

ČASOPIS UDRUŽENJA ANESTEZISTA REANIMATORA I TRANSFUZISTA SRBIJE



ANESTEZIJA REANIMACIJA TRANSFUZIJA

BEOGRAD
2017

Časopis Udruženja anesteziologa, reanimologa i transfuzista Srbije

Glavni i odgovorni urednik: Dragoslav Itov

Uređivački odbor: Draga Udovica
Radivoje Milovanović
Ninoslav Stojković

Recenzenti: Prof. dr sc med. Bela Balint - dopisni član SANU
Dr sc med. Gradimir Bogdanović
Prim. dr sc med. Snežana Jovanović Srzentić
Prof. dr sc med. Maja Šurbatović
Doc. dr sc med. Dragan Đorđević
Doc. dr Nebojša Lađević
Doc. dr sc med. Dušan Vučetić
N. sarad. prim. dr sc med. Slađana Anđelić
N. sarad. dr sc med. Mirjana Kovač
N. sarad. prim. dr sc med. Zoran Stanojković
N. sarad. prim. dr sc med. Nataša Vavić
Mr sc med. dr Branko Čalić
Dr spec. Zdravko Brkan
Dr spec. Ana Popadić
Dr spec. Aleksandar Vranjanac
Spec. strukovni MT Dragoslav Itov

Časopis izlazi kao dvobroj: Tiraž : 350

Štampa: Fmagazin, Beograd

Predsednik Udruženja: Draga Udovica

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

SADRŽAJ

HEMATOPOIETIC STEM CELLS – FROM HEMOBIOLOGY TO THE EXTRACORPOREAL MANIPULATIVE VIEWPOINTS

Bela Balint^{1,2,3}, Milena Todorovic^{4,5}, Gordana Ostojic¹, Marika Ljubenov¹, Dusan Vucetic¹, Aleksandar Jevtic¹, Vanda Balint⁵, Mirjana Pavlovic⁶ 9

WHAT ARE POSITIVE RESULTS OF STEM CELL THERAPIES ?

Joseph Levy¹, Bela Balint^{2,3}, Milena Todorovic⁴ and Mirjana Pavlovic¹ 23

THE NUMBER OF CD34⁺ CELL DOSE STRIKINGLY INFLUENCED SURVIVAL AFTER AUTOLOGOUS STEM CELL TRANSPLANTATION IN HODGKIN'S LYMPHOMA PATIENTS

Milena Todorovic Balint^{1,2}, Jelena Jelacic^{1,2}, Bela Balint^{3,4}, Jelena Bila^{1,2}, Darko Antic^{1,2}, Mihailo Smiljanic¹, Nada Kraguljac Kurtovic¹, Dijana Sefer¹, Dragana Vujic^{2,5}, Emilija Lazić⁵, Biljana Mihaljevic^{1,2} 41

MANAGEMENT OF PATIENTS WITH ACUTE PULMONARY THROMBOEMBOLISM

Slobodan Obradovic^{1,2}, Boris Dzudovic^{1,2}, Bela Balint^{2,3,4} 47

EKSTRAKORPORALNA IMUNOMODULACIJA – PRIMENA FOTOFEREZNIH POSTUPAKA U TRANSPLANTACIJSKOJ MEDICINI

Gordana Ostojic^{1,2}, Milena Todorovic^{3,4}, Valentina Balint⁴, Aleksandar Jevtic¹, Marika Ljubenov^{1,2}, Bela Balint^{1,2,5} 51

FRESH FROZEN PLASMA: QUALITY STANDARDS AND CLINICAL EFFICIENCY

Ana Antić¹, Zoran Stanojković^{1,2}, Marija Jelić³, Lana Mačukanović Golubović^{2,4} 61

ZIKA VIRUS - PATHOGENESIS, CLINICAL MANIFESTATIONS AND INFLUENCE ON BLOOD TRANSFUSION

Nemanja Borovčanin¹, Dušan Vučetić^{1,2}, Bela Balint^{1,2,3} 67

LEČENJE PRODUKTIMA I PREPARATIMA OD KRV I – USMERENA HEMOTERAPIJA

Ivana Jovanović¹, Dragana Gojkov¹, Milena Todorović^{2,3}, Gordana Ostojić¹, Valentina Balint³, Aleksandar Jevtić¹, Bela Balint^{1,4} 73

NOVA MUTACIJA PROTROMBINA

F2 c.1787G>A - GENSKA MUTACIJA KOJA DOVODI DO REZISTENCIJE NA ANITITROMBIN

Mirjana Kovač^{1,2} 81

HEMOVIGILANCA KOD DAVALACA KRV I I KOMPONENATA KRV I

Nataša Vavić 87

MOTO NAPISANOG I OBJAVLJENOG RADA: ISTINA, ISTINA I SAMO ISTINA

Slađana Anđelić, Goran Čolaković 95

SISTEMSKI EFEKTI INHALACIONIH ANESTETIKA

Goran Rondović, Dragan Đorđević 103

BIOHEMIJSKI PARAMETRI SEPSE

Ivo Udovičić, Ana Popadić, Aleksandar Vranjanac .. 113

MIŠIĆNI RELAKSANTI U

ELEKTROKONVULZIVNOJ TERAPIJI

Krasimirka Grujić, Snježana Zeba 119

LEČENJE I NEGA KRITIČNO OBOLELIH GOJAZNIH PACIJENATA

Ana Popadić, Ivo Udovičić, Goran Rondović 123

PERIOPERATIVNA HIPOTERMIJA

Snježana Zeba 133

UTICAJ ISHRANE NA PREŽIVLJAVANJE BOLESNIKA SA TEŠKIM AKUTNIM PANKREATITISOM

Ivana Krstić Lečić 139

TRANSPORT PACIJENTA SA POLITRAUMOM

Snežana Milivojević 143

USTVO 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, pregled iz literature, radove iz istorije medicine, radove za praksu, vodiče kliničke prakse.

Prispeli rukopis Uređivački 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 svakog 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 levoj i desnoj margini. Posle svakog znaka interpunkcije staviti samo jedan prazan karakter. Ako se u tekstu koriste specijalni znaci (simboli), koristiti font Symbol.

Rukopis rada dostaviti 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 učestvovao dovoljno 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 reviji od znatnog intelektualnog značaja,
- završnom doterivanju verzije rukopisa koji se priprema za štampanje.

Autori treba da prilože opis doprinosa u rukopisu za svakog koautora pojedinačno. Finansiranje, sakupljanje 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 boldovanim 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 eksponent ili kao indeks (npr. ^{99}Tc , IL-6 , O_2 , B_{12} , 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 $12,5 \pm 3,8$, 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 ($^{\circ}\text{C}$), 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 – spojiti, 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 kovertama. 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 na CD i odštampati 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.

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 grafikone 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 odštampati 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 odštampati 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 podršku. 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 klas

ifikacije 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, Dhalla 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.

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 pisanoj formi, zajedno sa CD -om na kome je snimljen identičan rad koji je u papirnoj formi. Rad se šalje preporučenom pošiljkom (ili donosi lično u Uredništvo) na adresu: Udrženje anestezišta, reanimatora i transfuzista Srbije, ul. Svetog Save 39, 11000 Beograd, sa naznakom za časopis ANESTEZIJA, REANIMACIJA, TRANSFUZIJA, ili e -mailom glavnom uredniku časopisa. Rad se može poslati i elektronskoj formi (e-mail_om) u koliko je to tehnički izvodljivo (dijagrami, tabele, sheme, slike ...) s time što prapratno pismo mora biti potpisano, skenirano i u

PDF ili jpg formatu poslato elektronski uz rad.

Adresa:

Udrženje anestezišta, reanimatora i
transfuzista Srbije
Svetog Save 39, 11000 Beograd

E-mail: udruzenjeart@gmail.com

Telefon glavnog urednika: 064 2400-652

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.







