni trombocit sa ispražnjenim granulama)

Diskoidni trombociti prelaze u sferne ili dendritske, uz formiranje pseudopoda. Ova "rana" i promptna reakcija je uslovljena polimerizacijom molekula aktina. Tokom promene oblika, dolazi i do iskazivanja specifičnih trombocitnih receptora. Posle kontakta trombocita sa subendotelskim strukturama, doći će do njihove adhezije u prisustvu vWF. Agregaciji prethodi ekspresija receptora za fibrinogen (GPIIb i GPIIIa) sa pratećim vezivanjem fibrinogena u prisustvu jona Ca (29–31).

Tokom sekretornog odgovora trombocita oslobađaju se supstance koje su deponovane u tri vrste organela – u gustim-granulama, α -

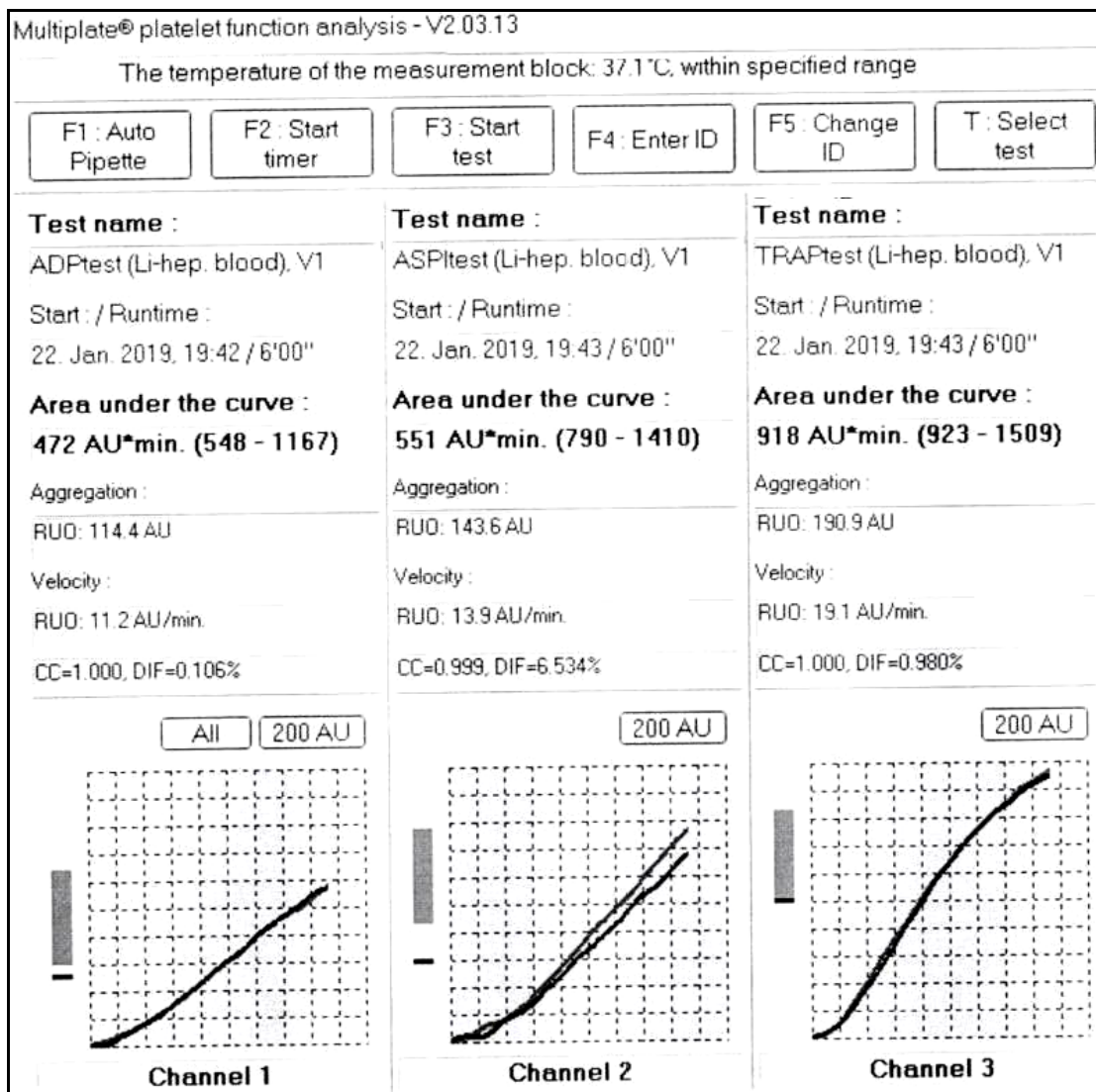
granulama i lizozomima. Od njih se ADP i ATP, odnosno gvanozin difosfat i trifosfat (Guanosine Diphosphate – GDP; Guanosine Triphosphate – GTP), serotonin, joni Ca i Mg nalaze u gustim granulama. Trombocitni čini-lac 4 i njegov hidrolizni produkt β -tromboglobulin, zatim neki katjonski proteini (stimulatori permeabilnosti zida krvnih sudova, hemotakse i baktericidnosti, kao i trombocitni faktor rasta), fibrinogen, vWF i kininogen velike molekulske mase prisutni su u α -granulama. Najzad, lizozomi sadrže kisele hidrolaze koje se oslobađaju nakon delovanja jakih agonista trombocita (3–9). Prema tome,

za procese fiziološke hemostaze – uz dovoljan broj i funkcionalnu očuvanost trombocita – neophodno je i sadejstvo navedenih supstanci/medijatora.

Transfuzija trombocita.

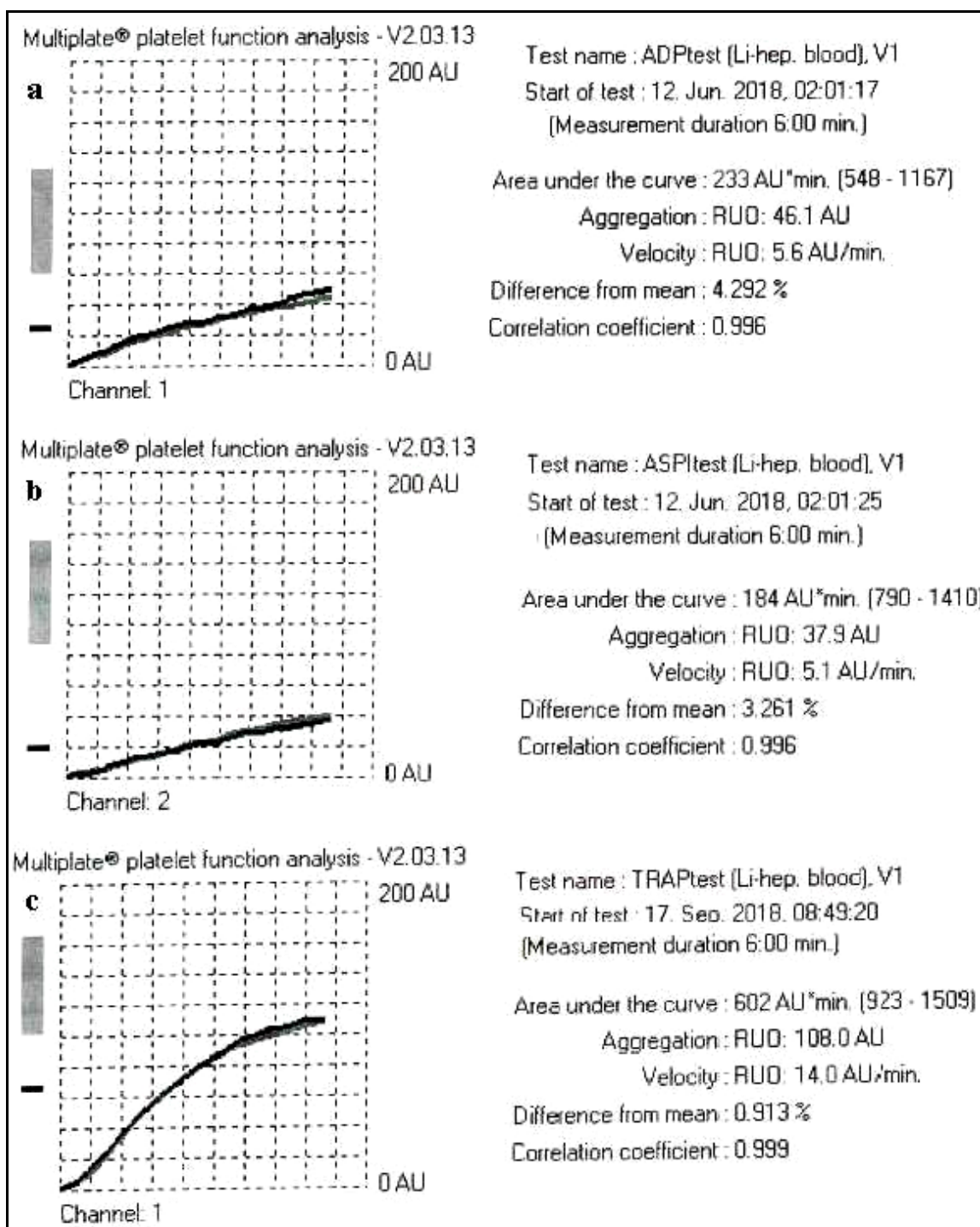
Poznato je da su krvarenja retka kod bolesnika sa brojem trombocita iznad $20 \times 10^9/L$ periferne

krvi, ali su opisani i slučajevi retkih i ne obilnih krvarenja kod bolesnika sa još manjim brojem trombocita. To govori u prilog postojanju tzv. "individualnog trombocitopenijskog praga", kritičnog za nastanak krvarenja – zbog čega se ne bi smelo samo na osnovu broja trombocita odlučivati o uvođenju transfuzija trombocita (3–9, 29–31).



Slika 7. Ispitivanje funkcije trombocita primenom Multiplate analizatora

Međutim, za određivanje kritičnog praga transfuzije trombocita su bitna i ispitivanja njihove funkcionalnosti, posebno kod bolesnika tretiranih antitrombocitnim (antiagregacijskim) lekovima iz grupe inhibitora ciklooksigenaze i pojedinih blokatora membranskih receptora (Slike 7 i 8a-c).



Slika 8a-c. Ispitivanje trombocita Multiplate analizatorom (ADPtest, ASPItest i TRAPtest)

Transfuzije trombocita kod hematoloških bolesnika sa trombocitopenijom značajno mogu smanjiti (sa oko 60% na 10%) krvaren-

jem uzrokovani mortalitet (3, 9). Transfuzije koncentrovanih trombocita omogućile su primenu većih doza hemioterapije u lečenju

malignih tumora. One su korisne i u zbrinjavanju drugih trombocitopenijskih stanja, kao što je arteficiijelna trombocitastenija, dilucijska trombocitopenija tokom operacija na otvorenom srcu, transplantacija jetre i drugo. Iz navedenih razloga, broj transfuzija koncentrovanih trombocita je u SAD tokom poslednje

dve decenije udvostručen, dok je u istom vremenskom periodu broj transfuzija krvi/ eritrocita povećan za svega oko 15–20% (3, 9). Takvo stanje je delimično posledica uvođenja i sve šire primene transplantacije matičnih ćelija, korišćenja agresivnih mijeloablativnih terapija i veće učestalosti težeg oblika trauma.

*

*

*

Uopšteno posmatrano, transfuzije trombocita mogu biti terapijske – lečenje aktivno krvarećeg bolesnika i profilaksne – sprečavanje krvarenja u "rizičnih" bolesnika. Zbog postojanja spomenutog individualnog praga krvarenja izazvanog trombocitopenijom, nije lako doneti odluku o uvođenju profilaksnih transfuzija koncentrovanih trombocita. Pored broja cirkulišućih trombocita, značajni su i drugi parametri, postojanje infekcije ili sepse, pojava DIC, mogućnost endogenog oporavka kostne srži i još neki klinički činioci.

Profilaksne transfuzije trombocita su opravdane kada je njihov broj oko $5 \times 10^9/L$ u klinički stabilnih bolesnika, odnosno manji od $10 \times 10^9/L$ u onih sa povišenom telesnom temperaturom i krvarenjima manjeg intenziteta (kožne lokalizacije ili epistaksa) ili oko $20 \times 10^9/L$ kod bolesnika sa nekim pridodatim faktorima rizika (na primer, poremećaj koagulacije ili anatomska lezija). Kod bolesnika kod kojih se planira hirurška intervencija, indikacija za transfuziju koncentrovanih trombocita je broj trombocita oko $50\text{--}100 \times 10^9/L$, tačnije, cilj je da se obezbedi navedeni broj (3, 6–9).

Terapijsku efikasnost primenjenih koncentrovanih trombocita moguće je proceniti proračunom porasta korigovanog broja trombocita jedan sat posle transfuzije ili ređe na osnovu normalizacije vremena krvarenja. Inače, korigovani broj trombocita treba da iznosi oko $7 \times 10^9/L$ po jedinici transfundovanih koncentrovanih trombocita. S obzirom

da su gore navedeni parametri funkcija više činilaca (na primer, funkcionalne očuvanosti trombocita u jedinicama trombocita, pojave sepse, DIC ili aloimunizacije u primaoca i drugih) – najpouzdaniji pokazatelj terapijskog učinka transfuzija trombocita je ipak prestanak ili sprečavanje krvarenja (3–9, 24–31).

Koncentrovani trombociti iz cele krvi mogu biti pripremani pomoću dva metoda/pristupa: 1) izdvajanjem koncentrovanih trombocita iz prethodno prikupljene plazme bogate trombocitima ili 2) izdvajanjem koncentrovanih trombocita iz "buffy coat"-a. Ovom drugom procedurom omogućeno je spremanje eritrocita siromašnih u leukocitima (redukcija broja leukocita 80–90%). To nije dovoljno za prevenciju aloimunizacije protiv leukocitnih antigena, ali jeste značajno za postizanje efikasnije leukodeplecije pri naknadnoj filtraciji eritrocita (3, 9).

Jedinice koncentrovanih trombocita treba transfundovati neposredno po pripremanju, a po potrebi one mogu biti skladištene do pet (eventualno sedam) dana na temperaturi od $20\text{--}22^\circ\text{C}$, uz permanentno mešanje jedinica električnom tresilicom. Tokom skladištenja, broj trombocita u jedinicama koncentrovanih

trombocita se progresivno smanjuje u odnosu na njihov broj neposredno po pripremanju. Dolazi i do promena morfološke distribucije, a time i vrednosti morfološkog skora trombocita. Vrednost morfološkog skora se izračunava

na osnovu zastupljenosti pojedinih oblika trombocita, standardizovanom skalom sa vrednostima od nula do četiri: balonirani = 0; dendritski = 1; sferni = 2; diskoidni = 4 (29–31).

Da bi se produžila terapijska upotrebljivost skladištenih trombocita, brojna istraživanja su se usmerila u pravcu izučavanja njihovog dugotrajnog skladištenja – do nekoliko godina. Zbog toga, poslednjih godina se intenzivno radilo na usavršavanju postupaka skladištenja trombocita u zamrznutom stanju (kriokonzervisani trombociti). Međutim, potrebno je naglasiti da su trombociti veoma osetljivi na niske (na primer, $4\pm 2^{\circ}\text{C}$) temperature. Tako, ako im se temperatura smanjuje ispod $20\pm 2^{\circ}\text{C}$, pored kvantitativnih, nastupaju brojne kvalitativne (morfološke i funkcionalne) promene u trombocitima – menjaju oblik, dolazi do porasta Ca u citosolu i polimerizacije aktina, te oslobađanja sadržaja granula. Ključna reakcija koja rezultuje "pregrupisanjem" ili "slepljivanjem" receptora (CD42b) za vWF i posledičnog gubitka trombocita iz cirkulacije ("CD42b-cluster mediated platelet clirens") – o čemu ima i domaćeg saopštenja (9, 26).

Kod nas takođe su izvedena ispitivanja efikasnosti različitih protokola kriokonzervacije trombocita, procenjena na osnovu oporavka broja, morfologije, ultrastrukture i funkcionalne očuvanosti trombocita. Pri tome, kao najefikasniji, pokazao se protokol sa programiranim procedurom zamrzavanja (uz kompenzaciju oslobođene toplote fuzije) u kombinaciji sa 6% rastvorom DMSO – postignut je oporavak odmrznutih trombocita od 91% (29–31). U rutinskom radu kriokonzervisani trombociti se još uvek ne primenjuju, iako ima zemalja sa razvijenom zdravstvenom službom koje smatraju da je upotreba kriokonzervisanih trombocita ne samo od mirnodopskog nego i od vojnomedicinskog značaja.

Sumarno, transfuzije koncentrovanih trombocita još uvek su terapija izbora u lečenju bolesnika sa trombocitopenijom. Učestalost krvarenja zbog trombocitopenije je velika, te postoje neprestano rastuće potrebe za transfuzijama trombocita. S druge strane, neprestano je prisutan problem dobijanja kompatibilnih trombocita da bi se broj spomenutih sporednih efekata transfuzija koncentrovanih trombocita sveo na minimum. Zbog svega toga, jasno je da je potrebno i dalje intenzivno raditi na iznalaženju novih metoda, kao što su stimulacija trombocitopoeze citokinima i kriokonzervacija trombocita – koji bi predstavljali (sami ili u određenoj kombinaciji) dopunu ili alternativu za klasične transfuzije trombocita.

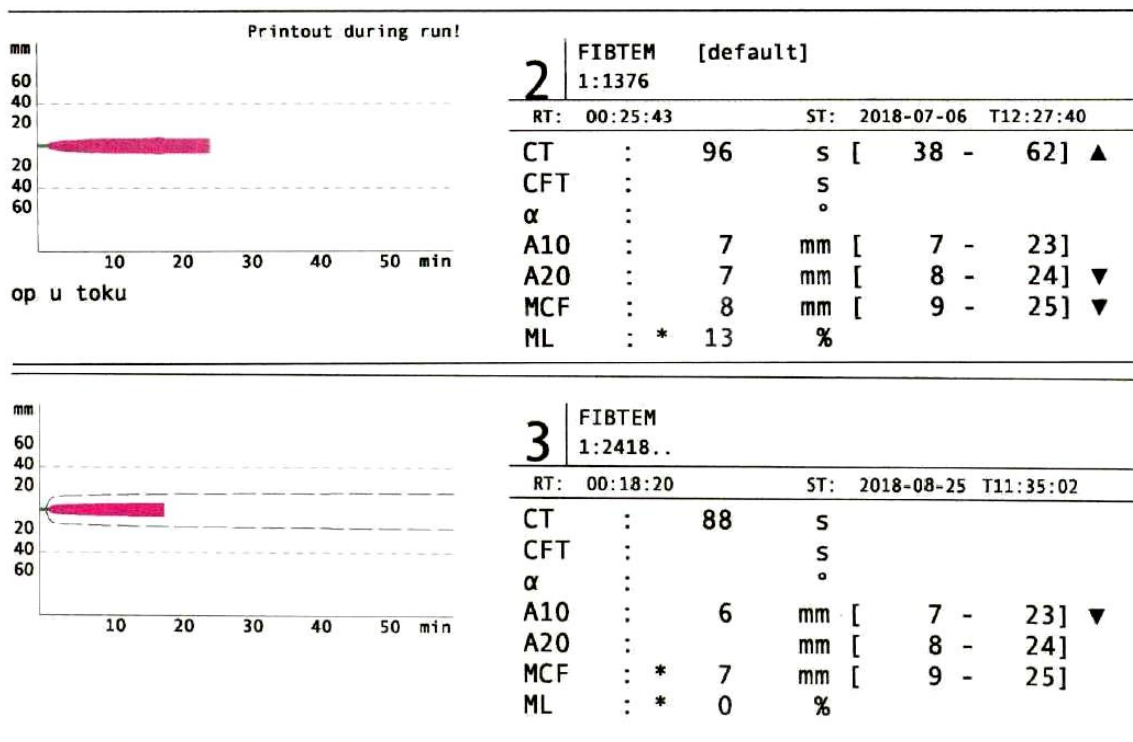
Krioprecipitat

Krioprecipitat je koncentrat plazmatskih proteina velike-molekulske-mase koji se talože na niskim temperaturama (krioprecipitacija) i među kojima se naalaze FVIII, vWF, fibrinogen, činilac XIII (Factor XIII – FXIII) i fibronektin. Preciznije, to je hemoprodukat koji sadrži supstance, izdvojene taloženjem u toku odmrzavanja FFP na temperaturi od $4\pm 2^{\circ}\text{C}$ (3–9).

U krioprecipitiranom materijalu je prisutno približno 50% početne količine FVIII:C, 70% vWF, 35–50% fibrinogena i 30% FXIII, a zavisno od vrste, 1–5% ostalih činilaca koagulacije (V, VII, IX, X, XI i XII), uz terapijski efikasnu količinu fibronektina (3–9, 32–35).

Pripremljeni krioprecipitat može biti čuvan na temperaturi -30°C ili nižoj do terapijske upotrebe, najviše do godinu dana. U vezi sa primenom krioprecipitata kod bolesnika sa hipofibrinogenemijom, treba napomenuti da je to danas najpogodniji koncentrovani preparat fibrinogena.

Procenu plazmatsku koncentraciju i aktivnost fibrinogena i potrebe u krioprecipitatu moguće je izračunati koristeći: 1) klasičnu jednačinu (data je u daljem tekstu) i 2) na osnovu rezultata Rotema (uz brojne podatke o aktivnosti sistema koagulacije i fibrinolize – na osnovu Extrema i Intema), odnosno Fibtema (videti Slike 9a–b i jednačine posle slika).



Slika 9a–b. Snižene vrednosti Fibtema u Rotemu koji ukazuju na deficit fibrinogena u krvi

Prosečan sadržaj fibrinogena po jedinici krioprecipitata iznosi oko 250 mg, a prema standardima njegova minimalna količina treba da bude 150 mg. Broj potrebnih jedinica krioprecipitata za nadoknadu deficita fibrinogena moguće je izračunati pomoću sledećih najavljenih jednačina (3, 9):

- telesna masa [kg] x 70 mL/kg = volumen krvi [mL];
- volumen krvi [mL] x (1,0 – Hct) = volumen plazme [mL];
- potrebna količina fibrinogena [mg] = (željena koncentracija fibrinogena u mg/dL - početna koncentracija fibrinogena u mg/dL) x (volumen plazme [mL]);
- i broj jedinica krioprecipitata = (potrebna količina fibrinogena u mg) : 250 mg.

Prema važećim standardima, aktivnost FVIII:C po jedinici krioprecipitata treba da iznosi 80 IU ili više. Iako nije više terapijsko sredstvo izbora, krioprecipitat još uvek može biti primenjen u lečenju deficita FXIII, hemo-filije A i bolesti von Willebrand – ukoliko nam ne stoje na raspolaganju koncentrovani preparati (3, 8, 9).

Transfuzije velikih količina krioprecipitata mogu izazvati značajni porast koncentracije fibrinogena i još nekih činilaca koagulacije, a time prouzrokovati hiperkoagulabilnost krvi, zbog čega postoji rizik od tromboze/ trombo embolizma kod primaoca. Zato ne treba dozvoliti neopravdanu i prekomernu upotrebu krioprecipitata. Inače, u korišćenju krioprecipitata nisu uočene veće razlike poslednjih

nekoliko godina u zemljama sa razvijenom zdravstvenom službom – iako danas stoje na raspolaganju komercijalni produkti pojedinih činilaca, kao i njihovi rekombinantni analozi (3, 9, 32–35).

Na kraju, moguće je tvrditi da je primena krioprecipitata danas sigurno opravdana za nadoknadu fibrinogena ili FXIII i prilikom pripremanja FL. Nadoknada FVIII:C se bolje ostvaruje komercijalnim preparatima, a preparati FVIII:C/vWF sadrže i vWF u terapijski efikasnim količinama, te mogu zameniti krioprecipitat u lečenju bolesti von Willebrand.

Fibrinski lepak

Fibrinski lepak je dvokomponentni biološki sistem, namenjen postizanju lokalnog hemostaznog, adhezivnog i "zaptivnog" efekta, a može služiti i kao "matrix" za lokalnu primenu nekih aktivnih supstanci (na primer, faktora rasta fibroblasta, antibiotika i drugo). Komponentu 1 FS čini proteinska frakcija koja sadrži fibrinogen, FXIII, fibronektin i još neki krioprecipitirajući konstituenti plazme, dok su u komponenti 2 prisutni trombin i joni kalcijuma. Najzad, sistemu FS moguće je dodati neki egzogeni antifibrinolitik (aprotinin) čime se odlaže liza fibrinskih polimera (3, 9, 36).

Adhezivni kapacitet FS je u direktnoj proporciji sa sadržajem fibrinogena i može biti povećan delovanjem FXIII. Koncentracije fibrinogena u krioprecipitatu obogaćenom fibrinogenom, odnosno u komercijalnim preparatima FS, iznose oko 40 odnosno 80–120 g/L. Sadržaj trombina (najčešće oko 500–1 000 IU/mL) je od presudnog značaja kada primena ima za cilj ispoljavanje hemostaznog efekta, jer od njega zavisi brzina pretvaranja fibrinogena u fibrin. Pored toga, trombin obavlja i aktivaciju FXIII. Prisutni FXIII determiniše finalnu stabilnost fibrinskih polimera, čime utiče na adhezivni kapacitet FS. Fibronektin pospešuje adheziju fibroblasta i reepitelizaciju tkiva, a time ubrzava zarastanje rana; njegova koncentracija u FS iznosi oko 5–10 g/L (9, 36). Postoje komercijalni preparati FS koji su veoma efikasni, ali su rizični u pogledu transmisije uzročnika zaraznih bolesti (jer se pripremaju iz pulovane plazme) i skupi. Komponente treba primenjivati lokalno, korišćenjem sistema dvostrukog šprica kao osnovnog aplikujućeg metoda ili neke od njegovih modifikacija, na primer, u vidu "spreja".

Prednosti primene pojedinačnog, a posebno autolognog FS, metodama originalne reciklažne krioprecipitacije ili korišćenjem Vivostat systema (Slika 10a–b i Slika 11a–b), su smanjeni rizik ili odsustvo aloimunizacije i transmisije virusa, uz niže troškove proizvodnje (36–42).



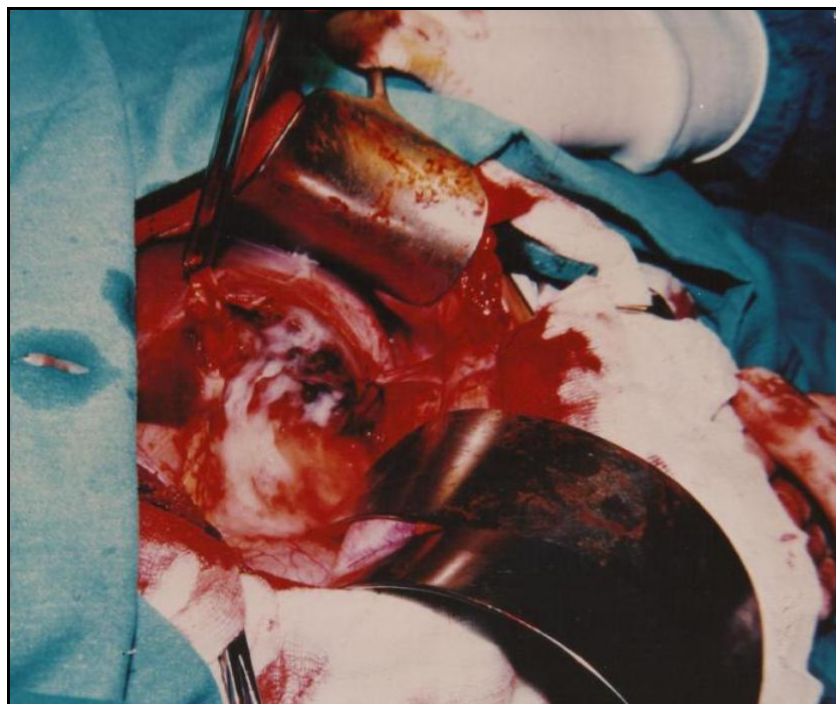
Slika 10a–b. Pripremanje fibrinskog lepka metodom Vivostat systema – početak procedure



Slika 11a–b. Pripremanje fibrinskog lepka metodom Vivostat systema – finalizacija procedure

Primena FS je indicovana u toku resekcije ili urgentnog zbrinjavanja povreda parenhimatoznih organa (na primer, jetre ili slezine;

Slika 12), neurohirurških ili drugih mikrohirurških procedura, prilikom izvođenja vaskularnih ili gastrointestinalnih anastomoza i drugo.



Slika 12. Primena fibrinskog lepka (pripreman reciklažnom krioprecipitacijom) – resekcija jetre (1995)

Pri ekstrakciji zuba kod hemofiličara ili bolesnika na antikoagulantnoj terapiji, odnosno kod bolesnika sa poremećajem Alveolitis sicca, upotreba FS obezbeđuje ne samo efikasnu lokalnu hemostazu, nego i brže i efikasnije zarastanje rane (sa neovaskularizacijom).

Ima domaćih saopštenja (40) o primeni FS kao "matrixa" za dozirano oslobađanje faktora rasta poreklom iz trombocita (PDGF) – tačnije iz tzv. ultra-koncentrovanih trombocita posle oralno-hirurške intervencije (Slika 13).



Slika 13. Primena fibrinskog lepka (pripreman reciklažnom krioprecipitacijom) – alveolitis sicca (2014)

Selektivne afereze sa ekstrakorporalnom adsorpcijom

TIP je procedura kojom se otklanja onaj deo bolesnikove krvi (plazma ili neki njen sastojak) koji je patološki izmenjen ili u kome se nalazi neki "patogeni supstrat". Tema ovog rada nisu konvencionalne terapijske afereze. Prilikom afereze lipoproteina male gustine (LDL–afereze), adsorpcija supstrata postiže se imunsko-afinitetnim (antitela anti-LDL) ili hemijsko-afinitetnim (dekstran-sulfata ili apo-protein B) kolonama. U upotrebi su različiti adsorbensi – biološki ili sintetski ligandi – kao

što su stafilokokni protein A (za vezivanje autoantitela, prvenstveno supklase IgG1, IgG2 i IgG4), protein G (za selektivno vezivanje IgG3), derivati galaktoze ili N-acetilgalaktozamina (za adsorpciju antitela specifičnosti ABO), triptofan (za vezivanje antitela sistema HLA), fenilalanin (za redukciju titra anti-acetilholin receptorskih antitela) i drugi (3, 9, 43–46).

Selektivne TIP kod transplantacije bubrega.

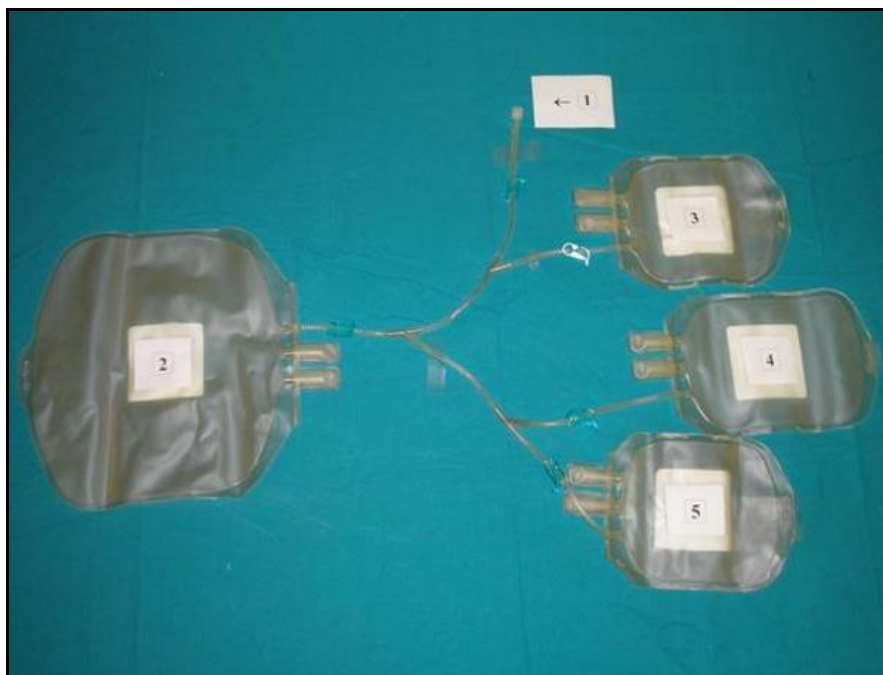
Selektivno otklanjanje nekog "patogena" tokom TIP moguće postići upotrebom

hemijskih, fizičkih ili imunskih mehanizama, primenom opreme za adsorpciju (integralni deo separatora ili upotrebom dodatne aparature). Specifični plazmatski sastojci mogu biti izdvojeni perfuzijom plazme ili cele krvi kroz filtere ili upotrebom specifičnih kolona koja sadrže "vezujuće" materije ili ligande. Osnovna karakteristika liganda je selektivana moć vezivanja za neku supstancu, koja može biti antigen, antitelo, imunski kompleks ili neki drugi imunski reaktant u bolesnikovoj cirkulaciji. Ovi ligandi su najčešće kovalentno vezani za jedan nerastvorljiv matriks (9, 46).

Postoji i domaća saopštenja o uvođenju originalnog sistema za ECIA antitela specifičnosti ABO (43, 46). Pre-kondicijski protokoli su obuhvatili primenu selektivne TIP sa antigen-specifičnom ECIA, u kombinaciji sa antitelima anti-IL-2R (Daclizumab) i konvencionalnom imunosupresivnom terapijom: tacrolimus (Prograf) / mycophenolate-mofetil (Cellcept) / steroid (Prednisone) uz davanje

antitela anti-CD20 (Rituximab). Reč je o veoma efikasnom sistemu za *ex vivo*, a time i *in vivo* redukciju koncentracije (titra) aloantitela specifičnosti ABO korišćenjem sopstvenog imunoadsorpcijskog sistema. Uz postignutu značajnu *ex vivo* adsorpciju antitela (98,6%; klase IgG i IgM, $p < 0,01$), ostvareni su uslovi za prihvatanje alografta inkompatibilnog u sistemu ABO. Pored toga, omogućena je značajna ušteda materijalnih sredstava. Naime, cena transplantacije bubrega inkompatibilnog u sistemu ABO pri korišćenju komercijalnih kolona iznosi 38 000 dolara (3, 9), dok je cena prekondicijskog tretmana primenom navedenog sopstvenog postupka TIP i ECIA oko 1 500 eura (43).

Pretransplantacijski tretman se sastojao od nekoliko procedura TIP sa ECIA za *in vivo* smanjivanje titra antitela anti-A/B klase IgM/IgG na 4 ili manje (redukcija 96.87% $p < 0,01$). U Slici 14 prikazan je sopstveni sistem za ECIA za prekondicijski tretman primalaca ABO-inkompatibilnih bubrega (43–46).



Slika 14. Originalni sistem za ekstrakorporalnu imunoadsorpciju (ECIA) antitela ABO

U tretmanu bolesnika sa terminalnom insuficijom jetre (totalni bilirubin = 530 $\mu\text{mol/L}$) u sklopu sepsa i znacima multiorganskih poremećaja

ja, uporedo su izvedene procedure obe TIP: neselektivna i selektivna – primena opreme za ekstrakorporalnu adsorpciju (Mars, Gambro/Baxter, USA) (Slike 15a-d i 16a-d).



Slika 15a–d. Konvencionalna TIP kod tretmana hiperbilirubinemije
Izvođenjem neselektivne TIP postignuta je prosečna redukcija plazmatskog sadržaja totalnog bilirubina za $32 \pm 3,2\%$ (finalna naspram inicijalna plazmatska vrednost).



Slika 16a–d. Komercijalni sistem (Mars) za ekstrakorporalnu adsorpciju za bilirubina i drugih metabolita

Potrebno je naglasiti da zbog velike telesne mase bolesnika (≥ 90 kg), visoke inicijalne koncentracije totalnog bilirubina, kao i deponovanih količina u pojedinim tkivima (koža, masno tkivo – te sledstvenog "rebound fenomena") nije postignut očekivani terapijski učinak takvog kombinovanog (TIP i ekstrakorporalna adsorpcija) tretmana, postignuti stepen deplecije $\leq 8\%$. Tome je negativno doprinela činjenica "preranog zasićenja" adsorpcijskih kolona aparature Mars. Naime, na

oko trećine procedure indeks vezivanja supstrata kolona je iznosio svega 0,22 za bilirubin – što je procenjen na osnovu upoređenja koncentracije totalnog bilirubina u uzorcima plazme posle i pre propuštanja kroz apsorpcijsku kolonu.

Na taj način, iako je bila mnogo "agresivnija" (otklanjanje brojnih i korisnih plazmatskih konstituenata), neselektivna TIP je rezultovala sa oko tri puta većom efikasnošću u poređenju sa upotrebom TIP u kombinaciji sa opremom Mars.

*

*

*

Hemoterapija, odnosno primena produkata od krvi je efikasan metod suportivnog lečenja bolesnika sa postojećim, a ponekad po život opasnim poremećajima homeostaze krvi (najčešće deficit specifičnih konstituenata). Međutim, zbog sadržaja aloantigena, nekih bioaktivnih supstanci (medijatora i/ili modulatora hemobiološkog odgovora), ali i mogućeg prisustva uzročnika transmisivnih bolesti, transfuzija krvi, tj. hemoprodukata nije bez potencijalnih nepovoljnih efekata. Njeno izvođenje može biti udruženo sa pojavom transfuzijskih reakcija i njihovih komplikacija. Zato, hemoterapija je opravdana kada je korist njene primene neosporno veća od verovatnoće nastanka sporednih efekata. Važno je donošenje ispravne odluke o izboru optimalne vrste i najcelishodnije količine hemoprodukta, ali i o najpogodnijem terminu transfundovanja u odnosu na dinamiku i stepen narušavanja homeostaze krvi (3–9).

U naporima za zaštitu bolesnika od nepovoljnih efekata može se dosta postići pridržavanjem principa usmerenosti hemoterapije, odnosno primenom samo onog krvnog konstituenta koji nedostaje bolesniku. Laboratorijske analize i preventivne mere nisu još tako usavršene da bi mogle pružati potpunu

zaštitu od nastanka svih vrsta nepovoljnih efekata u svim situacijama. Zato, hemoterapija treba da bude primenjena samo kada za to postoji puna opravdanost i kada iz objektivnih razloga nisu indikovane postojeće alternative (na primer, hematopoezni citokini) alogenih hemoprodukata. Većina transfuzijskih reakcija se uočava već na početku ili u toku hemoterapije, zbog čega bolesnici treba da budu pod stalnim stručnim nadzorom za vreme izvođenja transfuzija. Uočene simptome i znake nepovoljnih efekata treba odmah evidentirati i maksimalno evaluirati, a potom preduzeti odgovarajuće terapijske mere.

Što se tiče rizika od transmisije virusa alogenom hemoterapijom, njega je moguće smanjiti pravilnim izborom davalaca i njihovim testiranjem na markere transmisivnih bolesti. Efikasnijim prečišćavanjem produkata ne samo što se doprinosi poboljšavanju njihovog kvaliteta, nego i redukciji broja virusnih čestica u njima. Primena efikasnih virucidnih i virus-inaktivacijskih procedura danas nameće imperativno (47–50). Međutim, nije dozvoljeno da ovi postupci nepovoljno utiču na očuvanost biološke aktivnosti i/ili na imunogena svojstva preparata hemostaznih činilaca.

Literatura

1. Hillyer DC, Silberstein EL, Ness MP, Anderson CK, Roback DJ, Eds. Blood banking and transfusion medicine. 2nd Ed. Philadelphia: Churchill-Livingstone-Elsevier; 2007.
2. Kreuter JD, Blackall DP. Transfusion Medicine Self-Assessment and Review. 3rd Ed. Bethesda: AABB-Press, 2017.
3. Fung MK, Eder AF, Spitalnik SL, Westhoff CM, Eds. Technical manual, 19th ed. Bethesda: AABB-Press, 2017.
4. Balint B. The "quality" (and quality control) of clinical indications to transfusion: an essential key to blood safety. In: Barbara J, Blagojevska M, Haracic M, Rossi U, editors. The future of blood safety, a challenge for the whole Europe: how can international regulations be implemented all over. Proceedings of the European School of Transfusion Medicine Residential Course; 2001 Oct 25–28; Sarajevo, Bosnia–Herzegovina. Milano: ESTM; 2001. p. 117–24.
5. Bandarenko N, King K. Blood Transfusion Therapy – A Physician's Handbook. 12th Ed. Bethesda: AABB-Press, 2017.
6. Mintz P. Transfusion Therapy, Clinical Principles and Practice, 2nd Ed. Bethesda: AABB-Press, 2005.
7. Balint B, Todorović M, Ostojić G, Urošević I. Hemobiologija i terapijska primena eritrocita – od dogmi do savremenih pristupa. Beograd: Udruženje ART Srbije; 2007.
8. Klein HG, Anstee DJ. Mollison's Blood Transfusion in Clinical Medicine, 12th ed. Oxford: Wiley-Blackwell, 2014.
9. Balint B, Vučetić D, Ostojić G, Ljubenov M. Osnovi transfuziologije sa hemobiologijom. Beograd: MF-VMA; 2015.
10. Balint B, Stamatovic D. Clinical indications of transfusion therapy in internal medicine. In: Walterova L, Kretschmer V, Bogdanovic G, Rossi U, editors. The contribution of clinical medicine to blood safety. Proceedings of the European School of Transfusion Medicine Residential Course; Belgrade (Serbia), 8–12 October 2003. Milano: ESTM; 2003. p. 51–60.
11. Szczepiorkowski ZM, Dunbar NM. Transfusion guidelines: when to transfuse. Hematology Am Soc Hematol Educ Program 2013; 2013 638–44.
12. McQuilten ZK, Crighton G, Engelbrecht S, Gotmaker R, Brunskill SJ, Murphy MF, Wood EM. Transfusion interventions in critical bleeding requiring massive transfusion: a systematic review. Transfus Med Rev. 2015;29: (2):127–37.
13. Burton BN, A'Court AM, Brovman EY, Scott MJ, Urman RD, Gabriel RA. Optimizing Pre-operative Anemia to Improve Patient Outcomes. Anesthesiol Clin 2018; 36(4): 701–13.
14. Kohli N, Bhaumik S, Jagadesh S, Sales RK, Bates I. Packed red cells versus whole blood transfusion for severe paediatric anaemia, pregnancy-related anaemia and obstetric bleeding: an analysis of clinical practice guidelines from sub-Saharan Africa and evidence underpinning recommendations. Trop Med Int Health 2019; 24(1): 11–22.
15. Shih AW, Liu A, Elsharawi R, Crowther MA, Cook RJ, Heddle NM. Systematic reviews of guidelines and studies for single versus multiple unit transfusion strategies. Transfusion 2018; 58(12): 2841–2860.
16. Hayes MM, Uhl L. To transfuse or not transfuse: an intensive appraisal of red blood cell transfusions in the ICU. Curr Opin Hematol 2018; 25(6): 468–472.
17. Shehata N, Mistry N, da Costa BR, Pereira TV, Whitlock R, Curley GF, et al. Restrictive compared with liberal red cell transfusion strategies in cardiac surgery: a meta-analysis. Eur Heart J 2018. doi: 10.1093/eurheartj/ehy435.
18. Chen QH, Wang HL, Liu L, Shao J, Yu J, Zheng RQ. Effects of restrictive red blood cell transfusion on the prognoses of adult patients undergoing cardiac surgery: a meta-analysis of randomized controlled trials. Crit Care 2018; 22(1): 142.
19. Carson JL, Stanworth SJ, Alexander JH, Robinian N, Fergusson DA, Triulzi DJ, et al. Clinical trials evaluating red blood cell transfusion thresholds: An updated systematic review and with additional focus on patients with cardiovascular disease. Am Heart J 2018; 200: 96–101.
20. Yoshida T, Prudent M, D'alessandro A. Red blood cell storage lesion: causes and potential clinical consequences. Blood Transfus 2019; 17(1): 27–52.
21. Shah A, Brunskill SJ, Desborough MJ, Doree C, Trivella M, Stanworth SJ. Transfusion of red blood cells stored for shorter versus longer du

- ration for all conditions. Cochrane Database Syst Rev 2018; doi: 10.1002/ 14651858. CD 010801.
22. Paul E. Alexander, Rebecca Barty, Yutong Fei, Per Olav Vandvik, Menaka Pai et al. Transfusion of fresher vs older red blood cells in hospitalized patients: a systematic review and meta-analysis. Blood 2016; 28: 127.
 23. Lu M, Lezzar DL, Voros E, Shevkoplyas SS. Traditional and emerging technologies for washing and volume reducing blood products. J Blood Med 2019; 10: 37–46. doi: 10.2147/JBM.S166316.
 24. James D. McFadyen, Zane S. Kaplan. Platelets are not just for clots. Transfusion Med Rev 2015; 29: 110–9.
 25. Nahirniak S, Slichter SJ, Tanael S, Rebullia P, Pavenski K, Vassallo R, et al. Guidance on platelet transfusion for patients with hypoproliferative thrombocytopenia. International Collaboration for Transfusion Medicine Guidelines. Transfus Med Rev. 2015; 29: (1): 3–13.
 26. Balint B, Vucetic D, Vojvodic D, Brajskovic G, Ivanovic Z, Trkuljic M, et al. Cell recovery, cryothermal micro-damages and surface antigen expression as predictors for cold-induced GPIIb/CD42b-cluster mediated platelet clearance after controlled-rate vs. uncontrolled-rate cryopreservation. Blood Banking Transf Med 2004; 2(1): 22–6.
 27. Balint B, Vucic M, Todorovic M, Antic A, Stanojkovic Z, Vucic J, et al. Radically reduced *ex vivo* cell activation by using "in-line" filtered whole blood as a source of platelet concentrate. Blood Transfus 2014; 12: 440–2.
 28. Gojko D, Todorovic-Balint M, Kanjuh V, Vucetic D, Pavlovic M, Balint B. Extended platelet concentrate storage/practice – a model based on the rationalized microbial monitoring. Transfus Apher Sci 2015; 53(1): 82–4.
 29. Balint B, Vucetic V, Trajkovic-Lakic Z, Petakov M, Bugarski M, Brajskovic G, Taseski J. Quantitative, functional, morphological and ultrastructural recovery of platelets as predictor for cryopreservation efficacy. Haematologia 2002; 32(4): 363–76.
 30. Paunovic D, van der Meer P, Kjeldsen-Kragh J, Kekomaki R, Larsson S, Greppi N, Porretti L, Balint B, et al. Multicenter evaluation of a whole blood filter that saves platelets. Transfusion 2004; 44: 1197–203.
 31. Balint B, Paunovic D, Vucetic D, Vojvodic D, Petakov M, Trkuljic M, et al. Controlled-rate vs. uncontrolled-rate freezing as predictors for platelet cryopreservation efficacy. Transfusion 2006; 46 (2): 230–5.
 32. Elliott BM, Aledort LM. Restoring hemostasis: fibrinogen concentrate versus cryoprecipitate. Expert Rev Hematol 2013; 6: 277–86.
 33. Jensen NH, Stensballe J, Afshari A. Comparing efficacy and safety of fibrinogen concentrate to cryoprecipitate in bleeding patients: a systematic review. Acta Anaesthesiol Scand 2016; 60(8): 1033–42.
 34. Olaussen A, Fitzgerald MC, Tan GA, Mitra B. Cryoprecipitate administration after trauma. Eur J Emerg Med 2016; 23(4): 269–73.
 35. Nascimento B, Goodnough LT, Levy JH. Cryoprecipitate therapy. Br J Anaesth 2014; 113(6): 922–34.
 36. Balint B, Cernak I, Petakov M, Bugarski D, Malicevic Z, Mandic-Radic S, Taseski J. The use of single-donor fibrin glue prepared by recycled cryoprecipitation in experimental liver surgery. Haematologia 2002; 32(2): 135–46.
 37. Malicevic Z, Balint B, Ninkovic M, Ostojic G. Intra-abdominal hemostatic efficacy of single-donor fibrin sealant in experimental model of uncontrolled truncal hemorrhage. Blood Banking Transf Med 2004; 2: 104–11.
 38. Buchta C, Hedrich HC, Macher M, Höcker P, Redl H. Biochemical characterization of autologous fibrin sealants produced by CryoSeal and Vivostat in comparison to the homologous fibrin sealant product Tissucol/Tisseel. Biomaterials. 2005; 26(31): 6233–41.
 39. Tomazic PV, Edlinger S, Gellner V, Koele W, Gerstenberger C, Braun H, et al. Vivostat®: an autologous fibrin sealant as useful adjunct in endoscopic transnasal CSF-leak repair. Eur Arch Otorhinolaryngol 2015; 272(6): 1423–7.
 40. Balint B, Gazivoda D, Todorovic-Balint M, Lazic Z, Pavlovic M, Kanjuh V. "Triple-way" approach for the treatment of dry socket: surgery and drugs plus fibrin sealant – as a biomatrix for "ultra-concentrated" platelets. Transfus Apher Sci 2014; 51: 221–2.
 41. Graziano F, Maugeri R, Basile L, Meccio F,