HEMATOPOIETIC STEM CELLS – FROM HEMOBIOLOGY TO THE EXTRACORPOREAL MANIPULATIVE VIEWPOINTS

Bela Balint^{1,2,3}, Milena Todorovic^{4,5}, Gordana Ostojic¹, Marika Ljubenov¹,
Dusan Vucetic¹, Aleksandar Jevtic¹, Vanda Balint⁵, Mirjana Pavlovic⁶

¹Military Medical Academy, Belgrade, Serbia; ²Institute for Medical Research, University of Belgrade, Serbia; ³Serbian Academy of Sciences and Arts, Belgrade, Serbia; ⁴Clinic for Hematology of CCS, Belgrade, Serbia; ⁵Faculty of Medicine, University of Belgrade, Serbia; ⁶Department of Computer and Electrical Engineering and Computer Science, FAU, FL, USA.

Abstract

Stem cells (SCs) could be determined as cells able for self-renewal with proliferative capacity and potential to differentiate into all blood cells or some somatic cell types, such as osteocytes, chondrocytes, hepatocytes, myocytes, cardiomyocytes and even endothelial cells (plasticity or transdifferentiation). Growing clinical use of various cell-mediated therapeutic methods has resulted in enlarged needs for both SCs and operating procedures to get a minimized cell damages during collection, purification and storage. The basic goal of cell collections to obtain improved SC yield and purity. The purpose of various cryoinvestigations is to reduce cell injuries during cryopreservation – that is freeze/thaw procedures (cryoinjury). Despite the fact that different SC collection and freezing protocols are in routine use, a lot of questions related to the optimal cell harvesting, processing and/or cryopreservation are still not determined.

The objective of this "state-of-art" paper is to recapitulate data in the field of conceptual and practical aspects of SC hemo(immuno)biology, harvesting and extracorporeal "graft-engineering" systems adapted to the specific cell categories. Finally, transplantation immunogenetical classification will be briefly reviewed.

Key words: stem cells, collection, processing, cryopreservation, transplantation.

General considerations

Hematopoiesis is an eventful multifarious process in which a variety of blood cells from a small quantity of stem cells (SCs) are produced through proliferation and differentiation. Hematopoietic SCs are adult cells found mainly in the bone marrow (BM) and they provide the blood cells required for daily blood turnover and for fighting infections. Compared to adult SCs from other tissues, these SCs are easy to obtain, as they can be either aspirated directly out of the BM or stimulated to move (mobilization) into the peripheral blood (PB), where they can be collected by apheresis (1–4).

Normally, SCs have high capacity for self-renewal (SCs dividing to produce more identical cells), as well as extensive potential for proliferation and differentiation into pluripotent or committed progenitors and finally mature blood cells. Hematopoietic events with a complex network of interactive cytokines (growth factors and their inhibitors) are regulated.

Different population of SCs expresses CD34 antigen, consequently they are named also as CD34⁺ cells (1–3). Thanks to mentioned abilities, SCs provide complete and long-term BM repopulation with following hematopoietic reconstitution

after transplantations. A traditional SC transplantation involves myelo (immuno) ablation – the administration of intensive radio-chemotherapy – followed by (re)infusion of harvested cells in order to eliminate of basic disease (5–7). Similar procedure with reduced-intensity conditioning (RIC) can be offered to patients who are disqualified for high-dose radio-chemotherapy because of their age or comorbidity (8). Malignant disorders are standard indication for transplantations (9–12). This therapeutic modality are also used for treatment of others diseases, such as severe aplastic anemia (SAA), severe combined immunodeficiency (SCID), some metabolic or autoimmune disorders (13–15).

Briefly, in different clinical settings totipotent, pluripotent and multipotent SCs give rise to repopulation of recipient's BM (engraftment) with subsequent complete, stable and long-term reconstitution of hematopoiesis. In addition, they are also capable of colonizing different tissues ("homing"). Thus, initial experimental and clinical studies showed that therapeutic use or "implantation" of autologous SCs into damaged and/or ischemic area induces their "homing" and following "transdifferentiation" into the cell lineages of host organ, including collateral vessel formation. Angiogenic growth factors (or genes encoding of these proteins) promote the development of collateral arterioles, and the process is called as "therapeutic angiogenesis" or "neovascularization" (1–3).

In practice, SCs could be collected by multiple aspirations from BM, by mononuclear cell (MNC) harvesting from PB (after mobilizing regimen) or by purification from umbilical cord blood (UCB). Typically, the use of BM or PB derived grafts (allogeneic or autologous) is a standard method in adult setting. UCB transplantations have provided hopeful results firstly in pediatric patients – when a

matched unrelated BM or PB donor is unavailable (4, 16–25).

In relation to genetic, and particularly HLA relationship between donor and recipient, transplantations can be classified as autologous, allogeneic and syngeneic (1, 4). The use of autologous transplantation requires both optimized harvesting procedures to get enough SC yield and cryopreservation that guarantees the best possible cell recovery (24, 26–28). Despite the fact that cryopreservation are already in routine use, some questions related to optimal freezing method and cryoprotectant (e.g. dimethyl sulfoxide – DMSO, hydroxyethylstarch – HES) type and concentration are not resolved (1–4, 29–31). For marrow failure and metabolic disorders, the use of allotransplantation is the therapeutic method of choice if patient has HLA-matched donor (1–4). However, allogeneic SC application is not without a risks, such as graft failure, despite intensive myeloablative conditioning regimen applied as well as acute and/or chronic Graft versus Host Disease (GvHD), regardless of immunosuppressive therapy administered (4, 32–35).

Generally, SCs can be divided into embryonic and "tissue specific" (adult) cell compartment (2, 3). Current researches have recognized that some adult SCs have similar "unlimited" biological potential than embryonic cells. Consequently, adult SCs are able to develop into a variety of somatic cells by "trans-differentiation" or "SC plasticity" (2, 36, 37). Although the term "cell plasticity" became very popular, some studies have suggested that BM might contain different types of SCs that can produce non-hematopoietic (somatic) cells. For example, mesenchymal SCs in BM give rise to osteocytes, chondrocytes, adipocytes and skeletal muscle. Consequently, adult BM or PB derived SCs are clinically applicable

for the cell-therapy in the field of regenerative medicine, that is cell/organ replacement and/or regeneration – precisely for

the treatment of patients with myocardial, liver, vascular, neurological or other tissue damages (38–43). The SC applications used in the Institute of Transfusiology and Hemobiology of MMA are the next: intra-coronary, intramiocardial and intratecal.

Heterogeneity of SC transplantations

When is BM appropriate to use as source of SCs for autologous resuscitation following myeloablative radio-chemotherapy or RIC depends on the marrow general state and/or infiltration with malignant cells. Fibrosis makes marrow not possible for SC collection by aspirations. Tumor cell infiltrates eliminate marrow as a transplantation source as well. Prior pelvic irradiation, poor anesthesia risk, obesity, or patient refusal of marrow collection can limit marrow as an option. Mobilized autologous SCs from PB are commonly used in the above situations and in heavily treated patients. This procedure is nowadays in routine clinical practice and provides more progenitor cell yield than conventional marrow harvest and therefore earlier engraftment, which is a faster hematopoietic recovery. Primarily for this reason, transplantation of PB derived SCs has practically replaced BM transplantation in an autologous setting. As mentioned, autologous PB harvests involve mobilizing the SCs from the patient's BM compartment into the circulation using different growth factors, typically in combination with chemotherapy prior to collection. Once in the circulation, the SCs are collected by apheresis – conventional or large-volume leukapheresis (1–3, 6).