- Iacopino DG. Aulogous fibrin sealant (Vivostat) in the neurosurgical practice: Part II: Vertebrospinal procedures. *Surg Neurol Int* 2016; 7(Suppl 3): S77–82.
42. Agren MS, Rasmussen K, Pakkenberg B, Jørgensen B. Growth factor and roteinase profile of Vivostat platelet-rich fibrin linked to tissue repair. *Vox Sang* 2014; 107(1): 37–43.
43. Balint B, Pavlovic M, Jevtic M, Hrvacevic R, Ostojic G, Ignjatovic Lj, Mijuskovic Z, Blagojevic R, Trkuljic M. Simple "closed-circuit" group-specific immunoadsorption system for ABO-incompatible kidney transplants. *Transf Apher Sci* 2007; 36: 225–33.
44. Balint B, Jevtić M, Todorović M, Ostojić M, Trkuljić M, Ignjatović Lj, et al. Afereze – opšti principi i upotreba za selektivno otklanjanje plazmatskih konstituenata. *Anest Reanim Transf* 2007; 35: 1–22.
45. Balint B, Ostojić G, Todorović M, Ignjatović Lj, Rafajlovski S, Trkuljić M. Imunoadsorpcijom posredovana selektivna izmena plazme – principi i terapijski efekti. *Anest Reanim Transf*. 2008; 36(1–2): 61–8.
46. Balint B, Pavlovic M, Todorovic M, Jevtic M, Ristanovic E, Ignjatovic Lj. The use of simplified *ex vivo* immunoadsorption and "multi-manner" apheresis in ABO/H-mismatched kidney transplant setting – phase II clinical study. *Transf Apher Sci* 2010; 43(2):141–8.
47. Jocić M, Trkuljić M, Jovićić D, Borovcanin N, Balint B. Mirasol PRT inactivation efficacy evaluated in platelet concentrates by bacteria-contamination model. *Vojnosanit Pregl* 2011; 68(12): 1041–6.
48. Stanojković Z, Balint B, Antić A, Todorović M, Pavlovic M, Mijuskovic Z, Subota V. Clinical efficacy of riboflavin and ultraviolet light inactivated fresh frozen plasma assessed using INR-quantification. *Transf Apher Sci* 2012; 47: 33–7.
49. Balint B, Vucetic D, Todorovic M, Borovcanin N, Jovanovic-Cupic S, Mandusic V. Safety improving by complementary serological and molecular testing combined with pathogen reduction of the donated blood in window period. *Transf Apher Sci* 2013; 49: 103–4.
50. Balint B, Jovičić-Gojkov D, Todorović-Balint M, Subota V, Pavlović M, Goodrich R. Plasma constituent integrity in pre-storage vs. post-storage riboflavin and UV-light treatment – a comparative study. *Transfus Apher Sci* 2013; 49: 434–9.

**Corresponding author: Prof. Bela Balint, MD, PhD, SASA-member,
Serbian Academy of Sciences and Arts,
Knez Mihajlova 35,
11 000 Belgrade, Serbia
Tel: +381 64 2625 126
Email: balintbela52@yahoo.com**

SELEKTIVNI IGA NEDOSTATAK I TRANSFUZIJA KRVI - PRIKAZ SLUČAJA -

Ivana Pešić Stevanović¹, Marika Ljubenov¹, Željko Miković^{1,3}

¹ Ginekološko-akušerska klinika „Narodni front“, Beograd,

² Klinika za hematologiju Klinički centar Srbije

³ Medicinski fakultet Univerziteta u Beogradu

Sažetak

Uvod: Selektivni nedostatak IgA je najčešći od svih primarnih imunodeficijencija. Definiše se kao potpuno odsustvo ili smanjeni nivo IgA u krvnom serumu ispod 7 mg/dl ili manje, posle četvrte godine života. Klinička prezentacija deficita IgA u većini ljudi je bez simptoma. Neke IgA deficitne osobe mogu imati češće infekcije respiratornog sistema i/ili povremeno dijareju, alergije, autoimune bolesti pa čak i neoplazme.

Cilj prikaza: je pravovremena dijagnostika i adekvatna terapija osobi koja je imala ozbiljne neželjene reakcije na primenu krvi.

Prikaz slučaja: Porodilja NJ, 28 godina iz Bora, kolima hitne pomoći u pratnji lekara upućena je u GAK “Narodni front” iz opšte bolnice, dva dana nakon porođaja. Na prijemu je bila izrazito bleđa, tahikardična, orošena hladnim znojem, zamarala se u govoru. Bila je bez znakova hemoragijskog sindroma. U anamnezi je navela da zna za anemiju koju ima od detinjstva i lečila je raznim preparatima gvožđa. Transfuziju krvi primala je dva puta (u 7. mesecu trudnoće i dan nakon porođaja). Oba puta reagovala je ježom, drhtavicom, tahikardijom i bolom u grudima. Na prijemu su parametri krvne slike bili sledeći: Hgb 59g/l, Hct 19,4%, MCV 69,5 fl, MCH 20,7pg, PLT 136×10^9 , WBC $9,9 \times 10^9$, RBC $2,79 \times 10^{12}/L$. Biohemijske analize krvi i hemostazni skrining bio je u referentnim vrednostima. Dežurni lekar je ordinirao transfuziju kompatibilne krvi uz premedikaciju. Na početku transfundovanja (10-15 ml) pacijentkinja se žalila na jezu i bol u grudima. Razvijala se drhtavica, tahikardija 146/min. Obustavljena je transfuzija krvi, ordiniran antihistaminska, imunosupresivna i suportivna terapija, uz intenzivan monitoring vitalnih parametara. Uzeti su uzorci krvi porodilje i uzorak ordinirane jedinice krvi za proveru krvne grupe, testova hemostaze, interreakcije a potom je urađena bakteriološka kontrola jedinice krvi. Po pregledu hematologa postavljena je sumnja da je kod porodilje nastala manifestna anemija zbog akutnog gubitka krvi prilikom porođaja i IgA deficijencije zbog koje je intenzivno i burno reagovala najpre na resuspendovanu a potom i na filtriranu jedinicu eritrocita. Ovo je laboratorijski potvrđeno (parametrima krvne slike, vrednostima feritina i serumskog gvožđa, koncentracijom imunoglobulina i elektroforezom imunoglobulina). Pacijentkinji je ordiniran intravenski preparat gvožđa u dozi od 200mg u 200 ml 0,9% rastvora NaCl kao spora intravenska infuzija na drugi dan te je u stabilnom stanju otpuštena, sa naznakom da nastavi terapiju u regionalnoj zdravstvenoj ustanovi.

Zaključak: IgA anafilaktička transfuzijska reakcija uzrokovana anti-IgA antitelima je retka (1:20000-100000 transfuzija), ali obavezuje primenu premedikacije i isprane eritrocite.

Ključne reči: IgA deficit, transfuzijska reakcija, isprani eritrociti.

Uvod

Selektivni IgA deficit (IgAD) ima jedna od 400-700 osoba. Međutim, njena učestalost varira u zavisnosti od rasnih i etničkih pripadnosti. Nalazi se najčešće kod belih osoba evropskog porekla. Selektivni IgA nedostatak je najčešći od svih primarnih imunodeficijenција. Definiše se kao potpuno odsustvo ili ozbiljni nedostatak IgA nivoa u krvnom serumu (ispod 7 mg/dl ili manje), posle četvrte godine života, dok se nivo IgA u zdravih odraslih osoba kreće od 90 do 450 mg/dl. Poremećaj se naziva "selektivni" jer su drugi serumski imunoglobulini (IgM i IgG) prisutni u normalnim ili povećanim količinama (1). IgAD se obično povezuje sa normalnim brojem B limfocita u perifernoj krvi, $CD4^{+}$ i $CD8^{+}$ T ćelija, i obično neutrofila i limfocita. IgA klasa imunoglobulina ima specifičnu funkciju zaštite sluzokože (oči, usta, grla, pluća, gastrointestinalnog trakta i urogenitalnog trakta) od infekcije. Uprkos tome što je IgA pomognut u izvesnoj meri od strane drugih klasa imunoglobulina, njegov potpuni ili ozbiljan nedostatak uzrokuje sklonost ka infekcijama, alergiji, hroničnoj dijareji ili autoimunim bolestima (2).

Prikaz slučaja

Porodilja NJ starosti 28 godina iz Bora upućena je kolima hitne pomoći u pratnji lekara u GAK "Narodni front" iz opšte bolnice, dva dana nakon porođaja. Na prijemu je bila izrazito bleđa, tahikardična, orošena hladnim znojem, zamarala se u govoru. Nije imala znake hemoragijskog sindroma. U anamnezi je navela da je anemiju imala od detinjstva i lečena je raznim preparatima gvožđa. Imala je česte sinusne infekcije, druge hronične bolesti je negirala, primala je transfuziju krvi u sedmom mesecu trudnoće i posle porođaja, na koje je reagovala ježom, drhtavicom, porastom pulsa i ubrzanim srčanim radom. Alergična je na Penicilin. Subjektivno je bila

iscrpljena i malaksala. Objektivno, nije bilo palpabilne limfadenopatije, jetra je bila na desnom rebarnom luku, slezina nije bila palpabilna. Bila je izrazito bleđa boje kože i vidljivih sluzokoža, adinamična, normotenzivna (130/85 mmHg). Srčana akcija je bila ritmična, bez propratnih šumova, tahikardija sa 136 otkucaja u min. Disanje je bilo vezikularno, bez propratnih šušnjeva. Abdomen je bio iznad ravni grudnog koša, palpatorno mek i bolno neosetljiv. Bila je bez edema i vidljivih venskih varikoziteta. KKS: Hgb 59g/L, Hct 19,4%, MCV 69,5 fl, MCH 20,7pg, Tr $136 \times 10^9/L$, Le $9,9 \times 10^9/L$, Er $2,79 \times 10^{12}/L$. Biohemijske analize krvi bile su u referentnom opsegu osim Crp (24,5mg/L), Fe 1,9 $\mu\text{mol}/L$. Nakon analiza krvi, dežurni anesteziolog je ordinirao transfuziju kom-patibilnih jedinica eritrocita, uz premedikaciju sa 40 mg urbazona. Odmah nakon uključene transfuzije razvilo se gušenje, jeza, drhtavica, tahikardija, te je transfuzija prekinuta, ordi-nirana je ampula sinopena, 40 mg urbazona, kiseonik, Ca-glukonat i beta blokator.

RTG srca i pluća su pokazivali smanjenu transparentiju u poziciji donjih plućnih polja obostrano, kao posledica voluminoznih dojki. Nisu viđeni znaci infiltracije u pare-nhimu. Nije bilo izliva u pleuri.

EHO abdomena je pokazivao homogenu jetru: desni lobus 172 x 89mm, levi lobus 180 x 120mm. Slezina je bila jasno vidljiva, dimenzije 129 x 60 x 70 mm. Uterus u involuciji, 154 x 75 x 99mm, kavum prazan, adneксе obostrano bez osobenosti. Nije bilo vidljive tečnosti u abdomenu i maloj karlici. Ponovljena je KKS: Hgb 55g/L, Hct 19,4%, MCV 70,0 fl, Tr $136 \times 10^9/L$, feritin 7,7ng/ml. Uzeti su uzorci za određivanje imunoglobulina i elektroforezu.

Ginekološkim pregledom, pod spekulomom su bile prisutne oskudne serohemoragične lohije. Vagina je bila prolazna za 2 poprečna prsta, normalne dubine. Grlić materice je bio dug 1,5cm, prolazan za 1 poprečni prst, bili su palpabilni šavovi, uterus u

dobroj involuciji; parametra obostrano slobodna. Duglasov prostor je bio neosetljiv, bez ispušćavanja. Cervikalni i vaginalni bris bili su uredni.

Urađene su virusološke analize: HBsAg (Elisa): negativan, Anti-HCV (Elisa): nereaktivan, Anti-HIV (Elisa): nereaktivan.

Po pristiglim analizama postavljena je dijagnoza hronične anemije sa pogoršanjem zbog naglog i akutnog gubitka krvi, kao i laboratorijska potvrda deficita IgA. (IgA <0,25g/L, IgM 0,90g/L, IgG 11,3 g/L; podklase IgA1 0,02g/L, IgA2 0,006 g/L) Pacijentkinji je ordiniran intravenski preparat gvožđa u dozi od 200 mg u 200 ml 0,9% rastvora NaCl u vidu spore intravenske infuzije na drugi dan, Folan tablete od 5mg 1x1, Vitamin C tablete od 500 mg 2x1 dnevno, te je u stabilnom stanju otpuštena sa naznakom da nastavi terapiju u regionalnoj zdravstvenoj ustanovi.

Diskusija

Medicinska istraživanja još nisu otkrila tačan uzrok selektivnog deficita IgA. U nekim porodicama postoje dokazi o porodičnoj pojavi, sugerišući autozomno dominantno i recesivno nasleđivanje. U retkim slučajevima, delimični IgA nedostatak je povezan sa delecijom IgA1 ili IgA2 gena na hromozomu 14, kao i gena glavnog histokompatibilnog kompleksa na hromozomu 6. Selektivni IgA nedostatak se može javiti kao posledica urođene intrauterine infekcije rubelom, toksoplazmozom ili citomegaoovrusom. Privremeni oblik selektivne IgAD je prijavljen nakon tretmana Vilson-ove bolesti penicilaminom (2). Klinička prezentacija IgAD u većini ljudi je bez simptoma. Neke IgAD osobe mogu imati češće infekcije respiratornog sistema i / ili povremenu dijareju. Za one IgAD pacijenate sa istorijom ponavljanih infekcija, najčešća prezentacija je infekcija uha, upala sinusa i / ili pneumonija, infekcije grla, gastrointestinalnog trakta ili očiju. Ove

infekcije mogu postati hronične i zahtevati dugotrajnu antibiotsku terapiju, ukoliko se ne leče prema antibiogramu (1,2).

Pacijentkinja koja je prikazana, u anamnezi je navela postojanje čestih respiratornih infekcija zbog čega je pod stalnom terapijom antibioticima. Alergiju na Penicilin je dobila u detinjstvu ali o tome ne poseduje medicinsku dokumentaciju. Naknadno su članovi porodice priložili otpusne liste i izveštaje specijalista koji između ostalih dokumentuju infekciju *Staphylococcus aureus*-om (MRSA) koja je lečena Eritromicinom ali bez rezultata, što se može videti na kasnije urađenom antibiogramu, jer je ova bakterija osetljiva samo na kombinaciju Trimethoprim/Sulfamethoxazole. Alergije su još jedna klinička prezentacija selektivne IgA deficijencije, a takođe mogu biti raznovrsne i u rasponu od blagih do teških. Uobičajne alergijske reakcije uključuju astmu i alergije na hranu. Astma kod nekih IgA deficitnih pacijenata može biti ozbiljna i ove osobe manje reaguju na terapiju lekovima. Alergije na hranu mogu se ispoljiti dijarejom ili abdominalnim grčevima. Veza između selektivnog IgAD i alergijskog rinitisa ili ekcema je nejasna (3). Drugi, neobičan oblik alergije se javlja kod osoba koje imaju totalno odsustvo IgA je alergijska reakcija na IgA. Primena transfuzije krvi i produkata koji sadrže IgA izazivaju u nekih IgAD osoba stvaranje antitela protiv ovog stranog proteina. U nekim slučajevima, teške i masivne alergijske reakcije mogu se javiti prilikom transfundovanja krvi, plazme ili primene imunoglobulina. Ako je moguće, osoba sa IgAD kojoj je potrebna krv treba da se testira na autoantitela na IgA pre primanja krvi i derivata krvi koji sadrže IgA. Ako postoje autoantitela, IgAD osoba može primiti isprane eritrocite ili krvne produkte kompatibilne sa IgAD primaocem ili autolognu (sopstvenu) krv (3,4,5). Posebno rizičnu grupu predstavljaju bolesnici IgAD lečeni transplantacijom matičnih ćelija hematopoeze zbog većih potreba u različitim

krvnim produktima. Njihova terapija upored ispranih eritrocita zahteva i upotrebu ispranih alogenih trombocita ili kriokonzerviranih autolognih trombocita, odnosno autologne plazme i/ili krioprecipitata (5). Učestalost autoantitela u IgAD osoba je visok, oko 40%. Ova autoantitela mogu biti usmerena protiv IgG, glatkih mišića, mitohondrija, bazalne membrane, DNK, tiroglobulina i parijetalnih ćelija želuca. Međutim, prisustvo takvih antitela nije nužno povezano sa bolešću (4). Naša pacijentkinja je već u drugom pokušaju transfundovanja jedinice kompatibilnih eritrocita verovatno razvila antitela na IgA, te je reagovala neželjenom transfuzijskom reakcijom. Drugi pokušaj, uz premedikaciju i filtriranu jedinicu eritrocita nije dao terapijski efekat jer nije u potpunosti otklonjen IgA iz transfundovanog produkta (3,4).

Najčešće autoimune bolesti povezane sa selektivnim IgAD obuhvataju: reumatoidni artritis, sistemski lupus erythematosus i Sjogren-ov sindrom. Druge autoimune bolesti endokrinog sistema, krvotvornih organa ili gastrointestinalnog sistema su povezane sa selektivnom IgAD (tireoiditis, hemolitička anemija i hronični aktivni hepatitis). Na IgAD se obično prvo sumnja zbog istorije hroničnih ili periodičnih infekcija, alergija, autoimunih bolesti ili hronične dijareje. Potvrda selektivnog IgA nedostataka je neophodna (laboratorijski test koji meri nivo IgA u krvi ili serumu). U IgAD pacijentata, nivo IgA će ili biti odsutan ili ispod 7 mg / dl, dok su količine drugih imunoglobulina normalne. U malom procentu slučajeva, možda 10%, IgAD pacijenta može biti manjak IgG2. T-ćelije, fagocitne ćelije i sistem komplementa su normalnog broja ili blizu normale (6).

Nema prevencije i specifične terapije za selektivni IgAD. Umesto toga, tretman treba da bude usmeren ka specifičnim bolestima povezanim sa selektivnom IgAD, ako ih ima. Na primer, steroidi ili tretman imunosupresivima kod pacijenata sa sistemskim lupus erythematosus-om, autoimunim bolestima ili antibiotik kod infekcije. Tretman

gamaglobulinom se ne koristi u IgAD osim ako je udružen sa deficitom IgG2 potklase. Komercijalni preparati gamaglobulina ne treba da sadrže IgA (Gammagard SD i Poligam SD). Drugi tretmani uključuju uklanjanje glutena iz ishrane, što pomaže u smanjivanju teških gastrointestinalnih simptoma kod dece i odraslih koji imaju celiakiju, te primenu stimulacije eritropoeze rekombinantnim humanim eritropoetinom u anemijama (3,5,6).

Mnoge osobe sa selektivnim IgAD žive pun životni vek bez ikakvih problema.

Zaključak

Pacijenti sa IgAD su u povećanom riziku od razvoja ozbiljne reakcije nakon primanja krvnih produkata. IgG protiv IgA antitela može da izazove ozbiljne reakcije na transfuziju ako su pacijenti sa IgAD dobili jedinicu cele krvi. Stoga, isprani eritrociti su neophodni za ove pacijente. IgAD pacijenti koji razvijaju imunoglobuline klase E (IgE) - protiv IgA antitela su pod rizikom od anafilaksije ako dobiju krv ili intravenski imunoglobulin koji sadrži IgA, ali ova situacija je izuzetno retka. Pojedinci sa takvom neobičnom pojavom treba da dobiju samo one imunoglobuline ili derivate krvi koji ne sadrže IgA a savetuje se oprez kod davanja intravenskih imunoglobulina pacijentima sa IgAD ukoliko njihov anti-IgA status nije poznat (3,4,5,6).

Literatura

1. Yazdani R, Azizi G, Abolhassani H, Aghamohammadi A. Selective IgA Deficiency: Epidemiology, Pathogenesis, Clinical Phenotype, Diagnosis, Prognosis and Management. *Scand J Immunol.* 2017; 85(1): 3–12.
2. De Oliveira-Serra FA¹, Mosca T, Santos de Menezes MD, Carvalho-Neves Forte W. Clinical symptoms in IgA deficiency. *Rev Alerg Mex.* 2017; 64(1): 34–9.

3. Jorgensen, G.H., Gardulf, A., Sigurdsson, M.I. et al. Clinical Symptoms in Adults with Selective IgA Deficiency: A Case-Control Study. *J Clin Immunol* 2013 33: 742.
4. Ludvigsson JF¹, Neovius M, Stephansson O, Hammarström L. IgA deficiency, autoimmunity & pregnancy: a population-based matched cohort study. *J Clin Immunol* 2014; 34(7): 853–63.
5. Balint B, Todorović M. Od hematopoeze do kliničke primene hemoprodukata. U: Osnovni principi hemoterapije. Beograd, 2010; 39–87.
6. Ferreira R. C., Pan-Hammarstrom Q., Graham R. R., Gateva V., Fontan G. et al. Association of IFIH1 and other autoimmunity risk alleles with selective IgA deficiency. *Nature Genet* 2010; 42: 777–80.