Transplantation of allogeneic SCs are indicated in the treatment of patients with malignant disease – if they have HLA-matched donors. For patients with immune deficiency, marrow failure, metabolism disorders, etc., the use of allogeneic SCs is imperative. However, there are also some "atypical data" related to treatment of severe aplastic anemia (SAA) using autologous

SCs (10). Allogeneic transplantation is associated with a risk that immunocompetent donor cells will react again recipient tissues (GvHD), despite immunosuppressive therapy administered. In adult "related allogeneic setting", the best results are obtained using completely HLA-matched (HLA-identical, i.e. six-antigen matched donor/recipient pairs) transplantations. There is a 25% chance of a sibling being a complete match, a 50% chance of a haplotype match, and a 25% chance of a complete mismatch. Pediatric patients are more tolerant of partially mismatched graft (1, 4, 11).

Data obtained up till now has shown that the use of SC donor registers can successfully recruit unrelated donors for collection of BM or PB derived SCs. Thus, matched unrelated donor searches can be initiated for approximately 70% of candidates without sibling donor. These protocols have possible benefit since higher engraftment potential of allogeneic vs. autologous SCs and following earlier hematopoietic reconstitution, as well as occurrence of GvL effect (1–4). For definitive choice, additional experimental and clinical trials for comparison of efficacy and outcome of autologous vs. allogeneic (related or unrelated) BM vs. PB derived SC transplantation are required.

Occasionally recipient has an identical twin – a syngeneic transplantation is optimal because the donor and recipient cells are genotypically identical (the first transplantations performed in humans) (39). On the other hand, syngeneic grafts do not induce graft vs. tumor that is GvL effect in recipient. Our knowledge of the immunobiology of SC transplantation across major histocompatibility complex (MCH) barriers – haploidentical transplantations – has increased significantly over the past decades. The key reason (or limitation) for realization potential haploidentical SC transplantation is the absence of a HLA-matched related donor in the majority of families. On the other hand, the conver-

sion of a new hypothetical therapeutic option into the routine haploidentical SC transplantation clinical practice is accepted and developed more slowly. The most critical complications of SC transplantations across HLA-barriers, are the graft rejection and/or occurrence of GvHD. However, these adverse event maybe could be successfully prevented and treated using current pharmacologic approaches or manipulations during the haploidentical hematopoietic grafting process (1, 4, 10).

In a few words, the intensifying of myelo (immuno) ablative therapy combined with SC transplantation and the introduction of cell-mediated restorative/regenerative methods ("cell-therapy") resulted in increased needs for both SCs conceptual and practical operating procedures inducing minimized cell damages during their harvesting and cryopreservation. In this article, data in the field of

practical aspects of an optimized SC harvesting, purification and cryopreservation will be briefly reviewed. In addition, our results of the investigation of SC harvesting and different graft extracorporeal "graft-engineering" (cell processing, selection and cryopreservation) protocols will be summarized.

Sources/collection of hematopoietic SCs

Historically, BM was the first source of SCs for transplantation in experimental and clinical setting (1–7). A marrow harvest is the same for an allogeneic donor as for an autologous patient.

SCs are collected by multiple aspirations from the posterior and anterior iliac crest and (seldom) from sternum. The posterior iliac crest provides the richest site of marrow. The procedure is performed under sterile conditions in the operation room, while the donor is generally anesthetized (Figure 1).



Figure 1. BM derived SC collection by multiple aspirations

In order to provide required number of nucleated cells (TNCs), that is $\geq 3 \times 10^8/\text{kg}$ of body mass (kgbm), around 200 aspira-

tions are required, where single aspirate volume is 2–5 mL. Immediately after the collection, cell aspirate should be fil

tered in order to remove bone and lipid tissue particles and/or cell aggregates. Anticoagulation is provided using solution containing citrate and by heparin diluted in saline (5000 IU/500 mL), using autologous plasma or one of the cell culture medium for resuspension of collected cells (1–7).

The target dose of collected marrow is 10–15 mL per kgbm. Thus, the volume of aspirate is relatively large (800–1000 mL) and it contains a high count of red blood

cells. Accordingly, in order to prevent of anemia in donors, blood for autologous transfusion (to carry out during SC collection) should be collected around one week before SC collection and transplantation (1–4). Otherwise, the aspirate volume, exactly the total red blood cell mass and/or plasma quantity reduction is required (by processing – Figure 2), especially for ABO incompatible (major and/or minor) transplantations or when cryopreservation is intended (autologous setting).

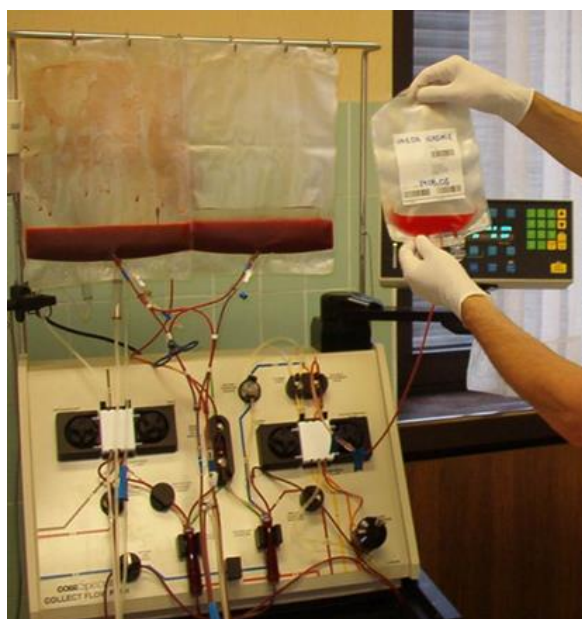


Figure 2. BM aspirate processing after SC collection using Cobe-Spectra device

A commonly used minimum target (after processing) of TNC count – for both autologous and allogeneic transplantations – is $2 \times 10^8/\text{kgbm}$ (1–4). The concentration of the CD34^+ cells and/or depletion of T-cells (positive/negative cell selection) in final cell unit is achieved by the *ex vivo* purging

procedure using immunomagnetic device for cell selection (2, 4).

These SC purification procedures (processing and purging or selection) enable reduction of the aspirate volume, *i.e.* reduction of red blood cell for around 80–90%, or even more precisely, the depletion of mentioned unwanted (malignant or

T-cells) cells with efficacy $\geq 3-4 \text{ Log}_{10}$ (1–4). Development of the ability to isolate selected SCs and/or *ex vivo* expand them into a large numbers is expected to broaden their beneficial therapeutic effects, since the limitation to many of SC applications

has been the absolute number of defined target cells. CD34 is the cluster designation given to a transmembrane glycoprotein present on SC surface and some stromal cells. Cells expressing the CD34 antigen (obtained from BM or PB) are capable of complete reconstitution of hematopoiesis. The first SC harvests from PB were ac

complished in "steady state hematopoiesis" – but using numerous (6 to 9) collections and following cryopreservation was needed (1–3).

Currently, SCs are harvested after mobilization by the use of chemotherapy and/or recombinant colony-stimulating factors

(rHuG-CSF). The typical number of apheresis required is not more than one to three.

The collection PB-SCs is an aphaeretic procedure with respect to the standardized protocol and cell yield. SC harvesting by Spectra-Optia is presented in Figure 3.



Figure 3. SC harvesting by Spectra-Optia device using IDL-system

Characteristically, for anticoagulation an acid-citrate-dextrose formula B (ACD-B with 1.8% citrate concentration) or ACD-A (2.2% citrate concentration) solutions are used alone (seldom in combination with heparin). For allogeneic transplantations, venous access is most frequently realized through ante-cubical veins. In autologous setting, collection should be performed across central-venous, jugular or femoral vascular access. Short-term use of femoral catheters appears safe and effective, improving patient comfort and reducing cost. These catheters have simplified cell harvesting, but may be associated with thrombosis of the instrumented vessels. In addition, there is approximately one percent central-venous catheter-related hazard of the local infection, pneumothorax or bleeding (1–4, 18–22).

PB-SC transplantation could be described by: a) absence of general anesthesia and work in surgical division; b) smaller harvest quantity and higher cell yield; c) improved engraftment-rate and lower transplantation-related morbidity; d) earlier/faster hematopoietic and immune reconstitution. Due to the mentioned reasons, the number of patients treated by PB-SCs is ever increasing worldwide, especially in autologous SC transplantation setting (1, 4). For obtaining acceptable SC or CD34⁺ yield, efficient mobilization protocol is required. Allogeneic donors are given rHuG-CSF 5–10 µg/kgbm daily subcutaneously. The CD34⁺ cell count in the circulation begins to rise after 2–3 days of rHuG-CSF administration and peaks is on the fifth day. When donor mobilization

with rHuG-CSF is poor, the only ways to improve yields are to increase the blood volume processed or the number of collections. In autologous setting typical rHuG-CSF doses are higher – patients are given rHuG-CSF 12–16 $\mu\text{g/kgbm}$ daily combined with mono-chemotherapy (cyclophosphamide 4–7 g/m^2) or by poly-chemotherapy in corresponding doses (1, 18–20).

In the course of cell harvesting, the determination of the optimized collection system and optimal timing for apheresis are the most critical event. The most recent SC software design incorporate the Intermediate density layer (IDL) system using Spectra-Optia device.

For allogeneic donors the first apheresis is on the fifth day of rHuG-CSF application. However, the definition of best possible timing of autologous collection from patients who primed by chemotherapy plus rHuG-CSF is more complex and controversial. The optimal timing can be determined based on the specific cell values in the hemogram. Leukocyte and/or mononuclear cell counts, as well as the number of circulating CD34^+ cells have all been used as markers to determine when to initiate harvesting. It is suggested that optimal time to begin cell collection in is when the leukocyte count $5\text{--}10 \times 10^9/\text{L}$. However, the leukocytes do not correlate strongly with the number of SC in the graft. Contrary, circulating CD34^+ number evidently correlates

with collection timing and the SC quantity in harvest (as a function of the volume of blood processed also). Namely, it is presented that for a CD34^+ count $\geq 20\text{--}40/\mu\text{L}$ of patient's blood the possibility of the CD34^+ yield $\geq 2.5 \times 10^6$ cells/kgbm is around 15% after performance of one "standard" collection or 60% or more after one LVL. Of course, higher CD34^+ number in circulation results in superior yield (1, 17–19). Our results also confirmed high-level efficacy of the LVL. Namely, for the 89.5% patients using one LVL, the mean

CD34^+ yield was $12.1 \times 10^6/\text{kgbm}$ (allogeneic) and $6.5 \times 10^6/\text{kgbm}$ (autologous), respectively. In our group of patients, the circulating CD34^+ count was also relatively high $40\text{--}60/\mu\text{L}$ following mobilizing regimen (1–4).

The efficiency and standardization of PB-SC harvesting can be estimated by MNC (now seldom) and CD34^+ (typically) quantifications. It is generally considered that the count of MNC should be about 300×10^8 per unit, that is $\geq 2\text{--}4 \times 10^8/\text{kgbm}$, and CD34^+ around 330×10^6 per unit, that is $\geq 2\text{--}4 \times 10^6/\text{kgbm}$ in harvest (contamination: no more than 470×10^9 platelets and 7.6 mL red blood cell total volume per unit) in order to expect successful transplantation. However, recent data support a clinical benefit associated with greater CD34^+ yield ($\geq 5.0 \times 10^6/\text{kgbm}$) compared to the minimum cell quantity needed ($\geq 1.0 \times 10^6/\text{kgbm}$) in autologous setting (1, 27, 28). Although commonly accepted, the stated cell yields cannot guarantee stable and long-term reconstruction of hematopoiesis following transplantation. In order to achieve them, the next details are needed: a) the volume of processed blood in one apheresis $\geq 2\text{--}3$ or more (intensive or LVL) patient's circulating volume, that is around 16–25 L for person with around 70–80 kg of body mass, and b) apheretic procedures should be performed one to two (occasionally more) times (1, 4, 20, 27).

However, patients who have been earlier treated with high dose radio-chemotherapy may be "poor responders" for chemotherapy plus rHuG-CSF induced mobilization. The most efficient approach to obtain adequate SCs from "poorly mobilizers" is not resolute still. Simultaneously collection of SCs from BM and PB not have been improved significantly engraftment-rate. Mobilization with rHuG-CSF alone is perhaps more efficient than rHuG-CSF in addition to chemotherapy. Increased doses of rHuG-CSF or use of rHuG-CSF together

with rHuGM-CSF has also effectively mobilized some autologous donors (1, 4). When PB-SCs are collected, additional harvest *ex vivo* manipulation, that is processing (to obtain a red blood cell count and/or plasma volume reduction) is not required because the final hematocrit is small (between 0.05 and 0.10) and the final volume of cell suspension is only around 200–250 mL (44). On the other hand, the main disadvantage of the use of PB-SCs is high-level T-lymphocyte and occasionally tumor cell "contamination" and subsequent risk of GvHD or disease relapse. However, efficient graft purification methods, that is depletion of tumor cells (autologous) or T-lymphocytes (allogeneic) was developed using immunomagnetic technique (positive and/or negative selection) by cell sorters (2, 11, 12). Namely, earlier studies reported an elevated risk of GvHD in allogeneic PB-SC vs. BM-SC recipients, but recent prospective randomized studies found no differences in the incidence of this complication (1, 44). The use of stated graft purification by immunomagnetic system has been shown to be the most effective method to achieve a 3–4 Log₁₀ T-lymphocyte depletion while retaining around 60–80% of the CD34⁺ cells in the graft (1, 11, 12). Our results also verified that CD34⁺ cell recovery was 70–80%, when post-selection CD34⁺ purity (CD34⁺ cell percentage in final cell suspension) was around 80–90% (1–4, 36).

In addition, the objective of our preclinical researches during last years was to optimize SC collection and processing protocols, as well as mobilization/harvesting timing in order to obtain high CD34⁺ and especially a more primitive CD34⁺/CD90⁺ cell yield and recovery (using original controlled-rate cryopreservation), with ultimate goal of improving conditions for complete and long-term hematopoietic reconstitution after autologous SC transplantations or therapy in the field of regenerative medicine.

As mentioned, the most common hematological malignancies treated by SCs are different leukemias (nowadays mainly acute myeloid leukemia and acute lymphoblastic leukemia), Hodgkin's disease or non-Hodgkin's lymphoma, multiple myeloma, and myelodysplastic or myeloproliferative disorders. In addition, a number of other diseases were treated with SC transplantations such as neuroblastoma, SAA, SCID, thalassemia and various autoimmune disorders. However, specific clinical aspects – such as optimal transplantation timing, therapeutic efficacy, complications – of the treatment of these disorders will not be discussed in this paper.

Finally, the clinical use of PB-SCs has a specific immune-mediated beneficial anti-tumor effect, particularly in hemat oncology. Namely, it has long been known that the administration of the donor-specific lymphocytes (DSLs) resulted with an obvious immunomodulating effect. However, only recently have systems been developed to "separate" the Graft-versus-Leukemia (GvL) effect from GvHD – the best results were obtained in treatment of CML (1, 44). Our investigations of the use of DSLs also confirmed efficacy of this treatment in patients with Philadelphia-positive CML relapsed after BMT. At the same time, our original *in vitro* test (named as "Test of Mixed Progenitors")

was introduced to predict of the clinical outcome of DSL-treatment. These patients did not develop GvHD and currently they remain well in complete remission (direct evidence of the GvL effect) (45).