Corresponding author: Ivana Pešić Stevanović
Kraljice Natalije 62
11000 Beograd
tel.+381641545164
e-mail: i.p.stevanovic@gmail.com



PERIOPERATIVNA HIPOTERMIJA KROZ VREME

Snježana Zeba^{1,2}, Katarina Mladenović^{1,2}, Goran Rondović^{1,2}

¹ Klinika za anesteziologiju i intenzivnu terapiju, Vojnomedicinska akademija Beograd

² Medicinski fakultet Vojnomedicinske akademije Univerziteta odbrane u Beogradu

Sažetak

Perioperativna hipotermija je prvi put opisana 1847. godine. Smatralo se da je hipotermija najvažniji problem povezan sa masivnom transfuzijom krvi i da masivna transfuzija može smanjiti telesnu temperaturu na opasno nizak nivo. Neželjeni efekti perioperativne hipotermije opisani 1907. godine. Prvi uređaj za zagrevanje pacijenata primenjeni su pedesetih godina prošlog veka. Početkom osamdesetih godina prošlog veka perioperativna hipotermija se smatrala kao normalna posledica hirurške procedure, ali nije se smatrala posebno štetnom. Danas se zna da je perioperativna hipotermija još uvek klinički problem sa teškim komplikacijama.

Ključne reči: perioperativna hipotermija, masivna transfuzija krvi, uređaji za zagrevanje pacijenata

Absrtact

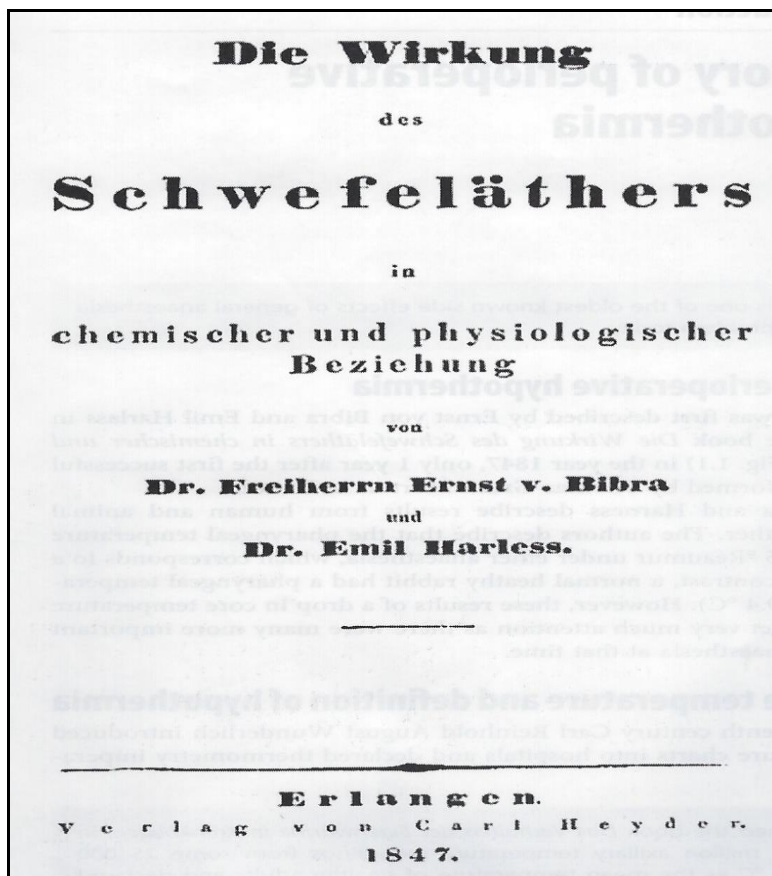
Perioperative hypothermia was first descrbed in 1847. Hypothermia was the most important problem in massive blood transfusions and massive transfusion can reduce the body temperature to a dangerously low level. First description of adverse effects of perioperative hypothermia was reported in 1907. First warming device was implemented in the fifties of the last century. In the early 1980s mild hypothermia was considered a normal consequence of surgery, and not thought to be especially harmful. Perioperative hypothermia is still a clinical problem with severe associated complications.

Key words: perioperative hypothermia, massive blood transfusion, warming device

Uvod

Iako je perioperativna hipotermija prvi put opisana 1847. godine u Nemačkoj u knjizi *Die Wirkung des Schwefeläthers in chemischer und physiologischer Beziehung* autora Ernsta von Bibra i Emil Harlass (što je samo godinu dana nakon što je izvedena prva uspešna opšta anestezija u Bostonu),

perioperativna hipotermija je još uvek klinički problem sa visokom učestalosti i teškim komplikacijama (slika 1). Pad unutrašnje telesne temperature koji se događa za vreme opšte anestezije u to vreme nije dobio mnogo pažnje zbog mnogo važnijih problema povezanih sa anestezijom (1,2).



Slika 1. Omot knjige u kojoj je prvi put opisana perioperativna hipotermija
(Preuzeto iz: Bräue A. History of perioperative hypothermia. In Perioperative Temperature Management. Cambridge University Press, 2017: 1-8.)

Merenje temperature

Sredinom 19. veka u bolnice se uvode termometri i beleženje temperature kod bolesnih pacijenata. Za ovo je zaslužan Carl Reinhold August Wunderlich. Davne 1868. godine on je objavio knjigu *Das Verhalten der Eigenwärme in Krankheiten* u kojoj je analizirao preko milion aksilarnih temperatura zabeleženih od 25000 pacijenata. Utvrdio je da srednja aksilarna temperatura kod zdravih odraslih osoba iznosi 37,0 °C, a normalni raspon temperature je od 36,2 °C do 37,5 °C. Unutrašnja telesna temperatura ispod 36 °C nađena je samo kod veoma teških bolesnika. Po njegovom mišljenju unutrašnja temperatura ispod 36,25 °C bi se

trebala smatrati normalnim samo pod posebnim okolnostima. Ovo može biti prva naučna definicija hipotermije (3). Danas se smatra da je održavanje unutrašnje telesne temperature i njeno praćenje kroz perioperativni period esencijalni deo rada anesteziologa. Za merenje unutarnje telesne temperature u perioperativnom periodu upotrebljava se nekoliko različitih tehnologija. Nova metoda za merenje unutrašnje temperature je SpotOn sistem koji predstavlja revoluciju u temperaturnom monitoringu. Omogućava neinvazivno kontinuirano merenje sa prikazom na displeju (slika 2).



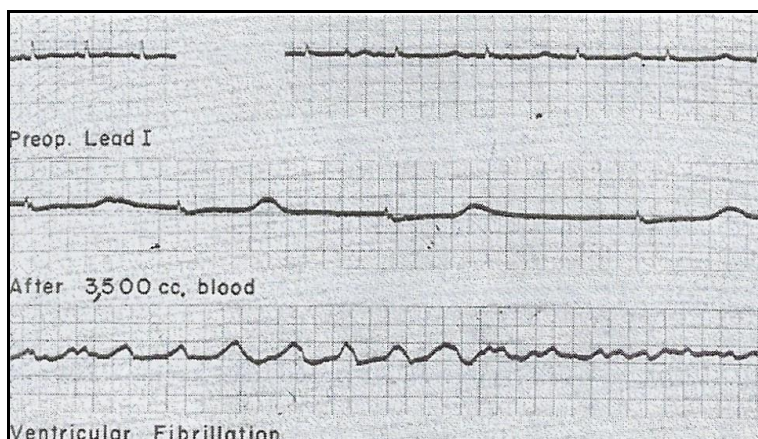
Slika 2. SpotOn sa monitorom (Preuzeto od 3M Temperature Monitoring System)

Osamdesetih godina devetnaestog veka nalazimo prve opise štenog delovanja perioperativne hipotermije i pominju se prve mere protiv hipotermije. Von Kappler je 1880. opisao smanjenje telesne temperature u 20 hirurških pacijenata, a godinu dana kasnije ginekolog Emil Schwarz je preporučio grejanje infuzionih rastvora na 38-40 °C kao prevenciju hlađenja tela. Povezanost između postoperativne pneumonije i perioperativne hipotermije prvi put se pominje 1907. godine. Opisali su je Döderlein i König te preporučili grejanje operacionog stola što je moglo smanjiti stopu upale pluća sa 7,5 do 10,2% na 3,6 do 2,1%. Iste te godine je hirurg Christian Heinrich Braun pokušao prevenirati hipotermiju koja se javlja za

vreme hirurške procedurestavljanjem pacijenta na jastuke ispunjene toplom vodom i prekrivanjem sa toplim peškirim (4).

Perioperativna hipotermija i masivna transfuzija

Da teška perioperativna hipotermija može biti uzrok smrti za vreme masivne transfuzije opisao je Howland i saradnici 1956. godine. Ovi autori su opisali devet slučajeva ventrikularne fibrilacije za vreme operacija u abdomenu koje su bile povezane sa brzim davanjem masivne transfuzije hladne krvi. Razmišljali su da je jedan od važnih patofizioloških faktora direktna doprema hladne krvi u srce što uzrokuje hlađenje miokarda i vodi u aritmije i ventrikularnu fibrilaciju (slika 3).

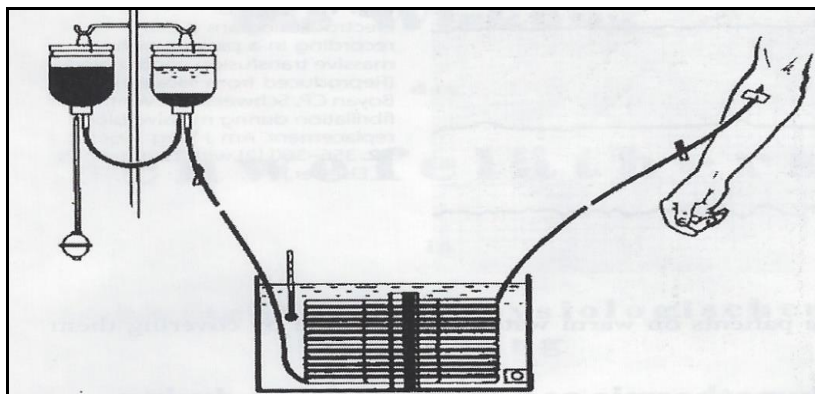


Slika 3. Ventrikularna fibrilacija kod pacijenata samasivnom transfuzijom hladne krvi
(Preuzeto iz: Bräuer A. History of perioperative hypothermia . In Perioperative Temperature Management. Cambridge University Press, 2017: 1-8.)

Za merenje unutrašnje telesne temperature, u narednim prospektivnim studijama, koristila se ezofagealna sonda koja se plasirala što je moguće bliže srcu za vreme masivne transfuzije krvi(5). Kod prvog pacijenta je unutrašnja temperatura pala samo za 1 °C (od 37 °C na 36 °C) za vreme prvih 3000 ml transfundovane krvi. Za vreme narednih 120 minuta pacijentu je bilo potrebno 18000 ml krvi, oko 150 ml/min. Za vreme ovog perioda ezofagealna temperatura je stalno padala. Na 31 °C pojavile su se prve ventrikularne ekstrasistole, a na 29 °C zabeleženo je produženje ST-intervala praćeno bradikardijom i ventrikularnim ekstrasistolama. Funkcija srca je prestala na

27.5 °C iako je procenjeni gubitak krvi potpuno nadoknađen.

U drugog pacijenta asistolija se pojavila pri unutrašnjoj temperaturi od 32 °C nakon transfuzije 6600 ml hladne krvi. Nekoliko drugih pacijenata razvilo je tešku hipotermiju pri unutrašnjoj temperaturi oko 30 do 32 °C. Zbog ovih zapažanja autori su odlučili da se nakon treće jedinice krvi primeni topla krv. Oni su kao grejač krvi koristili 7 metara sterilne plastične cevi stavljene u vodeno kupatilo od 20 litara sa termometrom. Temperatura vode se regulisala dodatkom tople ili hladne vode (slika 4).



Slika 4. Shematski prikaz grejača krvi

(Preuzeto iz: Bräuer A. History of perioperative hypothermia. In Perioperative Temperature Management. Cambridge University Press, 2017: 1-8.)

Sa ovako zagrejanom krvi pacijenti ostaju relativno topli, daleko iznad 35°C, i nijedan od njih nije razvio aritmiju ili srčani arrest za vreme masivne transfuzije.

Churchill-Davidson je nekoliko godina kasnije izjavio da je hipotermija bila najvažniji problem masivne transfuzije krvi koja može smanjiti telesnu temperaturu na opasno nizak nivo (6). Danas se smatra da je zagrevanje pacijenata strujanjem toplog vazduha mnogo efikasnije i jeftinije od zagrevanja tečnosti. Međutim, grejanje tečnosti je važno razmatrati zato što veliki

volumen nezagrejane tečnosti može smanjiti unutrašnju telesnu temperaturu. Preporuka je da ako je potrebno nadoknaditi više od 500 ml/h treba razmotriti upotrebu grejača tečnosti. Takođe, svi rastvori za ispiranje trebaju biti zagrejani. Što se tiče krvi, ne treba je nikada dati bez prethodnog aktivnog zagrevanja (7).

Teška perioperativna hipotermija povezana sa opasnim problemima je registrovana u pedijatrijskoj hirurgiji i anesteziji. France je 1957. godine opisao značajan pad unutrašnje temperature kod novorođenčadi na 28,6 °C.

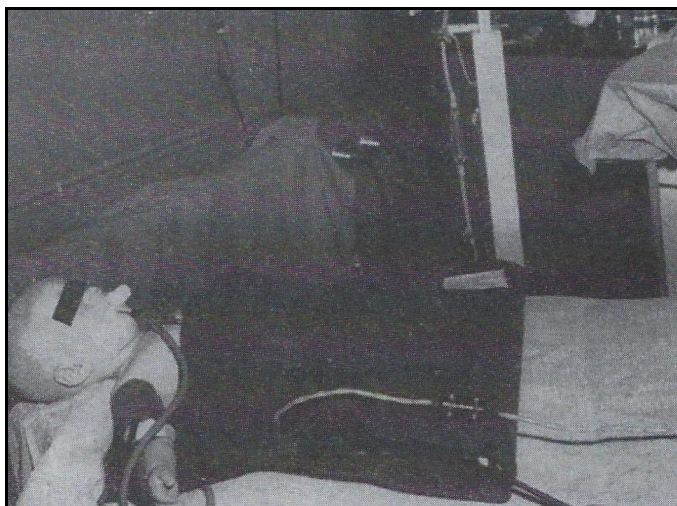
(8). Dečica koja su bila u hipotermiji su bila dremljiva, usporenog disanja, a za ponovo zagrevanje trebalo je nekoliko sati. Uočeno je da dojenčad kod kojih je unutrašnja temperatura pala ispod 36,1 °C su imali problema sa hranjenjem u postoperativnom periodu (9). Povezanost teške perioperativne hipotermije sa perioperativnim smrtnim ishodom opisao je Farman 1962. godine. Uočio je da je od devet od 67 beba koje su bile podvrgnute hirurškoj proceduri umrlo unutar prva 24 sata. Kod šest je nađeno da

su patili od hipotermije, a izmerena temperatura je iznosila ispod 36,1 °C. Glavni uzrok smrti beba koje su bile u hipotermiji je bila respiratorna depresija (10). Takođe su tražili faktore rizika za perioperativnu hipotermiju: težina bolesti, dužina operacije, dob, anestetički lekovi, klimatizacija, mišićni relaksanti, telesna težina. Tome su dodate hirurška procedura u abdomenu ili grudnom košu, niska inicijalna unutrašnja temperatura, transfuzija hladne krvi (11).

Prvi uređaji za zagrevanje pacijenta

Dramatično zapažanje da je teška hipotermija u perioperativnom periodu kod dece povezana sa smrtnim ishodom dovodi do razvoja prvih uređaja za zagrevanje. Pored uređaja za zagrevanje krvi i tečnosti konstruisan je dušek za zagrevanje (12). Opisano je da je 1953. godine za održavanje

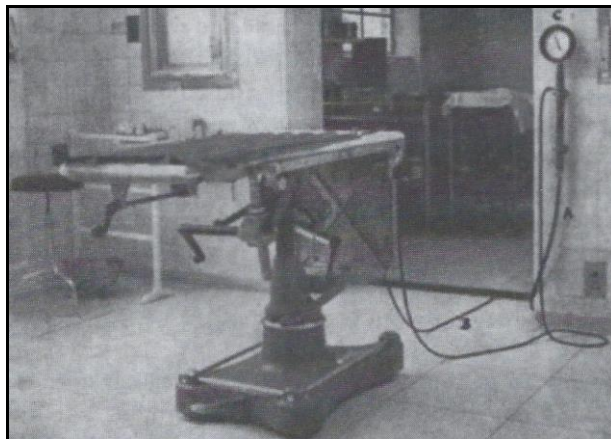
normotermije za vreme neurohirurške operacije kod dece uspešno upotrebljeno električno ćebe za zagrevanje (slika 5) (13). Autori su bili ubeđeni da je rani postoperativni oporavak dece bio znatno brži kada je teška hipotermija bila prevenirana.



Slika 5. Električno ćebe za zagrevanje održava normotermiju za kraniotomiju kod dece
(Preuzeto iz: Bräuer A. History of perioperative hypothermia. In Perioperative Temperature Management. Cambridge University Press, 2017: 1-8.)

Upotreba gumenog madraca u kome cirkuliše topla voda, a postavlja se na operacioni sto opisana je 1962. godine. Primenjen je kod beba koje su bile podvrgnute hirurškoj intervenciji (slika 6). Uočeno je da je kod dece koja su bila zagrevana razlika u

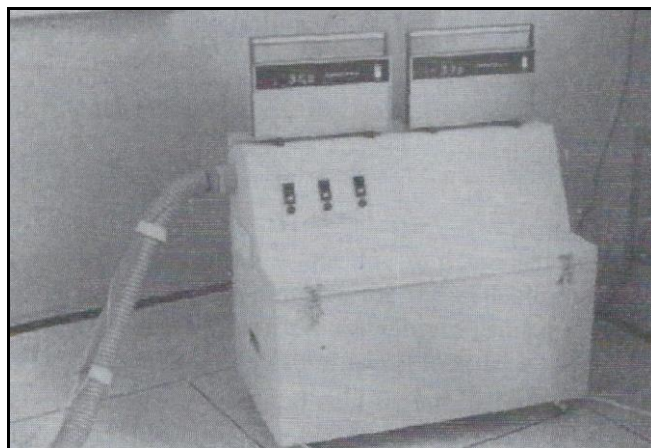
preoperativnoj i postoperativnoj unutrašnjoj temperaturi iznosila 0,3 °C. Razlika unutrašnje temperature preoperativno i postoperativno kod dece u kontrolnoj grupi iznosila je 2,4 °C (14).



Slika 6. Madrac sa toplom vodom na operacionom stolu

(Preuzeto iz: Bräuer A. History of perioperative hypothermia. In Perioperative Temperature Management. Cambridge University Press, 2017: 1-8.)

Iako je prvi sistem za zagrevanje novorođenčadi strujanjem toplog vazduha opisan 1973. godine, tek su 1988. godine prvi put uređaji za grejanje strujanjem toplog vazduha komercijalno dostupni i uvedeni u kliničku praksu (slika 7, slika 8) (15,16).



Slika 7. Kontrolna jedinica uređaja za zagrevanje toplim vazduhom

(Preuzeto iz: Bräuer A. History of perioperative hypothermia. In Perioperative Temperature Management. Cambridge University Press, 2017: 1-8.)



Slika 8. Zagrevanje pacijenta strujanjem toplog vazduha

(Preuzeto iz: 3M Bair Hugger Therapy)

Sa svim ovim merama moguće je sprečiti tokom osamdesetih godina čak 50-80 % perioperativnu hipotermiju. Međutim, počeli su dolaziti hipotermični u

sobu za oporavak (17). U to vreme blaga perioperativna hipotermija smatrana je normalnom posledicom hirurške procedure i nije smatrana posebno štetnom. Smatralo se da je jedina ozbiljna komplikacija uobičajena postoperativna drhtavica jer može povećati potrebu za kiseonikom i potrošnju kiseonika (18).

Da perioperativna hipotermija nije normalna posledica hirurške procedure već da je uzrokovana dejstvom anestetika na termoregulatornu odbranu sa prekomernim gubitkom toplote u oklinu daje novi koncept intraoperativne termoregulacije gde su opisane štetne posledice umerene perioperativne hipotermije (19).

Da je učestalost perioperativne hipotermije još uvek visoka pokazano je u nekoliko velikih studija objavljenih između 2010 i 2015. gde je nađeno da je 64% hirurških pacijenata imalo intraoperativnu hipotermiju (20).

Zaključak

Iako je perioperativna hipotermija prvi put opisana pre dva veka još uvek je klinički problem. Da bi se smanjila učestalost perioperativne hipotermije preporučuje se kontinuirano merenje unutrašnje temperature tokom perioperativnog procesa te kontinuirano zagrevanje pacijenta u preoperativnom periodu (pre-warming), intraoperativno i postoperativno strujanjem toplog vazduha, te intraoperativno zagrevanje tečnosti.

Literatura

1. Von Hintzenstern U, Petermann H and Schwarz W. Frühe Erlanger Beiträge zur Theorie und Praxis der Äther- und Chloroformnarkose. Teil 2. Die tierexperimentellen Untersuchungen von Ernst von Bibra und Emil Harless. *Anaesthesist* 2001; **50**: 869-880.
2. Sessler Di. Perioperative thermoregulation and balance. *Lancet* 2016; **387**: 2655-64.
3. Howland WS, Boyan CP and Schweizer O. Ventricular fibrillation during massive blood replacement. *Am J Surg* 1956; **92**: 356-360.
4. Bräuer A. History of perioperative hypothermia . In Perioperative Temperature Management. Cambridge University Press, 2017: 1-8.
5. Boyan CP and Howland WS. Blood temperature: a critical factor in massive transfusion. *Anesthesiology* 1961; **22**: 559-563.
6. Churchill-Davidson HC. Some problems of massive blood transfusion. *Proc R Soc Med* 1968; **61**: 681-682.
7. Torossian A, Bräuer A, Höcker J, et al. Preventing inadvertent perioperative hypothermia. *DtschArztebl Int* 2015; **112**: 166-172.
8. France GG. Hypothermia in the newborn: body temperatures following anaesthesia. *Br J Anaesth* 1957; **29**: 390-396.
9. Hackett PR and Crosby RMN. Some effects of inadvertent hypothermia in infant neurosurgery. *Anesthesiology* 1960; **21**: 356-359.
10. Farman JV. Heat losses in infants undergoing surgery in air-conditioned theatres. *Br J Anaesth* 1960; **32**: 60-80.
11. Harrison GG, Bull AB and Schmidt HJ. Temperature changes in children during general anaesthesia. *Br J Anaesth* 1960; **32**: 60-68.
12. Boyan CP and Howland WS. Problems related to massive blood replacement. *Anesth Analg* 1963; **41**: 497-508.
13. Bering EA, Jr. and Matson DD. A technic for the prevention of several hypothermia during surgery of infants. *Ann Surg* 1953; **137**: 407-409.
14. Calvert DG. Inadvertent hypothermia

- in pediatric surgery and a method for its prevention. *Anaesthesia* 1962; **17**: 29-45.
15. Lewis RB, Shaw A and Etchells AH. Contact mattress to prevent heat loss in neonatal and paediatric surgery. *Br J Anaesth* 1973; **45**: 919-922.
16. Tominaga A, Koitabashi T. et al. Efficacy of an Underbody Forced-Air Warming Blanket for the Prevention of Intraoperative Hypothermia. *Anesthesiology*. 2007; **107**:A91.
17. Vaughan MS, Vaughan RW and Cork RC. Postoperative hypothermia in adults: relationship of age, anesthesia, and shivering to rewarming. *Anesth Analg* 1981; **60**: 746-751.
18. Roe CF, Goldberg MJ, Blair CS and Kinney JM. The influence of body temperature on early postoperative oxygen consumption. *Surgery* 1966; **60**: 85-92.
19. Sessler DI. The thermoregulation story. *Anesthesiology* **2013**; 118:181-186.
20. Sun Z. et al. Intraoperative core temperature patterns, transfusion requirement, and hospital duration in patients warmed with forced air. *Anesthesiology* 2015; **122**: 276-285.