Patient's request for SCs have only in ≤ 30% (related) and ≤ 70% (unrelated) possibility of finding an adult allogeneic donor. Because of the limited availability of donors, attention has turned to alternative sources of HLA-typed SCs. In recent years, UCB has emerged as a feasible alternative source of transplantable CD34⁺

cells for allogeneic transplantation, mainly in patients who lack HLA-matched donors of BM or PB derived SCs (1–4, 23–25). UCB is a relatively rich in "more primitive" SCs that can be used not only to reconstitute the hematopoietic system, but have the potential to give rise to non-hematopoietic cells (myocardial, neural and endothelial cells, etc.) by transdifferentiation.

The "naive" nature of UCB lymphocytes also permits the use of HLA-mismatched grafts at 1–2 loci without higher risk for severe GvHD relative to BM transplantation from a full matched unrelated donor. On the other hand, UCB is rich in primitive NK cells, which possess impressive proliferative and cytotoxic capacities and can be induced Graft versus Leukemia (GvL) effect. The use of UCB is an accepted cell source for pediatric patients for whom smaller cell count is enough for engraftment, and for whom a matched unrelated allogeneic BM or PB donor of SCs is unavailable. However, a higher risk of graft failure was noticed in children weighing ≥ 45 kgmb. Since the number of SCs in UCB is limited and the collection can occur only in a single occasion – its use in adult patients can be more problematic (23–25).

UCB volume is typically 100 mL (range 40–240 mL) with a TNC count around 1×10^9 and $CD34^+$ approximately 3×10^6 per unit. UCB can easily be cryopreserved, thus allowing for the establishment of HLA-typed SC banks. Because UCB derived SC banking requires high financial investment and organizational efforts, banking efficiency should be optimized. An important determinant of banking efficiency is the ratio of collections that can be cryopreserved and supplied for transplantation. Although there were reasons for removing UCB units that may be less amenable to improvement, such as low volumes and low cell counts, a number of obstetric factors influencing the outcome

of collections could be evaluated further, including the time of cord clamping, length of gestation, length of labor, the newborn's body weight, and the weight of the placenta (1–4, 24).

Cryopreservation of SCs

Cryobiology is a scientific discipline that estimates the effects of ultra-low temperature on cell integrity and functionality in the "refrigerated biological system" and determines data applicable in cryopractice. Cryopreservation is beneficial when cells appear to be biologically, chemically or thermally unstable after liquid-state storage. Its primary aim is to obtain both better cell recovery and postthaw viability. Thus, cryopreservation includes specific approaches/techniques designed to extend "therapeutic shelf-life" of the cells (prolonged storage-time) and to obtain minimum thermal damages (cryoinjury) (1–4, 26–30).

The use of cryobiology for living cell preservation began in 1949 with the freezing of bovine sperm cells, using glycerol as a cryoprotectant (46). Afterwards, glycerol and dimethyl sulfoxide (DMSO) techniques were applied for cryopreservation of different blood-derived (progenitor or mature) cells (4, 47–52). The basic goal of these initial cryoinvestigations was to predict the cell response to freeze/thaw processes and cryoprotectant addition/removal. However, evaluation of certain cryobiological variables (biophysical, physicochemical and other events/parameters responsible for cryoinjury), as well as standardization of conceptual and practical aspects of cryopreservation is still a question of considerable interest to researchers and practitioners (1–4, 47–52).

As mentioned, SC cryopreservation is now in routine practice, but recent cryoinvestigations suggest that freezing strategies should be revised to optimize specific cryobiosystems, *i.e.* to minimize the cryoinjuries and maximize cell recovery.

Microprocessor-restricted (controlled-rate) freezing is a time-consuming process, which requires high-level technical expertise. Uncontrolled-rate ("dump-freeze" without programmed cooling rate) technique is less costly because it does not require a programmed freezing-device. However, the controlled-rate method is a high-class alternative to the uncontrolled-rate technique due to superior quantitative, morphological, ultrastructural and functional cell recovery (1–4, 28–30).

Cryoinjuries can be detected as cell lesions, caused by the decrease of selected functions to the total cell destruction, *i.e.* cytolysis. At present it is considered that, cryoinjuries result from the extensive volume reduction (cellular dehydration or solution effect) and/or massive intracellular ice crystallization (mechanical damage). Although independent, these mechanisms can also act together. The first event is expressed primarily at low-rate (≤ 10 °C/min) freezing, and the second one in high-rate (≥ 10 °C/min) freezing (2, 4, 28, 50).

Therefore, determination of an optimal freezing rate (specific for each cell type and 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, 27). 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. 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 (4, 26, 28).

Determination of the optimal freezing approach is essential, but it cannot 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 prevent or reduce the degree of cell thermal damages. In brief, cryoprotectants can express protective effect by the reduction of cell dehydration, as well as by decreasing the intensity of intracellular crystallization. However, they cannot protect the cell from an already existing excessive dehydration or from the effect of already formed intracellular ice crystals (4, 26).

Generally, cryoprotectants can be classified into nonpenetrating or extracellular and penetrating or intracellular compounds. 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 (4, 26, 28).

In practice, bone marrow SC cryopreservation consists of the following steps: a) graft purification (if it is needed); b) equilibration (cell exposure to cryoprotectant) and freezing; c) 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 d) cell thawing in a water bath at 37 ± 3 °C. Cryopreservation of PB-SC has to be adapted to conditions which depend on the: a) higher blood cell count; b) presence of plasma proteins; c) absence of lipid and bone particles in HSPC concentrate (4, 28).

Immediately after thawing, cells are transfused through a central vein catheter. Generally, patients tolerate the infusion of unprocessed SCs well, with no side effects. However, the grade of the potential reinfusion-related toxicity is associated with DMSO quantity in the cell concentrate (4). Alternatively, cryoprotectant can be removed by washing, but this procedure results in substantial cell loss. The integrity of residual granulocytes is compromised within cryopreserved HSPCs and consequential DNA release during the thawing procedure may lead to cell "clumping" with resulting extra cell loss. To avoid this problem, a washing protocol by recombinant human deoxyribonuclease (rHu-DNase) is recommended (4, 26, 28). The addition of rHu-DNase 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 (4, 28).

Our results are in agreement with the above-mentioned studies. Namely, we have found that the recovery of pluripotent and committed haematopoietic progenitors (CFU-Sd12 and CFU-GM) in the presence of 5% vs. 10% DMSO is superior (1, 26). However, it has also been demonstrated that the recovery of very primitive pluripotent haematopoietic 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 (26). 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.

*

*

*

The intensification of SC transplantations and other cell-mediated approaches have resulted in elevated needs for higher quantity of SCs for treatment and improved operating procedures to minimize cell damage during collection, processing and cryopreservation. Thus, the competence of SC engrafting/autografting to obtain long-term disease free survival in future will depend on the development of optimized harvesting protocols, extracorporeal "graft-engineering" and superior anti-cancer approaches. SC transdifferentiation could lead to a potential use of SCs in regenerative medicine. Finally, SCs are considered as potential targets for gene therapy – but in this field even now the number of potential questions is higher than the number of possible answers.

References

1. Balint B. Stem and progenitor cell harvesting, extracorporeal "graft engineering" and clinical use – initial expansion vs. current dilemmas. *Clin Appl Immunol* 2006; 5(1): 518–27.
2. Pavlovic M, Balint B. *Stem Cells and Tissue Engineering*. New York: Springer; 2013.
3. Pavlovic M, Balint B. *Bioengineering and cancer stem cell concept*. New York: Springer; 2015.
4. Balint B, Vucetic D, Ostojic G, Ljubenov M. *The basic concepts of transfusion medicine with hemobiology*. Belgrade: Medija Centar Odbrana; 2015.
5. Thomas ED, Lochte HL. Supralethal whole body irradiation and isologous marrow-transplantation in man. *J Clin Invest* 1959; 38: 1709–16.
6. Mathe G, Jammet H. Transfusions et greffes de moelle osseuse homologue chez des humaines irradiées à haute dose accidentellement. *Rev Fr Etud Clin Biol* 1959; 4: 226–38.



7. Goldman JM, Th'ng KH, Park DS, Spiers ASD, Lowenthal RM, Ruutu T. Collection, cytopreservation and subsequent viability of haemopoietic stem cells intended for treatment of chronic granulocytic leukemia in blast-cell transformation. *Br J Hematol* 1978; 40: 185–95.
8. Karadurmus N, Sahin U, Basgoz BB, Arpaci F, Demirer T. Review of allogeneic hematopoietic stem cell transplantation with reduced intensity conditioning in solid tumors excluding breast cancer. *World J Transplant* 2016; 6: 675–81.
9. Singh AK, McGuirk JP. Allogeneic Stem Cell Transplantation: A historical and scientific overview. *Cancer Res* 2016 Oct 26. [Epub ahead of print]. PubMed PMID: 27784742.
10. Apperley J, Niederwieser D, Huang XJ, Nagler A, Fuchs E, Szer J, Koda Y. Haploidentical hematopoietic stem cell transplantation: A global overview comparing Asia, the European Union, and the United States. *Biol Blood Marrow Transplant* 2016; 22: 23–6.
11. Stark D, Rosenberg AR, Johnston D, Knight K, Caperon L, Uleryk E, et al. Patient-reported measures of hearing loss and tinnitus in pediatric cancer and hematopoietic stem cell transplantation: A Systematic Review. *J Speech Lang Hear Res* 2016; 59: 1247–52.
12. 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: 137–41.
13. Smogorzewska EM, Weinberg KI, Kohn DB. Transplantation of genetically modified cells in the treatment of children with SCID: great hopes and recent disappointments. *Med Wieku Rozwoj* 2003; 7: 27–34.
14. Saiz A, Graus F. Transplantation of haematopoietic stem cells in multiple sclerosis. *Rev Neurol* 2002; 35: 1136–41.
15. Gaziev J, Lucarelli G. Stem cell transplantation and gene therapy for hemoglobinopathies. *Curr Hematol Rep* 2005; 4: 126–31.
16. Lasky LC, Ash RC, Kersey JH. Collection of pluripotential hematopoietic cells by cytophoresis. *Blood* 1982; 59: 822–7.
17. Sato N, Sawada K, Takahashi TA, Mogi Y, Asano S, Koike T, et al. A time course study for optimal harvest of peripheral blood progenitor cells by granulocyte colony-stimulating factor in healthy volunteers. *Exp Hematol* 1994; 22: 973–8.
18. Balint B, Stamatovic D, Todorovic M, Jevtic M, Ostojic G, Pavlovic M, et al. Stem cells in the arrangement of bone marrow repopulation and regenerative medicine. *Vojnosanit Pregl* 2007; 64(7): 481–4.
19. Farhadfar N, Cerquozzi S, Patnaik M, Tefferi A. Allogeneic Hematopoietic Stem-Cell Transplantation for Myelofibrosis: A Practical Review. *J Oncol Pract* 2016; 12: 611–21.
20. Balint B, Ljubenov M, Stamatović D, Todorović M, Pavlović M, Ostojić G, et al. Stem cell harvesting protocol research in autologous transplantation setting: large volume vs. conventional cytophoresis *Vojnosanit Pregl* 2008; 65(7): 545–51.
21. Moreiras-Plaza M, Albo C, Ares C. Efficacy and safety of femoral vascular access for peripheral blood stem cell (PBSC) collection. *Bone Marrow Transplant* 2004; 33: 347–50.
22. Saif MW, Leitman SF, Cusack G, Horne M, Freifeld A, Venzon D, et al. Thromboembolism following removal of femoral venous apheresis catheters in patients with breast cancer. *Ann Oncol* 2004; 15: 1366–72.



23. Cohen Y, Nagler A. Umbilical cord blood transplantation – how, when and for whom? *Blood Rev* 2004; 18: 167–79.
24. Skoric D, Balint B, Petakov M, Sindjic M, Rodic P. Collection strategies and cryopreservation of umbilical cord blood. *Transfusion Medicine* 2007; 17: 107–13.
25. Mallhi K, Dix DB, Niederhoffer KY, Armstrong L, Rozmus J. Successful umbilical cord blood hematopoietic stem cell transplantation in pediatric patients with MDS/AML associated with underlying GATA2 mutations: two case reports and review of literature. *Pediatr Transplant* 2016; 20: 1004–7.
26. Balint B, Ivanovic Z, Petakov M, Taseski J, Jovicic G, Stojanovic N, et al. The cryopreservation protocol optimal for progenitor recovery is not optimal for preservation of MRA. *Bone Marrow Transplant* 1999; 23: 613–9.
27. Balint B, Ljubenov M, Stamatović D, Todorović M, Pavlović M, Ostojić G, et al. Stem cell harvesting protocol research in autologous transplantation setting: large volume vs. conventional cytopheresis *Vojnosanit Pregl* 2008; 65: 545–51.
28. Balint B. Coexistent cryopreservation strategies: microprocessor-restricted vs. uncontrolled-rate freezing of the "blood-derived" progenitors/cells. *Blood Banking Transf Med* 2004; 2: 62–71.
29. Gorin NC. Collection, manipulation and freezing of haemopoietic stem cells. *Clin Haematol* 1986; 15: 19–48.
30. Rowley SD. Secondary processing, cryopreservation, and reinfusion of the collected product. In: Kessinger A, McMannis JD, editors. *Practical considerations of apheresis in peripheral blood stem cell transplantation*. Lakewood: Cobe BCT Inc; 1994. p. 53–62.
31. Tabilio A, Falzetti F, Zei T, De Ioanni M, Bonifacio E, Battelli F, et al. Graft engineering for allogeneic haploidentical stem cell transplantation. *Blood Cells Mol Dis* 2004; 33: 274–80.
32. Tabbara IA. Allogeneic bone marrow transplantation: acute and late complications. *Anticancer Res* 1996; 16: 1019–26.
33. Wilson C, Sylvanus T. Graft failure following allogeneic blood and marrow transplant: evidence-based nursing case study review. *Clin J Oncol Nurs* 2005; 9: 151–9.
34. Kansu E. The pathophysiology of chronic graft-versus-host disease. *Int J Hematol* 2004; 79: 209–15.
35. Yeh ETH, Zhang S, Wu HD, Kërbling M, Willerson JT, Estrov Z. Transdifferentiation of human peripheral blood CD34⁺-enriched cell population into cardiomyocytes, endothelial cells, and smooth muscle cells in vivo. *Circulation* 2003; 108: 2070–3.
36. Balint B. Stem cells – unselected or selected, unfrozen or cryopreserved: marrow repopulation capacity and plasticity potential in experimental and clinical settings. *Maked Med Pregl* 2004; 58 (Suppl 63): 22–4.
37. Balint B, Obradovic S, Todorovic M, Pavlovic M, Mihaljevic B. Stem cell-based (auto)grafting: from innovative research toward clinical use in regenerative medicine. In: Alimoghaddam K, editor. *Stem Cell Biology in Normal Life and Diseases*. Rijeka: InTech. 2013. p. 111–35.
38. Wagers AJ, Sherwood RI, Christensen JL, Weissman IL. Little evidence for developmental plasticity of adult hematopoietic stem cells. *Science* 2002; 297: 2256–9.
39. Beltrami AP, Urbanek K, Kajstura J, Yan S-M, Finato N, Bussani R et al. Evidence that human cardiac myocytes divide after myocardial infarction. *N Engl J Med* 2001; 344: 1750–7.
40. Müller P, Pfeiffer P, Koglin J et al. Cardiomyocytes of noncardiac origin in myocardial biopsies of human