Corresponding author: Doc.dr sc med. Snježana Zeba
Crnotravska 17
11000 Beograd
Email: snjezanazeba@hotmail.com
tel. + 381 64 9134491

ŠTETAN UTICAJ PERIOPERATIVNE HIPOTERMIJE NA KOAGULACIJU I GUBITAK KRVI

Snježana Zeba^{1,2}, Goran Rondović^{1,2}, Katarina Mladenović^{1,2}

¹Klinika za anesteziologiju i intenzivnu terapiju, Vojnomedicinska akademija Beograd

²Medicinski fakultet Vojnomedicinske akademije Univerziteta odbrane u Beogradu

Sažetak

Koagulacioni sistem predstavlja zaštitni sistem od životne važnosti za organizam. Celi proces koagulacije je naročito složen i dobro regulisan i zavisi od uslova životne sredine kao što su pH i temperatura. Hipotermija povećava rizik od krvarenja. Perioperativna hipotermija smanjuje funkciju trombocita i oštećuje koagulacijsku kaskadu u plazmi. Ovo povećava gubitak krvi i potrebu za transfuzijom. Intraoperativno davanje krvi povezano je sa komplikacijama i povećanim rizikom od smrtnog ishoda.

Ključne reči: koagulacioni sistem, hipotermija, krvarenje, transfuzija

Abstract

The coagulation system is a vital protective system of the body. The whole process is extremely complex and well regulated. It also depends on adequate environmental conditions like pH and temperature. Hypothermia is associated with an increased risk of bleeding. Perioperative hypothermia reduces platelet function and impairs the plasmatic coagulation cascade. This increases blood loss and increases transfusion requirements. Intraoperative blood transfusion is associated with risk of pulmonary, septic, wound and thromboembolic complication and an increased risk of death.

Key words: coagulation system, hypothermia, bleeding, transfusion

Uvod

Sem hirurškog rada i perioperativna hipotermija se navodi kao razlog za povećani gubitak krvi tokom hirurške procedure. Perioperativna hipotermija predstavlja značajan faktor koji doprinosi morbiditetu i mortalitetu traumatizovanih pacijenata i komplikovanih hirurških procedura. Poređenjem vrednosti temperatura, vrednost unutrašnje temperature od 33 °C značajno povećava rizik od smrtnog ishoda nakon traume u odnosu na 37 stepeni celzijusa. Uočeno je da blago smanjenje temperature (33-37 °C) dovodi do poremećaja adhezije trombocita,

ali ne i do smanjene enzimске aktivnosti ili aktivacije trombocita. Međutim temperatura ispod 33 °C dovodi do smanjenja funkcije trombocita i enzimске aktivnosti što verovatno doprinosi koagulopatiji (1).

Fiziologija procesa koagulacije

Koagulacioni sistem predstavlja vitalni zaštitni sistem organizma. Proces koagulacije je izuzetno složen i dobro regulisan i zavisn je od odgovarajućih uslova životne sredine kao što su pH i temperatura.

Koagulacioni sistem prevenira gubitak krvi na dva načina: zaptivanjem mesta na oštećenom krvnom sudu i pokretanjem zara-

stanja rane. U koagulacionom procesu učestvuju dva tipa ćelija. To su ćelije subendotela koje nose tkivne faktore i trombociti. Danas se smatra da se proces koagulacije događa na površini ovih specifičnih ćelija koje su u normalnim uslovima razdvojene endotelom. Endotel sprečava stvaranje tromba sve dok povreda zida krvnog suda ne zahteva aktivaciju koagulacije. Kada se ošteti vaskularni integritet, trombociti i faktori zgrušavanja krvi se izlažu subendotelijalnim ćelijama koje nose tkivni faktor. Te ćelije su fibroblasti, periciti i glatke mišićne ćelije krvnog suda. Izlaganjem ovih ćelija započinje početna faza koagulacije. U početnoj fazi koagulacije trombociti se direktno vezuju za subendotelijalni kolagen ili preko interakcije sa von Willebrandovim faktorom koji se oslobađa iz endotelijalnih ćelija nakon povrede. Istovremeno, aktivirani faktor VII se veže sa tkivnim faktorom i proizvodi se trombin u tragovima. Oba procesa dovode do aktivacije trombocita.

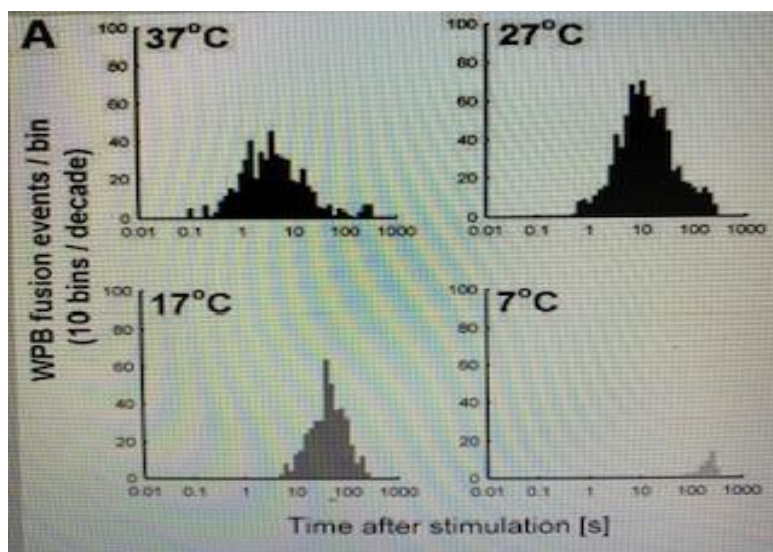
Ovo je početak pojačane faze (faza amplifikacije) koagulacije. Aktivirani trombociti menjaju svoj oblik preko različitih signalnih puteva, izlaganjem membranskih

fosfolipida stvaraju prokoagulantne površine. Dodatno, trombociti oslobađaju adenozin-difosfat (ADP) i tromboksan A_2 , koji dalje aktiviraju trombocite u blizini. Količina trombina koja je generisana u tragovima u početnoj fazi koagulacije također aktivira faktore koagulacije na površini trombocita. Aktivacija faktora koagulacije na površini trombocita rezultira fazom propagacije koagulacije. Preko nekoliko složenih mehanizama, koji uključuju mnoge faktore koagulacije, nastaju velike količine trombina što rezultira cepanjem fibrinogena u fibrinske monomere. Monomeri fibrina se polimeriziraju pomoću faktora XIII koji je aktiviran trombinom (2).

Uticaj niske temperature na koagulaciju

Poznato je da niska temperatura utiče na funkciju ćelija i faktore koagulacije. Čini se da hipotermija prvenstveno inhibira početnu fazu koagulacije.

Nakon povrede iz Weibel- Paladeovog tela se oslobađa von Willebrandov faktor koji pomaže da se u skundi formira pokrivač od trombocita. Na niskoj temperaturi ove ćelije oslobađaju značajno manje i sporije Willebrandov faktor (slika 1) (3).

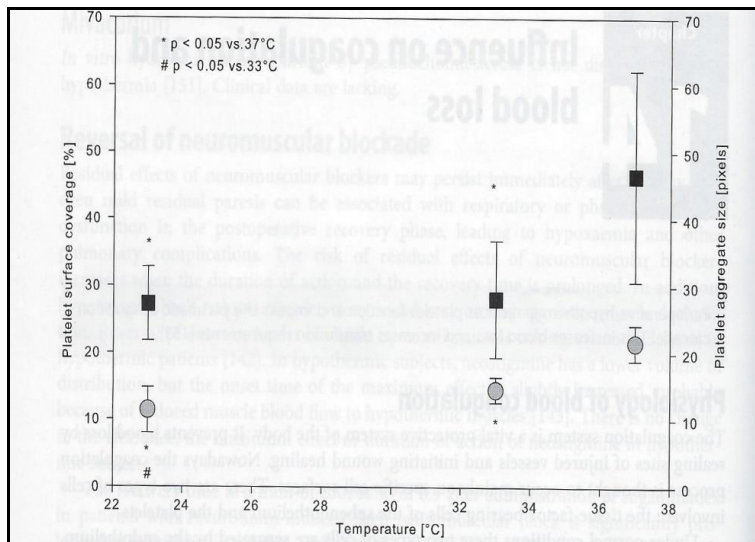


Slika 1. Histogram proteklog vremena do egzocitoze WPB

(Preuzeto iz: Hewitt L, Zupancic G, Mashanov G, et al. Temperature-dependence of Weibel-Palade body exocytosis and cell surface diseral of von Willebrand factor and its propolyptide. Plos One 2011; 6: e27314.)

Hipotermija takođe na nekoliko načina oštećuje i funkciju trombocita što se manifestuje smanjem agregacije i adhezije trombocita na površini (slika 2) (1). Dodatno, niska temperatura inhibira aktivaciju trombocita von Willebrandovim

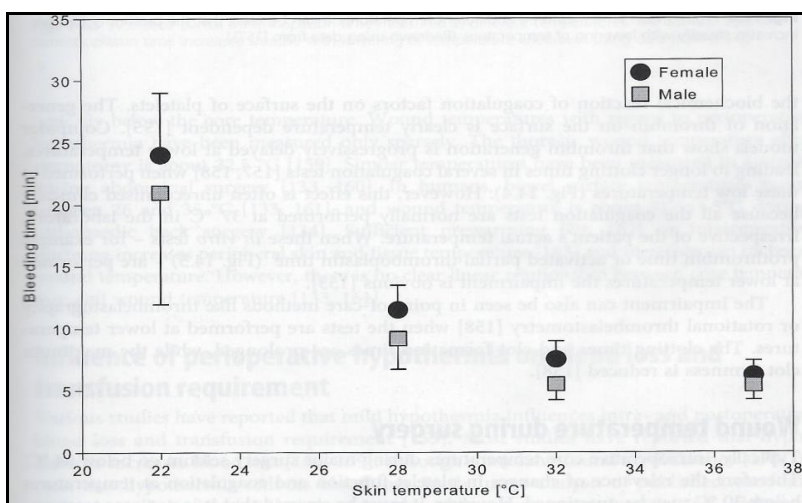
faktorom što dovodi do smanjenog stvaranja tromboksana A₂, koji je neophodan za formiranje početnog trombocitnog čepa. Čini se da blaga hipotermija ne umanjuje drugi način aktivacije trombocita, na primer s adenozin difosfatom (ADP) ili trombinom.



Slika 2. Pokrivenost površine aktiviranim trombocitima kao parametar agregacije trombocita pri različitim temperaturama

(Preuzeto iz: Wolberg AS, Meng ZH, Monroe DM III and Hoffman M. A systematic evaluation of the effect of temperature on coagulation enzym activityand platelet function. *J Trauma* 2004; **56**: 1221-1228.)

Rezultat svih ovih promena u funkciji trombocita je značajno povećava vreme krvarenja (jednostavan klinički test funkcije trombocita) i postaje klinički relevantno kod snižavanja temperature kože ili tokom hipotermije (slika 3) (4).



Slika 3. Vreme krvarenja nakon incizije kože pri različitim temperaturama kod volontera muškog i ženskog pola

(Preuzeto iz: Valeri CR, MacGregor H, Cassidz G, Tinnz R and Pompei F. Effects of temperature on bleeding time and clotting time in normal male and female volunteers. *Crit Care Med* 1995; **23**: 698-704).

Hipotermija takođe narušava koagulaciju u plazmi. Pri nižim temperaturama smanjuje se brzina hemijskih reakcija. Isto važi i za biohemijsku reakciju faktora koagulacije na površini trombocita. Takođe od temperature zavisi i stvaranje trombina na površini (1). Kompjuterski modeli pokazuju da se stvaranje trombina progresivno odlaže pri niskim temperaturama što dovodi do produžeg vremena zgrušavanja. To se uočava na testovima koji se obavljaju na niskim temperaturama (5). Svi testovi koagulacije se obično izvode u laboratoriji na 37 °C bez obzira na stvarnu temperaturu pacijenta pa je ovaj efekat često klinički neprepoznat. Oštećenje je očigledno kada se testovi kao što su protrombinsko vreme ili aktivno parcijalno trombotoplastinsko vreme izvode *in vitro* na nižim temperaturama.

Testovi tromboelastografije ili rotacione tromboelastometrije (point of care, monitoring koagulacije na licu mesta) kada se izvode na nižim temperaturama takođe pokazuju oštećenje. Produžena su vremena zgrušavanja i vremena formiranja ugruška i smanjena je maksimalna čvrstoća ugruška (6). Prilikom velike hirurške procedure u intraoperativnom periodu unutrašnja temperatura retko ide ispod 34 °C. Stoga se dovodi u pitanje relevantnost promena u funkciji trombocita i koagulacije pri temperaturi ispod 30 °C. Važno je napomenuti da unutrašnja temperatura nije odgovorna za koagulaciju već je presudna temperatura rane, jer je to mesto gde dolazi do gubitka krvi i koagulacije. Temperatura rane je obično niža od unutrašnje temperature i retko se meri u sklopu praćenja perioperativne hipotermije. Tako je, na primer, temperatura torakalne rane nakon sternotomije oko 32 °C, temperatura površine creva između 26 i 35 °C, a kod ortopedске hirurgije leđa temperatura rane je oko 31,5 ± 1,5 °C (7, 8, 9). Zagrevanjem pacijenata u preoperativnom (prewarming) i intraoperativnom periodu povećava se temperatura kože na periferiji i temperatura tkiva iako ne postoji jasna linearna veza između unutrašnje temperature i temperature

rane (8). U istraživanju koje je izvedeno na 30 pacijenata podvrgnutih ekstenzivnoj laparatomiji koja je trajala duže od tri sata uočeno je da je spljašnje zagrevanje pacijenta cirkulišućim toplim vazduhom najefikasnije u održavanju temperature kože (10).

Uticaj perioperativne hipotermije na gubitak krvi i potrebu za transfuzijom

Rezultati velikog broja studija pokazuju da hipotermija povećava klinički značajan gubitak krvi i povećava potrebu za transfuzijom (6). Međutim ima i studija koje izveštavaju da nije nađena razlika ili čak da hipotermija reducira gubitak krvi (11). U meta-analizi objavljenih, randomizovanih, kontrolisanih ispitivanja prosečan gubitak krvi je bio približno 16% veći kod hipotermičnih pacijenata. U istoj meta-analizi relativan rizik za transfuziju je bio oko 22 % veći u pacijenata koji su bili hipotermični (6). Uzimajući sve ove rezultate zajedno, dokazi pokazuju da hipotermija povećava gubitak krvi na klinički značajnom nivou.

Intraoperativno davanje krvi je povezano sa većim rizikom od komplikacija (pulmonalnih, septičnih, tromboembolijskih i vezanih za ranu) koje povećavaju rizik za smrtni ishod. Izbegavanje perioperativne hipotermije je deo savremene strategije upravljanja krvlju kod pacijenata.

Zaključak

Održavanje normotermije za vreme perioperativnog procesa smanjuje komplikacije vezane za hiruršku proceduru i intrahospitalni mortalitet. Smanjuje se potreba za nadoknadom krvi u perioperativnom periodu i izbegavaju se komplikacije koje mogu biti posledica transfuzije krvi.

Literatura

1. Wolberg AS, Meng ZH, Monroe DM III and Hoffman M. A systematic evaluation

- of the effect of temperature on coagulation enzyme activity and platelet function. *J Trauma* 2004; **56**: 1221-1228.
2. Brauer A. Influence on coagulation and blood loss. In: Perioperative Temperature Management, Cambridge University Press, 2017; 85-90
 3. Hewiett L, Zupancic G, Mashanov G, et al. Temperature-dependence of Weibel-Palade body exocytosis and cell surface disial of von Willebrand factor and its propolypeptide. *Plos One* 2011; **6**: e27314.
 4. Valeri CR, MacGregor H, Cassidz G, Tinnz R and Pompei F. Effects of temperature on bleeding time and clotting time in normal male and female volunteers. *Crit Care Med* 1995; **23**: 698-704.
 5. Dirkmann D, Hanke AA, Görlinger K and Peters J. Hypothermia and acidosis synergistically impair coagulation in human whole blood. *Anesth Analg* 2008; **106**: 1627-1632.
 6. Rajagopalan S, Mascha E and Sessler DI. The effect of mild perioperative hypothermia on blood loss and transfusion requirement. *Anesthesiology* 2008; **108**: 71-77.
 7. Frey JM, Sveiby HK, Svenarud PK and van der Linden JA. CO₂ insufflation influences the temperature of the open surgical wound. *Wound Repair Regen* 2010; **18**: 378-382.
 8. Frey JM, Janson M, Svanfeldt M, Svenarud PK and van Linden JA. Local Insufflation of warm humidified CO₂ increases open wound and core temperature during open colon surgery: a randomized clinical trial. *Anesth Analg* 2012; **115**: 1204-1211.
 9. Severens NM, Marken Lichtenbelt WD, Frijns AJ, et al. Temperature and surgical wound heat loss during ortopedic surgery: computer simulation and measurements. *Can J Anaesth* 2010; **57**: 381-382.
 10. Zeba S, Šurbatović M, Marjanović M, Jevđić J, Hajduković Z, Karkalić R, Jovanović D, Radaković S. Efficacy of external warming in attention of hypothermia in surgical patient. *Vojnosanitet Pregl* 2016; **73**: 566-571.
 11. Schmid H, Schiferer A, Sessler DI and Meznik C. The effects of red-cell scavenging, hemodilution, and active warming on allogeneic blood requirements in patients undergoing hip or knee arthroplasty. *Anesth Analg* 1998; **86**: 387-391.

Corresponding author: Doc.dr sc med. Snježana Zeba
Crnotravska 17
11000 Beograd
Email: snjezanazeba@hotmail.com
tel. + 381 64 9134491



IMUNOMONITORING FUNKCIJE MONOCITA I NEUTROFILA KOD KRITIČNO OBOLELIH PACIJENATA SA SEPSOM

Goran Rondović^{1,2}, Katarina Mladenović^{1,2}, Snježana Zeba^{1,2}

¹ *Klinika za anesteziologiju i intenzivnu terapiju, Vojnomedicinska akademija Beograd*

² *Medicinski fakultet Vojnomedicinske akademije Univerziteta odbrane u Beogradu*

Definicija sepse

Sepsa je životno ugrožavajuće stanje praćeno disfunkcijom organa. Nastaje kao posledica poremećene regulacije odgovora domaćina na infekciju. Ovu novu definiciju sepse donela nam je radna grupa European Society of Intensive Care Medicine - ESICM i Society of Critical Care Medicine-SCCM 2016-te godine i sada je poznata kao Sepsis-3 definicija (1)

Pojam sepse pominje se još u antičkim spisima iz perioda 300-te godine pre nove ere. Tada Hipokrat sepsom definiše proces truljenja mesa i oslobađanja gasa u močvarama ali i proces u kome inficirane rane postaju purulentne (2). Prošla su dva milenijuma do postavljanja prvih definicija sepse. Prvi konsenzus o definiciji sepse i standardizovanju terminologije sepse održan je tek 1992 godine i tada je uveden pojam sistemskog inflamatornog odgovora (systemic inflammatory response syndrome SIRS) (3). Već tada je postalo jasno da SIRS postoji i u drugim stanjima koja nisu u vezi sa infekcijom (npr. opekotine, pankreatitis i slično). Definirano je da je sepsa u sustini SIRS uzrokovan infekcijom. I da taj odgovor mora biti praćen sa dva ili više kliničkih znakova kako bi se postavila dijagnoza. Znaci su: srčana frekvenca > 90 otkucaja/min, respiratorna frekvenca > 20 udaha/min ili da su vrednosti parcijalnog pritiska ugljen dioksida (PaCO₂) manje od 32 mmHg, telesna temperatura veća od 38°C ili manja od 36°C, broj leukocita veći od 12000/ml ili manji od 4000/ml ili da je broj nezrelih neutrofila > 10% (3). Kako se SIRS često komplikuje disfunkcijom organa tada je definisan i sindrom multiple disfunkcije organa (multiple organ dysfunction syn-

drome - MODS). Kod kritično obolelih, po definiciji, postoji izmenjena funkcija organa tako da homeostaza ne može da se održi bez mera u jedinicama intenzivne terapije, kao što su mehanička ventilacija, vazoaktivna potpora kardiovaskularnom sistemu, različiti oblici hemodijalize i hemofiltracije. Kritično oboleli najčešće imaju disfunkciju najmanje dva organska sistema. U kombinaciji sepse i MODS-a nastao je i pojam teške sepse (3). Teška sepsa je praćena znacima hipoperfuzije ili hipotenzije, gde je hipoperfuzija organa izražena kroz laktatnu acidozu, oliguriju ili promenu mentalnog statusa. Multiorganska disfunkcija u sepsi predstavlja izmenjenu funkciju organa kod akutno obolelih čija se homeostaza ne može održati bez primene terapije. Ako se ovakvo stanje održava i uprkos terapiji nadoknadom volumena ne dovode do reverzije hipotenzije i organske hipoperfuzije, to stanje je označeno kao septični šok (3). Uprkos postojanju brojnih neslaganja i nedoslednosti u prvoj definiciji sepse sledeći konsenzus koji je održan 10 godina kasnije nije doveo do bitnije transformacije postojeće definicije⁴. Kriterijumi za dijagnozu sepse su prošireni i uveden je skor za tešku sepsu (Sequential [Sepsis-related] Organ Failure Assessment Score-SOFA) (4). Paralelno sa radom na definiciji sepse od 2002 godine pokrenuta je i kampanja za preživljavanje sepse (Surviving Sepsis Campaign) (5). Vodiči za zbrinjavanje teške sepse i septičnog šoka su objavljeni 2004 prvi put, a potom revidirani i objavljavani svake četvrte godine. Zajedno sa novom definicijom sepse (Sepsis 3), 2016 godine objavljene su i poslednje smernice za terapiju (1, 5, 6).

Nova definicija sepse, SEPSIS 3, prikazuje sepsu kao životno ugrožavajuću disfunkciju organa uzrokovanu poremećenom regulacijom odgovora domaćina na infekciju (1). Time je stavljen akcenat na imunoinflamatornu kaskadu sepse kao ključni momenat. Kako je sada termin disfunkcija organa već uključen u definiciju sepse, time je termin teška sepsa koji je ranije definisao ovo stanje postao suvišan. U poslednjoj definiciji sepse naglašeno je da disfunkcija organa može postojati i pre nastanka infekcije, kao i da neprepoznata infekcija može biti uzrok novonastale disfunkcije organa (7). Termin septički šok je zadržan u upotrebi, predstavlja perzistentnu hipotenziju kod koje je uprkos adekvatnoj nadoknadi volumena potrebna primena vazoaktivnih lekova kako bi se srednji arterijski pritisak održavao > 65 mmHg i njegov dijagnostički kriterijum je sada proširen sa povećanjem vrednosti serumskih laktata na > 2 mmol/l. Septički šok predstavlja stanje cirkulatornog, metaboličkog i celularnog poremećaja uzrokovanog sepsom u kome se mortalitet značajno povećava (7).