- transplanted hearts. *Circulation* 2002; 106: 31–5.
41. Shintani S, Murohara T, Ikeda H, Uenoi T, Honma T, Katoh A, et al. Mobilization of endothelial progenitor cells in patients with acute myocardial infarction. *Circulation* 2001; 103: 2776–9.
 42. Hassink RJ, de la Rivere AB, Mummery CL, Doevendans PA. Transplantation of cells for cardiac repair. *J Am Coll Cardiol* 2003; 41: 771–7.
 43. Rafii S, Lyden D. Therapeutic stem and progenitor cell transplantation for organ vascularization and regeneration. *Nat Med* 2003; 9: 702–12.
 44. Kolb HJ, Schmid C, Chen X, Woiciechowski A, Roskrow M, Weber M, et al. Adoptive immunotherapy in chimeras with donor lymphocytes. *Acta Haematol* 2003; 110: 110–20.
 45. Petakov M, Balint B, Bugarski D, Jovicic G, Stojanovic N, Vojvodic D, et al. Donor leukocyte infusion – the effect of mutual reactivity of donor's and recipient's peripheral blood mononuclear cell on hematopoietic progenitor cells growth. *Vojnosanit Pregl* 2000; 57 (5 Suppl): 89–93.
 46. Polge C, Smith AU, Parkes AS. Revival of spermatozoa after vitrification and dehydration at low temperatures. *Nature* 1949; 164: 666.
 47. Mollison PL, Slovis HA. Successful Transfusion of previously frozen human red cells. *Lancet* 1951; 2: 862.
 48. Barnes DWH, Loutit JF. The radiation recovery factor: preservation by the Polge–Smith–Parkers technique. *J Nat Canc Inst* 1955; 15: 901–906.
 49. Lovelock JE, Bishop MWH. Prevention of freezing damage to living cells by dimethyl–sulfoxide. *Nature* 1959; 183: 1394–5.
 50. Balint B, Radovic M. Biophysical aspects of cryopreservation of hematopoietic stem and progenitor cells. *Bull Transfus* 1993; 21: 3–8.
 51. 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.
 52. 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.



WHAT ARE POSITIVE RESULTS OF STEM CELL THERAPIES?

Joseph Levy¹, Bela Balint^{2,3}, Milena Todorovic⁴ and Mirjana Pavlovic¹

¹Department of Computer and Electrical Engineering and Computer Science, Florida Atlantic University, Boca Raton, FL, USA; ²Institute for Transfusiology and Hemobiology of MMA, Belgrade, Serbia; ³Serbian Academy of Sciences and Arts, Belgrade, Serbia; ⁴Clinic for Hematology of CCS, Belgrade, Serbia.

Abstract

Stem cells are a rapidly growing and important part of science and technology of the day. They are being used and researched for many of the diseases we face today and have been shown to be an important, if not necessary, component of most treatments and cures. This use and promise hold true even with our limited knowledge of their full function or potential. This article addresses expectations and results related to stem cell therapy. It summarizes pros and cons for stem cell therapy, use of particular patterns, and final output in different diseases. The controversial debate about adult stem cell pluripotency is underlined. The encouraging results are presented and critical remarks stated.

Key words: Stem cells, cellular therapy, senses, degenerative diseases

An Overview of Some Disease States in Which Stem Cells Could Help

Science is the great antidote to the poison of enthusiasm and superstition.
Adam Smith

This authors have already published from this field therefore, we recommend the books for more detailed reading (1, 2). Due to the plasticity of at least Embryonic Stem (ES) cells, there appears to be virtually no limit to the number of disease states which these cells could help improve. Although there are still a lot of controversies dependent on the model used, cell types applied and other criteria critical for engraftment (3-9). The majority of conditions which are being examined for study with both embryonic and adult stem cells have the similar nature of being degenerative in some manner (10-13). Whether it is through injury or deterioration, these states show a decrease/end of tissue function due to the loss of cells in a specific region. Despite apparently suc-

cessful and helpful intervention with some adult stem cells, there is a category of scientists which are very skeptical with respect to adult stem cell plasticity and/or pluripotency (14, 15).

Heart Attack

In an event such as a heart attack, a large number of cells within the heart are killed due to the lack of nutrients flowing to them. This can often lead to a significant weakening of the heart muscle and functionality. Currently there are no available solutions for repairing such damage to the heart, and the body is typically unable to cope with the large degree of damage done in these instances. Through stem cell therapy though, there is evidence that the damage done can be corrected. By introducing large volumes of stem cells to the

affected region, it has been shown that the cells will not only differentiate into cardiac muscle, but also restore functionality to the entire tissue (16-22). As the heart tissue is so unique in its properties, it is very significant that these cells are able to recreate the structure and functionality.

Optimization of the Stem Cell source for intracoronary grafting

Post-Acute Myocardial Infarction (AMI)-Personal Experience with Dr. Bela Balint

As mentioned, plasticity is very desirable, but still a disputable feature of stem cells. Effort has been invested toward the identification of primitive populations of Hematopoietic Stem Cells (HSCs), the ones that would have had high level of plasticity as intended in a proper bioengineered scenario (23-25). It has also been observed that one low-dose of Neupogen (3-5 $\mu\text{g/kg}$ BM) can activate Bone Marrow (BM) with consecutive in situ multiplication and activation of HSCs in the niches (25). This contributes to more efficient collection of primitive populations of HSCs for conventional transplantation and regenerative medicine purposes. Valgimigli et al, (2005) used the granulocyte-colony stimulating factor during acute myocardial infarction to enhance bone marrow stem cell

mobilization in humans, and gave clear clinical and angiographic safety profile (27). Again, in our more than a decade long clinical work, a crucial question posed was: can optimized, mostly primitive HSCs, transdifferentiate into myocardio-myocyte lineage in in-vivo conditions after AMI, and can it be proved and checked in the clinical arena? For that study, patients younger than 71 years old, with large AMI of the front left ventricular wall, which, 5 days after AMI, have had ejection fraction of left ventricle reduced to less than 41% but more than 19%, were studied. They were without any known disease or status of influence upon surveillance or heart function, and without significant damage to heart valve functions. Stem cell mobilization and harvesting were done in a standard manner including apheresis and positive cell selection with emphasis on CD34+ subtype (22).

Autologous, pluripotent progenitor adult HSC aspirated from BM (Figure 1) have been used beside apheresis and both have shown to cause AMI improvement measured by clinical parameters of ventricular ejection and PET during the decade of work of Bela Balint's group (2012, 2015) (1, 2).



Figure 1. Stem cell collection for tissue repair and revascularization

The application was performed into coronary arteries, and myocardium. Results could be summarized as following:

- Primitive HSCs express plasticity proven through recovery of left ventricle ejection fraction within clinical follow-up showing.
- Preliminary results indicate positive influence upon reduction of negative re-modeling of the left ventricle.
- Future studies require larger patient cohort to define statistical relevance.

Physically induced injury of neural tissues

Spinal Rupture

One such example of a physical injury resulting in a loss of tissue function is the breaking of a nerve pathway resulting in the loss of function of both, the tissue excited by that nerve, but also any others located down its pathway. These physical ruptures are typically caused by a significant and sudden stress placed upon the neural tissue or by a structure striking the tissue and severing it. While not as common, an increasing number of instances where the neural structure is crushed due to an external trauma have also been shown to cause loss of functionality of the neural pathway. In these cases, the neural tissue is left disconnected or too damaged to function along its length and due to its own properties is unable to properly or completely repair itself. With current technology, a person suffering from such an injury would be highly unlikely to heal completely, and would most likely lose some function of their self-due to this injury.