Dio Sepsis 3 definicije postao je i SOFA skor. Ovaj skor dodeljuje poene na osnovu patofizioloških promena u šest organskih sistema. Povećanje za 2 poena u totalnom skor ukazuje na disfunkciju organa (1, 6). I ukoliko je ta disfunkcija nastala uporedo sa infekcijom može se postaviti dijagnoza sepse. Definisan je i novi alat za brzu orijentaciju i rano prepoznavanje sepse. Označen je kao qSOFA (quick SOFA). Sastoji se samo od tri kriterijuma koji se analiziraju: izmena stanja svesti, respiratorna frekvencija $>$ od 22 udaha/minuti, sistolni pritisak < 100 mmHg. Ako su ispunjena dva dva od pomenuta tri kriterijuma postoji velika verovatnoća da je u pitanju disfunkciju organa pa pacijent treba da bude pod stalnim nadzorom (1, 6).

Imunopatofiziologija sepse

Postojanje patogena u telu domaćina aktivira imunski odgovor. Imunski odgovor se sastoji od urođene imunosti koja pred

stavlja rani ne-specifični odgovor i stečene imunosti označene kao patogen - specifični imunski odgovor ili kasni imunski odgovor (8). Bez obzira na poreklo stimulusa (infektivni ili ne-infektivni), inflamatorni odgovor domaćina je sličan. Receptori za prepoznavanje molekularnih obrazaca patogenih mikroorganizama (pattern recognition receptors - PRRs) nalaze se na površini ćelija urođenog imunskog odgovora kao što su makrofage, epitelne, endotelne i druge ćelije. Komponente ili delovi mikroorganizama koje prepoznaju receptori označeni su kao molekularni obrasci patogena PAMP (Pathogen-associated molecular pattern molecule) (9). Receptori na površinama ćelija urođene imunosti ne prepoznaju samo egzogene molekulske obrasce već i molekule oslobođene iz oštećenog tkiva označene kao alarmini¹⁰. U alarmine spadaju i molekularni obrasci oštećenja tkiva - DAMP (damage-associated molecular pattern molecule) (10). Inicijalna karika nastanka imunskog odgovora je vezivanje mikroorganizma za površinske (membranske) Toll-like receptore - TLR na imunokompetentnim ćelijama (8). Ligandi za TLR-2 receptore su antigeni ćelijskog zida Gram-pozitivnih bakterija (peptidoglikani, lipoteihoična kiselina) dok je ključni ligand za TLR-4 receptore lipopolisaharid tj. endotoksin Gram-negativnih bakterija (11). Aktiviranje ovih receptora inicira intracelularnu imunoinflamatornu kaskadu koja rezultuje oslobađanjem citokina (11). Aktivirani imunski odgovor može biti hiperinflamatoran, označava se i kao citokinska oluja, koji dovodi do multiple organske disfunkcije i smrti. Uporedo sa njim razvija se i anti-inflamatorni odgovor koji može dovesti do imunske paralize (8).

Makrofagi i polimorfonuklearne ćelije prisutne na mestu prodora infektivnog patogena su odgovorni za iniciranje primarnog odgovora domaćina i to fagocitozom i sledstvenim aktiviranjem i regrutovanjem polimorfonuklearnih granulocita i monocita. Ova aktivacija primarnih ćelija urođene imunosti ima za ishod već prethodno opisanim mehanizmom oslobađanje citokina (12). Citokini su potentni niskomolekularni pro

teini koje proizvode različite imunokompetentne ćelije i glavni su pozitivni i negativni regulatori imunoinflamatornog odgovora (12). Zavisno od njihove aktivnosti *in vivo*, u odnosu na vreme i lokaciju podeljeni su na tri klase citokina. Proinflamatorni citokini označeni i kao Th1 citokini, u ovoj grupi su TNF-alfa, IL-1, IL-8, HMGB-1 i drugi (12, 13). Nasuprot njima nalaze se anti-inflamatorni citokini označeni kao Th2 i u ovoj grupi su IL-4, IL-10, receptorski antagonista za IL-1 (IL-1ra), dok neki interleukini imaju izraženu i pro- i anti-inflamatornu aktivnost u zavisnosti od lokalne sredine u nidusu infekcije; primer je IL-6 (12). U trećoj grupi su citokini označeni kao Th17 koji se razlikuju od obe prethodne grupe. Citokini svoj efekat ostvaruju vezivanjem za receptore na ciljnim ćelijama. Svojim vezivanjem pokreću kaskadu događaja koja ima za ishod indukciju ili inhibiciju citokinima regulisane aktivnosti ciljnih imunokompetentnih ćelija, što rezultuje modulacijom ćelijske imunske aktivnosti (13).

Neutrofili i monociti kod kritično obolelih sa sepsom

Celularni odgovor organizma na prisustvo patogena ogleda se u aktivaciji brojnih ćelija. Ovdje dominiraju neutrofili i monociti. Neutrofili i monociti su ključne ćelije urođene imuniteta. Neutrofili su polimorfonuklearni (PMN) leukociti poreklom iz kostne srži i u perifernoj krvi se nalaze u zreloj formi (14). Glavni zadatak neutrofila je fagocitoza i uništavanje patogena. Neutrofili indukuju uklanjanje patogena fagocitozom, degranulacijom, ali i oslobađanjem intracelularnih komponenti kakve su DNK, histoni i litički proteini koji formiraju neutrofilne ekstracelularne mreže (NET) (15). Azot oksid (NO) je jedan od ključnih medijatora aktivnosti neutrofila (14, 15). Pored svoje fagocitne aktivnosti neutrofili na svojoj površini prezentuju brojne receptore za PAMP i DAMP. Aktivacijom receptora na površini neutrofila aktivira se signalni

proces koji rezultuje produkcijom inflamatornih medijatora (15). Medijatori inflamacije oslobodeni aktivacijom neutrofila amplifikuju inflamatorni proces i stimulišu migraciju neutrofila u ka mestu infekcije. Medijatori zaduženi za aktivaciju i privlačenje novih ćelija ka mestu infekcije označavaju se kao hemokini (16). Pripadaju grupi malih citokina. Neutrofili na svojoj površini exprimiraju CXCR1 i CXCR2 receptore u odgovoru na CXC hemokine (14, 16). U fiziološkim okolnostima neutrofili su u cirkulaciji prisutni nekoliko sati. Nastaju u kostnoj srži i nestaju procesom apoptoze unutar 24 sata od oslobađanja iz kostne srži. U sepsi, apoptoza neutrofila je odložena. Povećana je njihova produkcija i stvara se neutrofilija (14). Ipak, ovi neutrofili su narušene funkcionalnosti ispoljene u vidu smanjene hemotaktične aktivnosti, oslabljenog baktericidnog delovanja i sa izraženom produkcijom anti-inflamatornih medijatora, naročito IL-10 (13). Brojna istraživanja su pokazala da nedovoljan broj neutrofila kao i neefikasna migracija ka mestu infekcije dovode do slabe i neadekvatne kontrole infekcije lokalno. Tada infekcija napreduje i širi se sistemskom cirkulacijom, što je praćeno povećanim mortalitetom (13). Brojni su mehanizmi koji dovode do insuficijentne neutrofilne migracije. Jedan od mehanizama je internalizacija CXCR2 receptora na površini neutrofila (17). Neutrofili sa internalizovanim CXCR2 receptorima su izolovani iz cirkulišuće krvi eksperimentalnih životinja ali i pacijenata obolelih od sepse. Dok u procesu migracije neutrofila internalizacija CXCR2 receptora inhibira njihovu migraciju, sa druge strane receptori tipa CCR2 su medijatori migracije neutrofila u vitalne organe (17). Tokom sepse inflamatorni odgovor vodi ka aktivaciji neutrofila sekvestiranih u kapilarno korito, koji potom okludiraju lumen kapilara (14). Aktivirani neutrofili u vitalnim organima ne samo da okludiraju lumen krvnog suda već, stimulirani hemokinima, migriraju u tkiva i organe gde oslobađaju inflamatorne medijatore i

litičke enzime i indukuju oštećenje organa sa sledstvenom multiplom organskom disfunkcijom (14). Patohistološka ispitivanja tkiva pacijenata preminulih od sepsa pokazala su značajno prisustvo neutrofila u tkivu pluća i bubrega. Intenzitet akutnog respiratornog distresa u septičnih pacijenata je proporcionalan intenzitetu inflamatorne infiltracije i kvantitetu proteolitičkih enzima u bronhoalveolarnom lavatu (14).

Istraživanja su pokazala da jedan od važnih uzroka imunosupresije u sepsi može biti disfunkcionalan ćelijski urođeni imunski odgovor. Funkcionalna sposobnost neutrofila i monocita na mestu infekcije može se procenjivati ekspresijom različitih receptorskih molekula na površini ćelije. Kod kritično obolelih sa sepsom, disfunkcija organa je u značajnom stepenu posledica dejstva neutrofila. Cluster of Differentiation (CD)64 je integralni membranski glikoprotein poznat kao [Fc](#) receptor koji ima veliki afinitet za vezivanje monomera IgG antitela. Njegova konstitutivna ekspresija na neutrofilima u stanju mirovanja je zanemarljiva, pa može poslužiti kao dijagnostički marker infekcije kada su neutrofili aktivirani. Intenzitet ekspresije CD64 pokazuje stepen aktivacije neutrofila i može korelirati sa težinom i ishodom kod kritično obolelih sa sekundarnom sepsom (18 – 20).

Monociti su ćelije prve linije odbrane urođenog imunskog odgovora. Prekursor monocita se nalazi u kostnoj srži gde podleže procesu diferencijacije i sazreva preko promonocita u zrele monocite kada i prelazi u perifernu cirkulaciju (21). Nakon jednog do tri dana migriraju ka tkivu i organima gde se diferencijuju u makrofage i dendritične ćelije. Brojne su imunske uloge monocita i makrofaga. Obavljaju uspešnu fagocitozu ali i prezentaciju antigena na svojoj površini (22). Monociti povezuju urođeni i stečni imunski odgovor i predstavljaju jednu od ključnih ćelijskih linija u sepsi. U stanju imunosupresije indukovane sepsom, ove ćelije prolaze kroz izražene promene fagocitne aktivnosti, citokinskog profila ka

Th2 anti-inflamatornom fenotipu a naročito je značajno smanjenje ekspresije molekula humanog leukocitnog antigena (HLA)-DR (D related) na površini monocita (mHLA-DR). Smanjena ekspresija mHLA-DR bi mogla reflektovati deaktivaciju monocita kod kritično obolelih sa sepsom i biti nezavisno povezana sa pojavom nozokomijalnih infekcija i smrtnim ishodom (23, 24). Ovaj indikator funkcije monocita i imunosupresije u poslenje vreme postao je veoma značajan kod pacijenata sa teškom traumom, koju prati prolazna imunosupresija, u cilju detektovanja imunskog statusa i verovatnoće razvoja sekundarnih infekcija (25). Monociti pacijanata u sepsi pokazuju i smanjenu ekspresiju HLA-DR antigena i time doprinose povećanju incidence nozokomijalnih infekcija. Smanjena ekspresija HLA-DR antigena na monocitima korelira sa anti-inflamatornim odgovorom u pacijenata sa septičkim šokom; snižena vrednost ekspresije HLA-DR antigena u direktnoj je vezi sa povećanjem mortaliteta u ovih pacijenata (13, 22).

Dakle, delovanje monocita je regulisano brojnim receptorima eksprimiranim na njihovoj površini: CD14 receptori za bakterijski lipopolisaharid, CD163 receptori za uklanjanje membranskih fragmenata oštećenih ćelija kao i drugi brojni receptori (26). Na osnovu prisustva receptora na površini, monociti se dele na tri podgrupe. Klasični monociti koji na svojoj površini prikazuju značajno veći broj CD14 receptora bez prikazivanja CD16 receptora; intermedijerni monociti uz CD14 prikazuju i CD16 receptore, njihov broj se značajno povećava pod dejstvom citokinske stimulacije; treću grupu čine ne-klasični monociti sa dominantnijim prikazivanjem CD16 receptora u odnosu na CD14 receptore (22). Ovi poslednji se nekada označavaju i kao proinflamatorni monociti. Mukherjee i saradnici su u svojim istraživanjima pokazali da klasični monociti imaju izraženu fagocitnu aktivnost bez inflamatorne aktivnosti, dok ne-klasični monociti ispoljavaju, nakon citokinske stim

ulacije, inflamatornu aktivnost i antigen prezentujuću aktivnost (22, 26). Ispitivanjem RNK potvrđeno je da postoji više podtipova monocita, tačnije 6 podtipova dendritičnih ćelija i 4 podtipa monocita. Jedan od mehanizama imunosupresije u sepsi je i poremećaj funkcije monocita, posebno makrofaga. Entitet poznat kao endotoksinska tolerancija nastaje kada je suprimirana produkcija proinflamatornih citokina kao što su TNF-alfa, IL-1beta i IL-6 od strane monocita. Merenjem endotoksinom indukovane monocitne aktivnosti utvrđeno je da je smanjeno stvaranje citokina u monocitima prisutno u pacijenata sa postoperativnom sepsom (13). Nova istraživanja funkcionalne sposobnosti monocita fokusirala su se na ekspresiju CD274, koji je sada poznat kao deo programirane smrti ćelija – programmed cell death 1 (PD1) i programmed cell death ligand 1 (PD-L1 tj. CD274). PD-L1 je deo sistema dva ko-inhibitorna molekula koji učestvuju u imunosupresiji idukovanoj sepsom. Od svih molekula vezanih za programiranu smrt ćelija, PD-L1 se pokazao najboljim prediktorom težine i ishoda kritično obolelih sa sepsom (27) a nedavno je objavljeno istraživanje predikcije infektivnih komplikacija kod pacijenata sa akutnim pankreatitisom utvrđivanjem ekspresije PD-L1 na monocitima (28).

U tretmanu kritično obolelih pacijenata sa sepsom od presudnog značaja je brzo postavljanje sumnje na postojanje teške infekcije ali i otkrivanje pacijenata pod visokim rizikom od smrtnog ishoda. Postoji širok spektar biomarkera koji se upotrebljavaju za prognoziranje ishoda sepse ali gotovo ni jedan se ne može svrstati u najpouzdanije biomarkere (21). U poslednjih nekoliko godina poraslo je interesovanje za ispitivanje broja monocita i neutrofila i njihovog odnosa prema drugim ćelijama u cilju prognoziranja ishoda i utvrđivanja težine kliničke slike sepse. Jedna od studija koja se bavila ovim odnosom je sprovedena u Vojnomedicinskoj akademiji sa ciljem da utvrdi značaj odnosa monocita prema limfocitima – MLR, neutrofila prema lim

focitima - NLR, ali i trombocita prema limfocitima - PLR kao volumena trombocita prema broju trombocita - MPV/PC u predikciji ishoda i vrste bakterijemije u kritično obolelih i traumatizovanih pacijenata. Istraživanje je pokazalo da su NLR i MPV veoma dobri nezavisni prediktori letalnog ishoda (21).

U kritično obolelih sa sekundarnom sepsom koja je najčešće komplikacija teškog akutnog pankreatitisa, peritonitisa i traume pokreće se kompleksan imunski odgovor koji se, kao što je navedeno, često karakteriše disfunkcijom neutrofila i monocita, ključnih ćelija urođenog imunskog odgovora (29). Kod nekih bolesnika postoji predominacija antinflatarnog odgovora ili čak globalno smanjenje produkcije gotovo svih citokina. Poseban problem u lečenju kritično obolelih sa sepsom predstavlja činjenica da veliki broj njih veoma dugo boravi u jedinici intenzivne terapije sa disfunkcijom različitih organa, praktično u stanju hronične kritične bolesti. Njihov klinički tok se karakteriše veoma izraženim i upornim proteinskim katabolizmom sa lošim nutritivnim statusom, lošim zarastanjem rana, imunosupresijom i rekurentnim infekcijama. Zbog toga je predložen poseban entitet, odnosno novi sindrom perzistentne inflamacije-imunosupresije i katabolizma (persistent inflammation-immunosuppression catabolism syndrome - PICS) (8, 30). Studija Bamera i saradnika pokazala je da kod bolesnika koji su umrli od sepse postoje biohemijski, imunohistohemijski i fenotipski znaci koji ukazuju na imunosupresiju (31). U ovih bolesnika postojali su fokusi bakterijskih infekcija koji su se održavali uprkos antimikrobonoj terapiji, kao i reaktivacija latentnih virusnih infekcija. Razlozi nastale imunosupresije kod ovih bolesnika sa sepsom i dalje nisu razjašnjeni.

Veliki značaj za imunski odgovor ima vrsta mikroorganizma koji inicira imunoinflamatornu kaskadu (32). Membranski vezan CD14 je ko-receptor urođenog imunskog odgovora za različite bakterijske komponente: lipopolisaharid, peptidoglikan i

lipoteihoičnu kiselinu. CD14 se nalazi na površini monocita i Kupferovih ćelija jetre i funkcionalno je u interakciji i sa Gram-pozitivnim i sa Gram-negativnim bakterijama. Pripada familiji receptora koji prepoznaju molekulske šablone bakterija (pattern recognition receptor – PRR). Istraživanja su pokazala da postoji asocijacija između polimorfizma gena koji kodiraju CD14 i vrste mikroorganizama koji je izazvao infekciju kod kritično obolelih (33). U terapijskim pokušajima ublažavanja imunoinflamatorne kaskade u sepsi, između ostalog, ispitivana je mogućnost inhibicije PRR, a posebno TLR-4 i TLR-2. Pošto to nije dalo zadovoljavajuće rezultate, istraživači su nedavno pokušali inhibiciju CD14 (34) što je dalo bolje rezultate. Veoma je interesantno pitanje povezanosti nivoa ekspresije CD14 sa težinom i ishodom kod kritično obolelih sa sekundarnom sepsom, kao i sa vrstom bakterijskog prouzrokača.

Zaključak

Uprkos brojnim istraživanjima i studijama koje se sprovode, sepsa i dalje predstavlja veliki izazov kako za kliničare tako i za istraživače. Mnoga istraživanja nisu dala očekivane rezultate u smislu poboljšanja terapijskog protokola i smanjenja mortaliteta. Jedan od glavnih razloga je činjenica da je populacija sa sepsom vrlo heterogena i da postoje podgrupe sa specifičnim kliničkim fenotipovima. Uloga neutrofila i monocita u primarnom odgovoru urođenog imuniteta je od velikog značaja. Pogoršanje njihove funkcije direktno rezultira gubitkom migratorne sposobnosti neutrofila ili predominacijom anti-inflamatorne aktivnosti monocita čime se šanse za preživljavanje smanjuju.

U današnje vreme sve je više argumenata da većina bolesnika sa sepsom ne umire zbog neregulisanog, prekomernog proinflamatornog odgovora, već podležu bolesti zbog nastanka stanja imunosupresije. Iako kontrola infekcije i suportivna terapija

do daljeg ostaju glavni terapijski pravac u ranim fazama sepse, postoji rastući trend prema imunomodulaciji kod bolesnika sa sepsom u kojih je nastupila imunosupresija. Po pitanju već opisanog aktivacionog statusa neutrofila i monocita kod kritično obolelih sa sepsom u literaturi postoje različiti podaci pa je zbog toga ovo aktuelan fokus istraživanja. Koliko je ovo značajan problem pokazuje i činjenica da je u novu definiciju sepse (SEPSIS-3) iz 2016. godine uveden termin disregulacija imunskog odgovora gde se sepsa definiše kao životno ugrožavajuća disfunkcija organa prouzrokovana disregulacijom odgovora domaćina na infekciju. Ovaj problem je kompleksan jer postoji podgrupa pacijenata sa sepsom kod kojih dominira proinflamatorni imunski odgovor kao i veći deo pacijenata kod kojih se disregulacija imunskog odgovora manifestuje imunosupresijom. Da bi se ove dve kategorije pacijenata sa sepsom razlikovale, neopodan je monitoring imunskog fenotipa svakog pojedinačnog pacijenta što bi pomoglo željenom individualnom terapijskom pristupu imunomodulaciji (35). Uloga ekspresije membranskih molekula na neutrofilima i monocitima u sepsi i dalje nije do kraja razjašnjena i predmet istraživanja. Precizno određivanje njihove uloge u sepsi omogućilo bi dodatne dijagnostičke i prognostičke parametre i, još važnije, moguću manipulaciju njihovim pro- ili anti-inflamatornim dejstvima. Neohodna su nova istraživanja koja bi se fokusirala na identifikaciju novih terapijskih postupaka usmerenih na mehanizme imunosupresije i mogućnost imunomodulacije.

Literatura

1. Singer M, Deutschman CS, Seymour CW, et al. The Third International Consensus Definitions for Sepsis and Septic Shock (Sepsis-3). JAMA 2016; 315(8):801-810.
2. Berg D, Gerlach H. Recent advances in understanding and managing sepsis. F1000Res 2018; 7: F1000 Faculty Rev-1570.

3. Bone RC, Balk RA, Cerra FB, et al. : Definitions for sepsis and organ failure and guidelines for the use of innovative therapies in sepsis. The ACCP/SCCM Consensus Conference Committee. American College of Chest Physicians/Society of Critical Care Medicine. *Chest* 1992; 101(6):1644–55.
4. Levy MM, Fink MP, Marshall JC, et al. : 2001 SCCM/ESICM/ACCP/ATS/SIS International Sepsis Definitions Conference. *Crit Care Med* 2003; 31(4):1250–6.
5. Dellinger RP, Carlet JM, Masur H, et al. Surviving Sepsis Campaign guidelines for management of severe sepsis and septic shock. *Intensive Care Med* 2004; 30(4):536–555.
6. Rhodes A, Evans LE, Alhazzani W, et al. Surviving Sepsis Campaign: International Guidelines for Management of Sepsis and Septic Shock: 2016. *Crit Care Med* 2017; 45(3):486–552.
7. Seymour CW, Liu VX, Iwashyna TJ, et al. Assessment of Clinical Criteria for Sepsis: For the Third International Consensus Definitions for Sepsis and Septic Shock (Sepsis-3). *JAMA* 2016; 315(8):762–774.
8. Surbatovic M, Veljovic M, Jevdjic J, Popovic N, Djordjevic D, Radakovic S. Immunoinflammatory response in critically ill patients: severe sepsis and/or trauma. *Mediators Inflamm* 2013; 2013:362793
9. Nduka O. and Parrillo J. The pathophysiology of septic shock. *Critical Care Clinics* 2009; 25: 677–702.
10. Klune J, Dhupar R, Cardinal J, Billiar T, and Tsung A. HMGB1: endogenous danger signaling. *Mol Med* 2008; 14 (7-8): 476–484.
11. Opal SM. The host response to endotoxin, antilipopolysaccharide strategies, and the management of severe sepsis. *Int J Med Microbiol* 2007; 297(5):365–377.
12. Djordjevic D, Surbatovic M, Ugrinovic D, et al. New aspects of sepsis pathophysiology in critically ill. *Vojnosanit Pregl* 2012; 69:58–68.
13. Hotchkiss RS, Monneret G, Payen D. Immunosuppression in sepsis: a novel understanding of the disorder and a new therapeutic approach. *Lancet Infect Dis* 2013; 13(3):260–268
14. Sônego F, Castanheira FV, Ferreira RG, et al. Paradoxical Roles of the Neutrophil in Sepsis: Protective and Deleterious. *Front Immunol* 2016; 7:155.
15. Kolaczowska E, Kubes P. Neutrophil recruitment and function in health and inflammation. *Nat Rev Immunol* 2013; 13:159–75.
16. Nathan C. Neutrophils and immunity: challenges and opportunities. *Nat Rev Immunol* 2006; 6:173–82.
17. Rios-Santos F, Alves-Filho JC, Souto FO, Spiller F, Freitas A, Lotufo CM, et al. Down-regulation of CXCR2 on neutrophils in severe sepsis is mediated by inducible nitric oxide synthase-derived nitric oxide. *Am J Respir Crit Care Med* 2007; 175:490–7.
18. Djordjevic D, Pejovic J, Surbatovic M, et al. Prognostic value and daily trend of interleukin-6, neutrophil CD64 expression, C-reactive protein and lipopolysaccharide-binding protein in critically ill patients: reliable predictors of outcome or not? *J Med Biochem* 2015; 34(4):431–9
19. Wang X, Li ZY, Zeng L, et al. Neutrophil CD64 expression as diagnostic marker for sepsis in adult patients: a meta-analysis. *Crit Care* 2015; 19:245
20. Hassan U, Ghonge T, Reddy Jr B, et al. A point-of-care microfluidic biochip for quantification of CD64 expression from whole blood for sepsis stratification. *Nat Commun* 2017; 8:15949
21. Djordjevic D, Rondovic G, Surbatovic M, Stanojevic I, Udovicic I, Andjelic T, Zeba S, et al. Neutrophil-to-Lymphocyte Ratio, Monocyte-to-Lymphocyte Ratio, Platelet-to-Lymphocyte Ratio, and Mean Platelet Volume-to-Platelet Count Ratio as Biomarkers in Critically Ill and Injured Patients: Which Ratio to Choose to Pre

- dict Outcome and Nature of Bacteremia? Mediators Inflamm 2018; 2018:3758068.
22. Guillemins M, Ginhoux F, Jakubzick C. Dendritic cells, monocytes and macrophages: a unified nomenclature based on ontogeny. Nat Rev Immunol 2014; 14(8):571–578.
 23. Landelle C, Lepape A, Voirin N, et al. Low monocyte human leukocyte antigen-DR is independently associated with nosocomial infections after septic shock. Intensive Care Med 2010; 36:1859-1866
 24. Drewry AM, Ablordepey EA, Murray ET, et al. Comparison of monocyte human leukocyte antigen-DR expression and stimulated tumor necrosis factor alpha production as outcome predictors in severe sepsis: a prospective observational study. Crit Care 2016; 20:334
 25. Gouel-Cheron A, Allaouchiche B, Flocard B, et al. Early daily mHLA-DR monitoring predicts forthcoming sepsis in severe trauma patients. Intensive Care Med 2015; 41:2229-2230
 26. Paunel-Görgülü A, Kirichevska T, Lögters T, Windolf J, Flohé S. Molecular mechanisms underlying delayed apoptosis in neutrophils from multiple trauma patients with and without sepsis. Mol Med 2012; 18:325–335
 27. Shao R, Fang Y, Yu H, et al. Monocyte programmed death ligand-1 expression after 3-4 days of sepsis is associated with risk stratification and mortality in septic patients: a prospective cohort study. Crit Care 2016; 20:124
 28. Pan T, Zhou T, Li L, et al. Monocyte programmed death ligand-1 expression is an early marker for predicting infectious complications in acute pancreatitis. Crit Care 2017; 21:186
 29. Monneret G, Venet F. Sepsis-induced immune alterations monitoring by flow cytometry as a promising tool for individualized therapy. Cytometry Part B 2016; 93B:376-386
 30. Gentile LF, Cuenca AG, Efron PA, et al. Persistent inflammation and immunosuppression: A common syndrome and new horizon for surgical intensive care. J Trauma Acute Care Surg 2012; 72(6):1491-1501
 31. Boomer JS, To K, Chang C, et al. Immunosuppression in patients who die of sepsis and multiple organ failure. JAMA 2011; 306 (23):2594–605
 32. Surbatovic M, Popovic N, Vojvodic D, Milosevic I, Acimovic G, Stojicic M, Veljovic M, Jevdjic J, Djordjevic D, Radakovic S. Cytokine profile in severe Gram-positive and Gram-negative abdominal sepsis. Sci Rep 2015; 5: 11355
 33. Surbatovic M, Grujic K, Cikota B, et al. Polymorphisms of genes encoding tumor necrosis factor-alpha, interleukin-10, cluster of differentiation-14 and interleukin-1ra in critically ill patients. J Crit Care 2010; 5:542.e1-8
 34. Gustavsen A, Nymo S, Landsem A, et al. Combined inhibition of complement and CD14 attenuates bacteria induced inflammation in human whole blood more efficiently than antagonizing the Toll-like receptor 4-MD2 Complex. J Infect Dis 2016; 214:140-150
 35. Pickkers P, Kox M. Towards precision medicine for sepsis patients. Crit Care 2017; 21:11

ASS dr Goran Rondović
Crnotravska 17
11000 Beograd
Email: grondovic@gmail.com
tel.+ 381 64 2373399

TRANSKRANIJALNA STIMULACIJA ELEKTRIČNOM STRUJOM (tSJS) KAO ADJUVANTNA METODA U TERAPIJI AKUTNOG POSTOPERATIVNOG BOLA

Katarina Mladenović^{1,2}, Goran Rondović^{1,2}, Snježana Zeba^{1,2}

¹ *Klinika za anesteziologiju i intenzivnu terapiju, Vojnomedicinska akademija Beograd*

² *Medicinski fakultet Vojnomedicinske akademije Univerziteta odbrane u Beogradu*

Sažetak

Neadekvatna terapija postoperativnog bola ima brojne patofiziološke posledice: kardiovaskularne, respiratorne, gastrointestinalne, endokrine, metabičke, muskulo-skeletne, imunološke. Ukoliko se akutni postoperativni bol ne leči blagovremeno, povećavaju se morbiditet i mortalitet pacijenata, produžava se postoperativni oporavak, odlaže se otpuštanje iz bolnice i povećavaju se troškovi lečenja. Jedna od najozbiljnijih posledica je između ostalog i razvitak hroničnog bola, koji predstavlja poseban izazov za lečenje. Najčešći način lečenja akutnog postoperativnog bola je putem farmakoloških metoda, bilo putem sistemskog davanja lekova, bilo putem različitih regionalnih tehnika. U poslednje vreme, međutim, veliku primenu nalaze nefarmakološke metode. TSJS kao jedna od tehnika neuromodulacije, do sada je više korišćena u terapiji hroničnih bolnih sindroma. U poslednje vreme ima sve veću primenu i u lečenju akutnog postoperativnog bola, jer je neinvazivna i bezbedna po pacijenta.

Ključne reči: bol, opiodi, neuromodulacija

Uvod

Prema definiciji Međunarodnog Udruženja za Proučavanje Bola (*IASP-International Association of Study of Pain*), bol predstavlja neprijatno senzorno ili emocionalno iskustvo udruženo sa aktuelnim ili potencijalnim oštećenjem tkiva, ili opisano u smislu takvog oštećenja.¹

Akutni bol nastaje povredom, tj. oštećenjem tkiva. On ima jasan, dobro definisan početak. Njegova uloga je zaštitna, tj. trebalo bi da omogući organizmu da se ukloni od izvora bola. Akutni bol traje kraće od 12 nedelja, a najvažnija komponenta mu je nociceptivno prenošenje bolnih impulsa, kod koga postoji linearan odnos između intenziteta bolne draži i odgovora na bol.² Odlikuje se visokim pragom nadražljivosti, traje koliko i zarastanje rana i obično dobro reaguje na analgetike i antiinflamatorne lekove.

Akutni bol ima inflamatornu komponentu,

za čiji je nastanak odgovoran mehanizam periferne senzitivizacije. Neadekvatno lečenje akutnog bola vrlo često ima za posledicu nastanak hroničnog bola, za čiji je nastanak, između ostalog odgovoran mehanizam centralne senzitivizacije.³

Definicija akutnog postoperativnog bola

Akutni postoperativni bol se smatra oblikom akutnog bola nastalog usled hirurške traume, koji je praćen inflamatornom reakcijom i započetim aferentnim neuronskim pražnjenjem. To je kombinacija nekoliko neprijatnih senzornih, emocionalnih i mentalnih iskustava koja su precipitirana hirurškom traumom i udružena sa autonomnim, endokrino-metaboličkim, fiziološkim i poremećajima u ponašanju.

Svaka hirurška intervencija podrazumeva povredu tkiva koja dovodi do određenih

promena u perifernom i centralnom nervnom sistemu. Incizija i trakcija tkiva u toku hirurške intervencije dovode do aktivacije nociceptora koji predstavljaju periferne nervne završetke A δ i C vlakana.⁴ Medijatori zapaljenskog procesa oslobođeni iz povređenih tkiva kao što su histamin, bradikinin, serotonin, citokini i drugi redukuju prag nadražljivosti nociceptora i direktnog nadražaja nociceptora i započinju process periferne senzitivizacije.⁵

Ponovljeni bolni nadražaj prilikom akutne povrede tkiva u toku hirurškog zahvata dovodi do fenomena "vihora" (*"wind-up phenomenon"*), kao komponente centralne senzitivizacije koji vremenski prevazilazi provokativni nadražaj.⁶

Posledice nelečenog akutnog postoperativnog bola

Neadekvatna kontrola akutnog bola nakon operacije može imati brojne kliničke implikacije, kao što su: endokrine (hiperglikemija i povećano oslobađanje hormona stresa), hiperkoagulabilnost (povećana verovatnoća nastanka tromboembolije), respiratorne (otežan kašalj i iskašljavanje sa mogućnošću nastanka atelektaze), kardiovaskularne (hipertenzija, tahikardija i miokardna ishemija) i imunološke (veća verovatnoća nastanka infekcije i otežano zarastanje rana), odložene mobilizacije pacijenata, produžavanja boravka u bolnici, povećanja troškova lečenja i do opšteg nezadovoljstva pacijenata načinom lečenja. (Tabela 1).

Tabela 1.

Patofiziološke posledice bola

Kardiovaskularni sistem	Tahikardija, hipertenzija, povećana sistemska vaskularna rezistencija, povećan srčani rad
Respiratorni sistem	Hipoksija, hiperkapnija, atelektaza; smanjen kašalj, snižen vitalni kapacitet (VC), snižen funkcionalni rezidualni kapacitet (FRC), poremećen ventilaciono-perfuzioni odnos
Gastrointestinalni sistem	Muka, povraćanje, ileus
Urogenitalni sistem	Oligurija, urinarna retencija
Muskuloskeletni sistem	Skeletno-mišićni bol, smanjena pokretljivost, gubitak mišićne snage, gubitak mišićne mase
Koagulacioni sistem	Pojačana agregacija trombocita i hiperkoagulabilnost, smanjeno oslobađanje antitrombina III, povećano oslobađanje faktora VIII i von Willebrandovog faktora, inhibicija fibrinolize putem pojačanog oslobađanja infibitora aktivacije plazminogena venske staza, tromboembolija, odložena mobilizacija. ⁸
Endokrini sistem	Vagalna inhibicija, povećana adrenergička aktivnost, povećan metabolizam, povećana potrošnja kiseonika, oslobađanje hormona stresa (noradrenalin, adrenalin, kortizol, glukagon, antidiuretičkog hormon, tromboksan A ₂) smanjeno izlučivanje insulina, pojačana insulinska rezistencija ⁹
Centralni nervni sistem	Anksioznost, strah, pospanost, malaksalost, kognitivni deficit, poremećaj sna
Imunološki sistem	Imunosupresija, oslobađanje proinflamatornih citokina, azot – monoksida, derivata arahidonske kiseline, aktivacija neutrofila i makrofaga sa oslobađanjem TNF, otežano zarastanje rana, sklonost infekcijama. ¹⁰

Materijal i metode

Ovaj revijalni rad je osmišljen tako da bude narativni; sistemska evaluacija ranijih radova koja se tiče terapije akutnog postoperativnog bola uopšte; sistemska evaluacija novijih radova koji se tiču neuromodulacije kao dodatne metode lečenja postoperativnog bola i njenog veoma važnog segmenta transkranijalne stimulacije električnom strujom (tSJS).

Pretražili smo PubMed za abstrakte na engleskom jeziku, koristeći termine „terapija akutnog postoperativnog bola“, „neuromodulacija“, „transkranijalna stimulacija električnom strujom“, od 1970. do danas. Bitali smo revijalne radove, otvorene i slepe studije, kao i meta-analize.

Budući da se kod dece još mnogo faktora mora uzeti u obzir, ona nisu bila predmet ovog rada.

Usled obimnosti rada, neka važna pitanja koja bi se mogle ticati terapije akutnog postoperativnog bola (skale za procenu inteziteta bola, unidimenzionalne i multidimenzionalne), su izostavljena.

Princip multimodalnosti

Multimodalna analgezija koja kombinuje analgetike različitih klasa i različite analgetske tehnike sa različitim mehanizmima dejstva, preporučuje se u tretiranju akutnog postoperativnog bola zbog sinergizma tih dejstava, što dovodi do maksimalnog olakšanja bola pri minimalnim dozama lekova, u isto vreme smanjujući verovatnoću neželjenih dejstava lekova.¹¹ Multimodalna analgezija podrazumeva korišćenje farmakoloških i nefarmakoloških metoda u terapiji akutnog postoperativnog bola.

Farmakološka terapija akutnog postoperativnog bola

Od lekova se najčešće koriste lokalni anestetici i opiodi, ponaosob ili u kombinaciji, sistemski, regionalno ili lokalno. Da

bi se ostvario maksimalan analgetski efekat, kombinuju se analgetici sa različitim mehanizmima delovanja. Na taj način se postiže sinergizam analgetskog delovanja, a smanjuju se neželjeni efekti.

Opioidi su stub terapije srednjeg i teškog postoperativnog bola. Mogu se davati izolovano, ali se najčešće kombinuju sa drugim modalitetima analgezije. U pogledu sistemskog davanja, najčešće se kombinuju sa NSAIL. Putevi primene su vrlo različiti, međutim, ukoliko se očekuje višesatno trajanje bola i ukoliko pacijent nije u stanju da uzima lekove *per os*, preporučuje se parenteralno davanje. Takođe, kod intramuskularnog davanja lekova, nesigurni su stepen i brzina apsorpcije leka, a prema tome i vreme koje je neophodno da prođe do početka analgetskog dejstva, pa se zato preporučuje intravensko davanje.

Nefarmakološke metode

Dok farmakološka terapija bola utiče na somatsku (fiziološku i emocionalnu) dimenziju bola, dotle nefarmakološke tehnike deluju na afektivnu, kognitivnu, bihejvioralnu i socijalno-kulturnu dimenziju bola. Ove tehnike se koriste kao adjuvantne ili komplementarne kod srednjeg ili visokog intenziteta bola.¹²

Nefarmakološke metode:

- Povećavaju individualni osećaj kontrole bola
- Smanjuju osećaj slabosti
- Povećavaju aktivnost i funkcionalni kapacitet
- Smanjuju stres i anksioznost
- Smanjuju fokusiranost pacijenta na bol
- Smanjuju potrebu za analgeticima, na taj način smanjujući i njihove neželjene efekte.

Nefarmakološke metode koje se koriste u terapiji bola, pa i postoperativnog bola se mogu klasifikovati na različite načine. Uopšteno govoreći, dele se na fizičke, kog

nitivne, bihevioralne i druge komplementarne metode ili na invazivne ili neinvazivne metode. Meditacija, relaksacija, sanjanje, ritmičko disanje, biofeedback, ritmičko dodirivanje, transkutana električna nervna stimulacija (TENS), hipnoza, muzikoterapija, akupresura i terapija toplotom/hladnoćom, spadaju u neinvazivne metode.

Neuromodulacija

Tehnike neuromodulacije predstavljaju adjuvantnu nefarmakološku metodu u terapiji bola u usponu. Prema definiciji Međunarodnog udruženja za neuromodulaciju (*International Neuromodulation Society- INS*), neuromodulacija predstavlja „promenu nervne aktivnosti putem ciljane isporuke stimulusa, kao što su električna stimulacija ili hemijski agensi, na specifična mesta nervnog sistema na telu“. ¹³ Sprovodi se u cilju normalizacije ili modulacije funkcije nervnog tkiva.

Neuromodulacija, bilo da se radi o električnoj ili magnetnoj, evocira prirodni biološki odgovor organizma putem stimulacije aktivnosti nervnih ćelija, što opet dovodi do toga da populacije nerava oslobađaju neurotransmitere poput dopamina ili druge hemijske supstance poput peptida substance P, koji zatim regulišu ekscitabilnost i obrasce okidanja impulsa u neuronskim krugovima. Verovatno postoji i direktan neurofiziološki efekat na membranu neurona kao mehanizam dejstva interakcije električne struje i neuralnih elemenata. Krajnji efekat je „normalizacija“ funkcije neuronske mreže iz prethodnog stanja preturbacije.

Transkranijalna stimulacija mozga jednosmernom strujom (tSJS)

Neinvazivna stimulacija mozga električnom strujom predstavlja adjuvantnu metodu u

usponu u lečenju hroničnih bolnih sindroma, a u poslednje vreme i lečenju akutnog postoperativnog bola. Transkranijalna direktna stimulacija mozga strujom (tSJS) menja kortikalnu ekscitabilnost modulacijom ispod praga potencijala neuronske membrane u mirovanju putem konstantne slabe električne struje. ¹⁴

Mehanizam delovanja

Analogno farmakološkim neuromodulatorima tSJS ne indukuje aktivnost neuronske mreže u mirovanju, već vrši modulaciju spontane neuralne aktivnosti. Usled toga, intenzitet i smer efekata kritično zavise od prethodnog fiziološkog stanja ciljanih neuralnih struktura. tSJS menja prag okidanja stimulisanih neurona, na taj način menjajući i verovatnoću njihovog okidanja.

Postoje dva oblika stimulacije putem tSJS-a, anodna i katodna stimulacija. Efekti tSJS-a na kortikalnu ekscitabilnost su zavisni od polariteta elektroda, tako da anodni tSJS pojačava ekscitabilnost, dok katodni smanjuje, ukoliko se vrši isporuka električne struje u okviru određenih parametara. ¹⁵

Efekti i funkcionalni ishod tSJS-a zavise od više faktora, kao što su:

- Parametri vezani za tSJS (isporučena doza, polaritet struje i pozicija elektroda)
- Populacija pacijenata i etiologija bolesti i
- Dodatna terapija i intervencije

Način prolaska struje kroz one delove mozga koji se ciljaju tokom tSJS-a, zavisi od konfiguracije elektroda i anatomije mozga. Osoba koja izvodi tSJS određuje broj elektroda (obično ≥ 2), njihov oblik i veličinu (obično sunderi veličine 5x5 ili 5x7 cm), kao i poziciju elektroda na telu (Slika 1).



Slika 1. Određivanje broja i pozicije elektroda pri izvođenju tSJS

Delovi mozga koji su bliži anodi bi trebalo da povećaju svoju ekscitabilnost, dok bi delovi bliži katodi trebalo da smanje ekscitabilnost. Međutim, ova dešavanja variraju u zavisnosti od upotrebljene doze i stanja mozga. Uopšteno, ukoliko je cilj povećanje ili smanjenje moždane aktivnosti, anoda ili katoda se plasira iznad željenog dela mozga, dok se „suprotna“ elektroda stavlja na kontralateralni supraorbitalni region.

Različiti su sistemi koji određuju položaj elektroda. Najznačajniji je 10-20 elektroencefalografski (EEG) pozicioni sistem, mada postoje i noviji sofisticirani neuronavigacioni sistemi.

tSJS u terapiji akutnog postoperativnog bola

tSJS je do sada prevashodno korišćena u terapiji hroničnih bolnih sindroma, dok u poslednjih nekoliko godina sve više nalazi primenu u terapiji akutnog postoperativnog bola.

Postoperativno primenjena tSJS svojim analgetskim efektom uslovljava manju potrošnju opioida, a samim tim i manje neželjenih efekata uslovljenih primenom opioida (respiratorna depresija, mučnina, povraćanje, opstipacija, svrab, retencija urina). tSJS

najverovatnije potencira efekat egzogeno primenjenih opioida, na taj način smanjujući njihovu dozu sa postizanjem istog analgetskog efekta. Drugi mogući način je smanjenje endogene percepcije bola, čineći da se sa manje opioida postiže isti analgetski efekat.¹⁶

Korelacija između nivoa BDNT (Brain Derived Neurotrophic Factor) iz cerebrospinalne tečnosti i kliničkog efekta tSJS na akutni postoperativni bol, ukazuje na uticaj tSJS na ekscitatorno/inhibitornu ravnotežu centralnog nervnog sistema, koja modulira transmisiju nociceptivnog inputa.¹⁷

Do sada je urađeno nekoliko kliničkih studija vezanih za uticaj tSJS na akutni postoperativni bol. Najčešće praćeni parametri su bili postoperativna potrošnja opioida, intenzitet i kvalitet postoperativnog bola, promena raspoloženja. Većina studija su bile kontrolisane lažnom (sham) stimulacijom, randomizirane, dvostruko slepe. Lažna (sham) stimulacija predstavlja stimulaciju od svega par sekundi sa kutanom percepcijom stvarne stimulacije mozga električnom strujom. Ova kratka stimulacija ne menja kortikalnu ekscitabilnost.¹⁸ Lažna stimulacija se u studijama efikasno koristi da bi se obezbedilo da studija bude „slepa“.¹⁹

U studijama koje su se bavile uticajem tSJS

na akutni postoperativni bol, upoređivan je intenzitet bola i potrošnja opioda između grupa sa aktivnom i lažnom stimulacijom.

U studiji koja sa bavila efektom tSJS na bol nakon totalne artroplastike kolena, u grupi sa aktivnom stimulacijom dobijena je za 46% manja potrošnja hidromorfona u odnosu na grupu sa lažnom stimulacijom. Nije bilo statistički značajne razlike u pogledu intenziteta bola.²⁰

U studiji iz 2016, koja se bavila uticajem tSJS na bol nakon hirurgije lumbalne kičme, Glaser i saradnici takođe su dobili za 23% manju potrošnju hidromorfona u grupi sa aktivnom stimulacijom u odnosu na grupu sa lažnom, takođe bez značajne razlike u pogledu intenziteta bola između grupa.²¹

U studiji iz 2013, Dubois i saradnici su se bavili razlikom u intenzitetu bola i potrošnji opioda u zavisnosti od polariteta elektroda. Došli su do zaključka da nema statističke značajnosti u pogledu bola i potrošnje opioda između grupa pacijenata sa anodnom, katodnom i sham stimulacijom.²²

U većini studija je dobijena značajno manja potrošnja opioda u grupama sa aktivnom stimulacijom u odnosu na lažnu, bez značajne razlike u intenzitetu bola. To govori u prilog činjenice da je kod pacijenata koji su imali tSJS za postizanje istog analgetskog efekta bila dovoljna manja količina opioda u odnosu na pacijente sa lažnom stimulacijom.

Zaključak

Rezultati koji su dobijeni pomoću tSJS jesu obećavajući, ali u isto vreme pokazuju i visoku varijabilnost. Da bi se pojačala efikasnost ovog potencijalno moćnog terapijskog sredstva, potrebno je da unapredimo svoje znanje o moždanom neuroplasticitetu i njegovoj specifičnoj modulaciji putem tSJS, da razvijemo efikasnije tSJS protokole ne bismo li dobili precizniju stimulaciju i oblikovali efekte tSJS u smislu povećanja analgetske efikasnosti, smanjenja individualne varijabilnosti i povećanje inter- i intraindividualne replicibilnosti ishoda.

Takođe, efekti tSJS se mogu povećati kombinovanjem sa različitim farmakološkim agensima, kao i bihevioralnim tehnikama, što se naročito pokazalo efikasnim kod pacijenata sa cerebrovaskularnim insultom i depresijom.

Da bi se obezbedio efektivan, konzistentan i replicibilan pristup, mora se proći adekvatan trening za rukovanje tSJS-om. Dakle, prilikom korišćenja ove naizgled „jednostavne“ metode, mora se najpre voditi računa o sigurnosti pacijenta.

Iz kliničke pespektive tSJS je veoma atraktivna, jer je portabilna, „user friendly“, sa malim troškovima. Bez obzira na sva ograničenja koja su iznad navedena, smatra se da je u tSJS-u veliki potencijal i da će uskoro imati trajno mesto u kliničkim uslovima.

Literatura

1. Mersky H. Pain terms: A list with definitions and notes on usage recommended by the IASP subcommittee on Taxonomy. *Pain*. 1979;6:249–252.
2. Cousins M.J. Philadelphia: JB Lippincott, Inc.; 1988. Introduction to Acute and Chronic Pain: Neural Blockade in Clinical Anesthesia and Management of Pain
3. Brennan TJ, Zahn PK, Pogatzki-Zahn EM. Mechanisms of incisional pain. *Anesthesiol Clin North America*. 2005;23:1–20
4. Kehlet H. Acute pain control and accelerated surgical recovery. *Surg Clin North America*. 1999; 79(2): 431–443
5. Raja SN, Meyer RA, Campbell JN. Peripheral mechanisms of somatic pain. *Anesthesiology*. 1988;68(4) 571–590
6. Li, J., Simone, D. A., & Larson, A. A. (1999). Windup leads to characteristics of central sensitization. *Pain*, 79(1), 75–82.
7. Diby M, Romand JA, Frick S, Heidegger CP, Walder B. Reducing pain in patients undergoing cardiac surgery after implementation of a quality improvement post-operative pain treatment program. *J Crit Care*. 2008; 23(3): 359–71

8. Bredbacka S, Blomback M, Hagnevik K, et al. Pre- and postoperative changes in coagulation and fibrinolytic variables during abdominal hysterectomy under epidural or general anaesthesia. *Acta Anaesthesiol Scand* 1986; 30: 204–10.
9. Effects of acute postoperative pain on catecholamine plasma levels, hemodynamic parameters, and cardiac autonomic control. Ledowski, Thomas^{a,c,*}; Reimer, Maren^d; Chavez, Venus^c; Kapoor, Vimal^c; Wenk, Manuel^{a,b} *PAIN*: April 2012 - Volume 153 - Issue 4 - p 759–764
10. Zhang Jun-Ming, An Jianxiong. Cytokines, inflammation and pain. *Int Anaesthesiol*. 2007 Spring; 45(2): 27-37
11. Gritsenko K, et al. Multimodal therapy in perioperative analgesia. *Best Pract Res Clin Anaesthesiol* 2014;28(1):59-79.)
12. Ahles TA, Blanchard ED, Ruckdeschel JC. The multidimensional nature of cancer-related pain. *Pain* 1983; 17(3): 277-288
13. Krames, E. S., Hunter Peckham, P., Rezai, A. R., & Aboelsaad, F. (2009). What Is Neuromodulation? In *Neuromodulation* (Vol. 1, pp. 3–8).
14. Parazzini M, Rossi E, Rossi L, Priori A, R. A. (2013b). Numerical estimation of the current density in the heart during transcranial direct current stimulation. *Brain Stimulation*, 6(3), 457–459.
15. Batsikadze G, Moliadze V, Paulus W, Kuo MF, Nitsche MA. (2013). Partially non-linear stimulation intensity-dependent effects of direct current stimulation on motor cortex excitability in humans. *J Physiol* 591:1987–2000
16. Nitsche, Michael A.; Nitsche, Maren S.; Klein, Cornelia C.; Tergau, Frithjof; Rothwell, John C.; Paulus, Walter (2003). "Level of action of cathodal DC polarisation induced inhibition of the human motor cortex". *Clinical Neurophysiology*. 114 (4): 600–604.
17. Chassot M, Dussan-Sarria JA, Sehn FC, Deitos A, de Souza A, Vercelino R, et al. Electroacupuncture analgesia is associated with increased serum brain-derived neurotrophic factor in chronic tension-type headache: a randomized, sham controlled, crossover trial. *BMC Complement Altern Med* [Internet]. 2015; 15(1):1-10.
18. Nitsche, M. A., Cohen, L., Wassermann, E. M., Priori, A., Lang, N., Antal, A., et al. (2008). Transcranial direct current stimulation: State of the art 2008. *Brain Stimul*. 1, 206–223.
19. Gandiga, P. C., Hummel, F. C., and Cohen, L. G. (2006). Transcranial DC stimulation (tDCS): a tool for double-blind sham-controlled clinical studies in brain stimulation. *Clin. Neurophysiol*. 117, 845–850
20. Borckardt JJ, Reeves ST, Robinson SM, May JT, Epperson TI, Gunselman RJ, Schutte HD, Demos HA, Madan A, Fredrich S, George MS. Transcranial direct current stimulation (tDCS) reduces postsurgical opioid consumption in total knee arthroplasty (TKA). *Clin J Pain*. 2013;29:958-962.
21. Glaser J, Reeves ST, Stoll WD, Epperson TI, Hilbert M, Madan A, George MS, Borckardt JJ. Motor/prefrontal transcranial direct current stimulation (tDCS) following lumbar surgery. *Spine (Phila Pa 1976)* 2016; 41(10):835-9.
22. Dubois PE, Osseman M, de Fays K, De Bue P, Gourdin M, Jamart J, Vandermeeren Y. Postoperative analgesic effect of transcranial direct current stimulation in lumbar spine surgery: a randomized control trial. *Clin J Pain*. 2013; 29:696-701.

ASS dr Katarina Mladenović
Crnotravska 17
11000 Beograd
E-mail: katarina.mladenovic72@gmail.com
tel.+381 64 1267838

UPUTSTVO AUTORIMA ZA PRIPREMANJE RADA

Časopis "ANESTEZIJA, REANIMACIJA, TRANSFUZIJA" je časopis Udruženja anesteziologa, reanimatora i transfuzista Srbije registrovan kao glasilo javnog informisanja 1982. godine, u kojem se objavljuju radovi članova Udruženja, i članova drugih društava medicinskih i srodnih struka. Časopis objavljuje: originalne radove, saopštenja, prikaze bolesnika, preglede iz literature, radove iz istorije medicine, radove za praksu, vodiče kliničke prakse.

Prispeli rukopisi Urednički odbor šalje recenzentima radi stručne procene. Ukoliko recenzenti predlože izmene ili dopune, kopija recenzije se dostavlja autoru s molbom da unese tražene izmene u tekst rada ili da argumentovano obrazloži svoje neslaganje s primedbama recenzenta. Konačnu odluku o prihvatanju rada za štampu donosi glavni i odgovorni urednik.

Časopis se štampa na srpskom jeziku, sa kratkim sadržajem prevedenim na engleski jezik. Radovi stranih autora se štampaju na engleskom jeziku sa kratkim sadržajem na srpskom i engleskom jeziku.

OPŠTA UPUTSTVA

Tekst rada kucati u programu za obradu teksta Word, latinicom, sa dvostrukim proredom, isključivo fontom Times New Roman i veličinom slova 12 tačaka (12 pt). Sve margine podesiti na 25 mm, veličinu stranice na A4, a tekst kucati sa levim poravnanjem i uvlačenjem sva-kog pasusa za 10 mm, bez deljenja reči (hifenacije). Izbegavati upotrebu tabulatora i uzastopnih praznih karaktera (spejsova) radi poravnanja teksta, već za to koristiti alatke za kontrolu poravnanja na lenjiru i Toolbars. Posle svakog znaka interpunkcije staviti samo jedan prazan karakter. Ako se u tekstu koriste specijalni znaci (simboli), koristiti font Symbol.

Rukopis rada dostaviti e-mail-om, odštampan jednostrano na beloj hartiji formata A4 u tri primerka, zajedno sa disketom ili diskom (CD) na koje je snimljen identičan tekst koji je i na papiru. Stranice numerisati redom u okviru donje margine, počev od naslovne strane. Podaci o korišćenoj literaturi u tekstu označavaju se arapskim brojevima u uglastim zagradama – npr. [1, 2], i to onim redosledom kojim se pojavljuju u tekstu.

Naslovna strana: Na posebnoj, prvoj stranici rukopisa treba navesti sledeće:

- **naslov rada bez skraćenica;**
- **puna imena i prezimena autora i koautora (bez titula) sa tačnom godinom rođenja svakog od njih;**
- **zvaničan naziv ustanova u kojima autori rade i mesto, i to redosledom koji odgovara indeksiranim brojevima autora;**

- ukoliko je rad prethodno saopšten na nekom stručnom sastanku, navesti zvaničan naziv sastanka, mesto i vreme održavanja;
- na dnu stranice navesti ime i prezime, kontakt - adresu, broj telefona, faksa i e-mail adresu jednog od autora radi korespondencije.

Autorstvo: Sve osobe koje su navedene kao autori rada treba da se kvalifikuju za autorstvo. Svaki autor treba da je dovoljno učestvovao u radu na rukopisu kako bi mogao da preuzme odgovornost za celokupan tekst i rezultate iznesene u radu. Autorstvo se zasniva samo na:

- bitnom doprinosu koncepciji rada, dobijanju rezultata ili analizi i tumačenju rezultata, planiranju rukopisa ili njegovoj kritičkoj reviziji od znatnog intelektualnog značaja,
- završnom doterivanju verzije rukopisa koji se priprema za štampanje.

Autori treba da prilože opis doprinosa u rukopis za svakog koautora pojedinačno. Fiansiranje, skupljanje podataka ili generalno nadgledanje istraživačke grupe sami po sebi ne mogu opravdati autorstvo. Svi drugi koji su doprineli izradi rada, a koji nisu autori rukopisa, trebalo bi da budu navedeni u zahvalnici s opisom njihovog rada, naravno, uz pisani pristanak.

Kratak sadržaj – SAŽETAK: Uz originalni rad, saopštenje, prikaz bolesnika, pregled iz literature, rad iz istorije medicine i rad za praksu, na posebnoj stranici treba priložiti kratak sadržaj rada obima 200-300 reči. Za originale radove kratak sadržaj treba da ima sledeću strukturu: uvod, cilj rada, metod rada, rezultati i zaključak. Svaki od navedenih segmenata pisati kao poseban pasus, koji počinje boldovanom reči "Uvod", "Cilj rada", "Metod rada", "Rezultati" i "Zaključak". Navesti najvažnije rezultate (numeričke vrednosti) statističke analize i nivo značajnosti.

Ključne reči: Ispod kratkog sadržaja navesti ključne reči (od tri do šest). U izboru ključnih reči koristiti Medical Subject Headings – MeSH (<http://gateway.nlm.nih.gov>).

Prevod na engleski jezik: Na posebnoj stranici otkucati naslov rada na engleskom jeziku, puna imena i prezimena autora, nazive ustanova na engleskom jeziku i mesto.

Na sledećoj stranici priložiti kratak sadržaj na engleskom jeziku (Abstract) sa ključnim rečima (Key

words), i to za radove u kojima je obavezan kratak sadržaj na srpskom jeziku, koji treba da ima 200-300 reči. Apstrakt na engleskom treba da ima istu strukturu kao i kratak sadržaj na srpskom. Prevesti nazive tabela, grafikona, slika, shema, celokupni srpski tekst u njima i legendu.

Struktura rada: Svi podnaslovi se pišu velikim slovima i boldovano. Originalni rad treba da ima sledeće podnaslove: uvod, cilj rada, metod rada, rezultati, diskusija, zaključak, literatura.

Prikaz bolesnika čine: uvod, prikaz bolesnika, diskusija, zaključak, literatura. Ne treba koristiti imena bolesnika, inicijale ili brojeve istorija bolesti, naročito u ilustracijama.

Pregled iz literature čine: uvod, odgovarajući podnaslovi, zaključak, literatura. Pregledne radove iz literature mogu objavljivati samo autori koji navedu najmanje pet autocitata (reference u kojima su ili autori ili koautori rada).

Tekst rukopisa: Koristiti kratke i jasne rečenice. Prevod pojmova iz strane literature treba da bude u duhu srpskog jezika. Sve strane reči ili sintagme za koje postoji odgovarajuće ime u našem jeziku zameniti tim nazivom.

Za nazive lekova koristiti isključivo generička imena. Uređaji (aparati) se označavaju trgovačkim nazivima, a ime i mesto proizvođača treba navesti u obliku zagrada. Ukoliko se u tekstu koriste oznake koje su spoj slova i brojeva, precizno napisati broj koji se javlja kao ekspo-nent ili kao indeks (npr. ^{99}Tc , IL-6, O₂, B₁₂, CD₈).

Skraćenice: Koristiti samo kada je neophodno, i to za veoma dugačke nazive hemijskih jedinjenja, odnosno nazive koji su kao skraćenice već prepoznatljivi (standardne skraćenice, kao npr. DNK). Za svaku skraćenicu pun termin treba navesti pri prvom navođenju u tekstu, sem ako nije standardna jedinica mere. Ne koristiti skraćenice u naslovu. Izbegavati korišćenje skraćenica u kratkom sadržaju, ali ako su neophodne, svaku skraćenicu ponovo objasniti pri prvom navođenju u tekstu.

Decimalni brojevi: U tekstu rada decimalne brojeve pisati sa zarezom, a u tabelama, na grafikoni i drugim priložima, budući da se u njima navodi i prevod na engleskom jeziku, decimalne brojeve pisati sa tačkom (npr. u tekstu će biti 12,5±3,8, a u tabeli 12.5±3.8). Kad god je moguće broj zaokružiti na jednu decimalu.

Jedinice mere: Dužinu, visinu, težinu i zapreminu (volumen) izražavati u metričkim jedinicama (metar-m, kilogram-kg, litar-l) ili njihovim delovima. Temperaturu izražavati u stepenima Celzijusa (°C), količinu supstance u molima (mol), a pritisak krvi u milimetrima živinog stuba (mm Hg). Sve

rezultate hematoloških, kliničkih i biohemijskih merenja navoditi u metričkom sistemu prema Internacionalnom sistemu jedinica (SI).

Obim rukopisa: Celokupni rukopis rada – koji čine naslovna strana, kratak sadržaj, tekst rada, spisak literature, svi prilozi, odnosno potpisi za njih i legenda (tabele, fotografije, grafikoni, sheme, crteži), naslovna strana i kratak sadržaj na engleskom jeziku – mora iznositi za originalni rad, saopštenje, pregled iz literature i vodič kliničke prakse do 5.000 reči, za prikaz bolesnika do 2.000 reči, za rad iz istorije medicine do 3.000 reči, za rad za praksu do 1.500 reči; radovi za ostale rubrike moraju imati do 1.000 reči.

Provera broja reči u dokumentu može se izvršiti u programu Word kroz podmeni Tools – Word Count ili File – Properties – Statistics.

Tabele: Tabele se označavaju arapskim brojevima po redosledu navođenja u tekstu, sa nazivom na srpskom i engleskom jeziku. Tabele raditi isključivo u programu Word, kroz meni Table – Insert – Table, uz definisanje tačnog broja kolona i redova koji će činiti mrežu tabele. Desnim klikom na mišu – pomoću opcija Merge Cells i Split Cells – spajati, odnosno deliti ćelije. U jednu tabelu, u okviru iste ćelije, uneti i tekst na srpskom i tekst na engleskom jeziku – nikako ne praviti dve tabele sa dva jezika!

Koristiti font Times New Roman, veličina slova 12 pt, sa jednostrukim proredom i bez uvlačenja teksta.

Korišćene skraćenice u tabeli treba objasniti u legendi ispod tabele na srpskom i engleskom jeziku.

Svaku tabelu odštampati na posebnom listu papira i dostaviti po jedan primerak uz svaku kopiju rada (ukupno tri primerka tabele za rad koji se predaje).

Fotografije: Fotografije se označavaju arapskim brojevima po redosledu navođenja u tekstu, sa nazivom na srpskom i engleskom jeziku. Za svaku fotografiju dostaviti tri primerka ili tri seta u odvojenim kovčercima. Primaju se isključivo originalne fotografije (crno-bele ili u boji), na sjajnom (glatkom, a ne mat) papiru, po mogućstvu u formata 9×13 cm ili 10×15 cm.

Na poledini svake fotografije staviti nalepnicu. Na njoj napisati redni broj fotografije i strelicom označiti gornji deo slike. Voditi računa da se fotografije ne oštete na bilo koji način.

Fotografije snimljene digitalnim fotoaparatom dostaviti e-mail-om, na CD-u i odštampane na papiru, vodeći računa o kvalitetu (oštrini) i veličini digitalnog zapsa. Poželjno je da rezolucija bude najmanje 150 dpi, format fotografije 10×15 cm, a format zapisa *.JPG.

Ukoliko autori nisu u mogućnosti da dostave originalne fotografije, treba ih skenirati kao Grayscale sa rezolucijom 300 dpi, u originalnoj veličini i snimiti na CD-u. Fotografije se mogu objaviti u boji, ali dodatne troškove štampe snosi autor.

Grafikoni: Grafikoni treba da budu urađeni i dostavljeni u programu Excel, da bi se videle prateće vrednosti raspoređene po ćelijama. Iste grafikonke linkovati i u Word -ov dokument, gde se grafikoni označavaju arapskim brojevima po redosledu navođenja u tekstu, sa nazivom na srpskom i engleskom jeziku. Svi podaci na grafikonu kucaju se u fontu Times New Roman, na srpskom i engleskom jeziku. Korišćene skraćenice na grafikonu treba objasniti u legendi ispod grafikona na srpskom i engleskom jeziku. Svaki grafikon odštamovati na posebnom listu papira i dostaviti po jedan primerak uz svaku kopiju rada (ukupno tri primerka za rad koji se predaje).

Sheme (crteži): Sheme raditi u programu Corel Draw ili Adobe Illustrator (programi za rad sa vektorima, krivama). Svi podaci na shemi kucaju se u fontu Times New Roman, na srpskom i engleskom jeziku, veličina slova 10 pt. Korišćene skraćenice na shemi treba objasniti u legendi ispod sheme na srpskom i engleskom jeziku. Svaku shemu odštamovati na posebnom listu papira i dostaviti po jedan primerak uz svaku kopiju rada (ukupno tri primerka za rad koji se predaje).

Zahvalnica: Navesti sve one koji su doprineli stvaranju rada a ne ispunjavaju merila za autorstvo, kao što su osobe koje obezbeđuju tehničku pomoć, pomoć u pisanju rada ili rukovode odeljenjem koje obezbeđuje opštu po dršku. Finansijska i materijalna pomoć, u obliku sponzorstva, stipendija, poklona, opreme, lekova i drugo, treba takođe da bude navedena.

Literatura: Reference numerisati rednim arapskim brojevima prema redosledu navođenja u tekstu. Broj referenci ne bi trebalo da bude veći od 30, osim u pregledu iz literature, u kojem je dozvoljeno da ih bude do 50, dok za vodiče kliničke prakse broj referenci nije ograničen. Broj citiranih originalnih radova mora biti najmanje 80% od ukupnog broja referenci, odnosno broj citiranih knjiga, poglavlja u knjigama i preglednih članaka manji od 20%. Izbegavati korišćenje apstrakta kao reference, a apstrakte starije od dve godine ne citirati. Reference članaka koji su prihvaćeni za štampu treba označiti kao "u štampi" (in press) i priložiti dokaz o prihvatanju rada. Reference se citiraju prema tzv. vankuverskim pravilima (Vankuverski stil), koja su zasnovana na formatima koja koriste National Library of Medicine i Index Medicus. Naslove časopisa skraćivati takođe prema načinu koji koristi Index Medicus (ne stavljati tačke posle skraćenica!). Za radove koji imaju do šest autora navesti sve autore. Za radove koji imaju više od šest autora navesti prva tri i et al. Stranice se citiraju tako što se navede početna stranica, a krajnja bez cifre ili cifara koje se

ponavljaju (npr. od 152. do 157. stranice navodi se: 152-7).

Prilikom navođenja literature treba se pridržavati pomenutog standarda, jer je to vrlo bitan faktor za indeksiranje prilikom klasifikacije naučnih časopisa. Pravilnim navođenjem literature Srpski arhiv bi dobio na kvalitetu i bolje bi se kotirao na listi svetskih naučnih časopisa.

Primeri:

1. Članak u časopisu:

Maisch B, Seferovic PM, Ristic AD, et al. Guide lines on the diagnosis and management of pericardial diseases. Executivesummary. Eur Heart J 2004; 25(7): 587 -610.

2. Poglavlje u knjizi:

Maisch B, Ristic AD, Funck R, et al. Dilated cardiomyopathies and congestive heart failure. In: Singal PK, Dixon IMC, Kirshenbaum LA, Dhalala NS, editors. Cardiac Remodeling and Failure. Boston-Dordrecht-London: Kluwer Academic Publishers; 2003. p.35-65.

3. Knjiga:

Seferovic PM, Spodick DH, Maisch B, editors, Maksimovic R, Ristic AD, assoc. editors. Pericardiology: Contemporary Answers to Continuing Challenges. Beograd: Nauka; 2000.

Propratno pismo:

Uz rukopis obavezno priložiti pismo koje su potpisali svi autori, a koje treba da sadrži:

- puna imena i prezimena autora (bez titula) sa tačnom godinom rođenja sva kog od njih;
- izjavu da rad prethodno nije publikovan i da nije istovremeno podnet za objavljivanje u nekom drugom časopisu i
- izjavu da su rukopis pročitali i odobrili svi autori koji ispunjavaju merila autorstva.

Propratno pismo mora biti potpisano, skenirano i u PDF ili JPG formatu poslato elektronski uz rad.

Takođe je potrebno dostaviti kopije svih dozvola za: reprodukovanje prethodno objavljenog materijala, upotrebu ilustracija i objavljivanje informacija o poznatim ličnostima ili imenovanje osoba koje su doprinele izradi rada.

Slanje rukopisa: Rukopis rada i svi prilozi uz rad dostavljaju se u elektronskoj formi putem e-mail-a glavnom uredniku Časopisa ili u pisanoj formi, zajedno sa CD - om na kome je snimljen identičan rad koji je u papirnoj formi. Rad se šalje preporučenom pošiljkom na adresu:

Udrženje anestezišta, reanimatora i transfuzista Srbije
ul. Svetog Save 39, 11000 Beograd,
sa naznakom za časopis ANESTEZIJA, REANIMACIJA, TRANSFUZIJA

E-mail: udruzenjeart@gmail.com

Telefon glavnog urednika: **064 2400-652**

E-mail glavnog urednika: **dragoslavitev@gmail.com**

Napomena:

Rad koji ne ispunjava uslove ovog uputstva ne može biti upućen na recenziju i biće vraćen autorima da ga dopune i isprave. Pridržavanjem uputstva za pisanje rada znatno će se skratiti vreme celokupnog procesa do objavljivanja rada u časopisu, što će pozitivno uticati na kvalitet i redovnost izlaženja časopisa.



**FRESENIUS
KABI**

caring for life

AMICUS 

Modern Medicines for All



Dräger







APTUS d.o.o.





Kvalitet je bitan



 **DAHLHAUSEN®**
Potrošni medicinski materijal

- anestezija
- hirurgija
- intenzivna nega
- operaciona sala





Ovlašćeni zastupnik i distributer za Srbiju
UNIFARM MEDICOM d.o.o.
Cara Dušana 264, 11080 Zemun
T: +381 11 3168 206
T: +381 11 2611 191
F: +381 11 2612 292
E: office@unifarm-medicom.rs