Current technology can still provide some help with such injuries, but within our own healing abilities, the damage done often results in tissue formation which is not concurrent with that of the original (22). The result of this different tissue being introduced at this junction can result in

poor conduction through the nerve, if conduction through is still even possible (26). Through the use of stem cells, it has been shown that nerve cells can in fact be regrown in the locations of these breaks (22, 29). When introduced to these locations and induced, it has been shown that the new structure is not only functional, but capable of restoring complete functionality of the tissue. Though there are still many limitations of this process, the ability of stem cells to function in this way show the promise of method.

Stroke

Similar to the events which lead up to a heart attack, a stroke is often the result of a large cell die off within the brain due to an obstruction within the vasculature leading to the brain. When an instance like this occurs, the individual will often not only lose tissue, but functionality as well. In this case though, functionality goes further than just the organ itself. Since the brain controls many of the functions of the body as well as having been trained to many further functions, these losses can be much more significant. With notable losses in both motor control as well as memory, the damage done by a stroke is one of great issues within the body. Even with time and therapy, there is no current technology which can fully repair the damage done by one of these events. Currently all that can be done is to re-teach the body how to perform the functions it had “forgot” due to the damage done by the event.

Stem cell therapies applied to stroke victims have been met with limited success due to the nature of the damage done. Although stem cells have been able to be isolated and implanted or mobilized to the locations of damage, they are often not able to restore all that is lost due to the nature of the brain. Priller (2003) has shown by immunohistochemistry that adult bone marrow stem cells populate the brain (29). The treatments though have

been shown to have significant influence on functionality which is not associated with some of the higher functionality feature of the brain. Functions such as balance and communication within the brain have been shown to be significantly improved through the introduction of stem cells after these events (34-37). These abilities are some of the basic functions of the brain and work on a lower cognitive level when compared to movement, intellect or reception of the senses. There is a spectrum of clinical and experimental approaches to the stroke with different type of stem cells (MSC, SC, human BM stromal cells) which show that adult stem cells from blood and BM can turn into different types of neurons (38-46). And although the results do require further exploration, in order to get significant improvement in function after the stroke, they are encouraging.

Degenerative injuries

Autoimmune Diseases (AID)

In general, the existence of AID reflects the broken tolerance of an immune system which is perpetuating the flares, and it is impossible to permanently cure the AID by trying to replace sick immune cells with healthy stem cells. However, longer remissions are possible and needed unless we figure out how to treat these devastating diseases. Stem cell therapy in specific diseases, may play the role of adjuvant therapy in concert with other medication.

Amyotrophic Lateral Sclerosis (ALS)

Amyotrophic lateral sclerosis (ALS), commonly referred to as Lou Gehrig's disease, is a progressive disease which is characterized by the loss of motor neurons in the spinal cord and brain stem. This loss is associated with the atrophy of muscles within the body typically resulting in paralysis and death (47-50). Even though

this disease has been shown to cause such significant harm, very little is known about it, nor has any effective treatment or suppressant been found.

Due to these concerns, stem cells have been targeted as the possible "magic bullet" for ALS. In studies performed by Letizia Mazzini and colleagues there have been significant advances made in the quest for a treatment, if not a cure (47). In their study these investigators were able to grow neurons *ex vivo* and then implant them into ALS patients. Thanks to these grown neurons, it was noted that muscles not only showed a slowing of muscle atrophy, but in some cases saw increases in muscle strength after three months (47).

Multiple Sclerosis (MS)

Another progressive disease, multiple sclerosis (MS) targets the myelin of the nervous system, in specific the regions of the CNS for the optic nerve, spinal cord brain stem and cerebellum (19, 51). The deterioration of these tissues comes as a result of a few factors including plaques attaching and degrading the myelin as well as local inflammatory responses of the body (19). Even with these losses; the nerve itself appears to remain whole, with little to no damage occurring on the axon, body or dendrites of the neuron. The results of this degeneration are a general weakening of limbs eventually leading to limb paralysis, gait ataxia and brain stem symptoms (19). This degeneration typically takes place over many years, with symptoms presenting themselves before subsiding, leaving the individual in a more inferior state. Even though myelin does eventually regenerate around the axon of a nerve, it is often much thinner than what it was previously. Also, the rate at which myelin regenerates is much too slow and inefficient to completely help recover the damaged tissue. Even with thorough study of this disease, the scientific community is still unsure of what the cause of MS is;

only noting a few cues as to what may lead someone to be susceptible.

Current treatments for MS focus on mitigating flare-ups, trying to keep localized swelling down as well as preventing an immune response in the area. It has been noted that the immune system and response plays a significant role in the degeneration of the myelin. With stem cells appearing to be a source for better myelin generation, they have been a steady source of interest (19, 51). Works in other studies have shown that stem cells are able to help re-myelinate nerve cells in order to improve signal transmission due to spinal cord injuries (52-53). The notable difference between myelin regenerated typically in the body and that generated through stem cell therapy is the thickness of the myelin. Stem cell generated myelin typically appears to be much thicker than that regenerated by the body, this results in better signal conduction through the nervous system (53). An additional benefit to stem cell therapy for MS is its ability to lower the amount of inflammation in an area. This secondary benefit should not be overlooked, as the inflammatory response of the body appears to have almost as much of a deleterious effect on myelin as the plaques generated by the disease.

Persistent disease states

Alzheimer's disease (AD)

Alzheimer's' disease (AD) is a type of dementia, another progressive disease state, associated with the formation of amyloid plaques within the brain (54). Due to the presence of these plaques, the brain tissue degenerates over time, causing the individual to lose learned skills, until eventually the brain is deteriorated to the point of losing the capacity for basic life functions. Currently there are no treatments for this disease, with the scientific community unsure of how to prevent the plaques from forming or damaging brain tissue.

Current research into treatments for AD has led investigators to injecting neural stem cells into an injured brain (54). Although only early in the research phase, trials on mice have shown that injected stem cells have been able to regenerate damaged brain cells (54). In addition to direct injection, researchers are attempting to allow stem cells to migrate to the regions of damage and use secondary treatments to increase the rate of cell proliferation (54). These treatments have been shown to not only increase the number of stem cells present within the brain tissue, but also reverse the effect of AD in mice. This new treatment option has also been proved to lower the amount to the amyloid plaques within the brain tissue (41). A feat not copied in any of the current treatment regimens available.

Parkinson's disease (PD)

Parkinson's disease (PD) is a neurodegenerative disease affecting the dopamine producing cells found within the brain. PD is characterized by the death of at least 80% of the dopamine producing cells found within the substantia nigra. The death of these cells not only causes tissue loss in the brain, but lowers the brain's ability to produce dopamine; it is this by-product of PD which causes the problems associated with this disease. Dopamine within the brain is responsible for allowing the body to have smooth and coordinated movement (55). Current treatments for this disease focus on providing the body with a dopamine substitute, typically the drug Levodopa (L-dopa), which the brain can then use to help compensate for its lower production. This treatment is not a permanent solution, as the effectiveness of L-dopa decreases over time, to a point where it is no longer effective and the side effects of the drug become too great (1). Current work on treatments for this disease using stem cells has been mixed with various methods and approaches taken.

One of the most successful has been the use of adult stem cells, and in particular neural stem cells, to grow neurons in-vitro. The grown neurons were then implanted into the patient where they were able to help improve the condition of the patient. The neuronal stem cells used had the added benefit of not causing an immune response within the patient due to their level of differentiation unlike their embryonic counterparts. Trials with mesencephalic tissue in post-mitotic dopaminergic neurons have provided a proof-of-principle that neuronal replacement can work in a human brain (1). This study alone should not be taken as an end of this disease, but rather a good stepping point in the hopeful treatment of this serious and debilitating disease.

Huntington's disease (HD)

Huntington's disease (HD) is another progressive neurodegenerative disease with few treatments currently available (57-70). HD is characterized by the presence of a specific sequence of repeating subunits within the huntingtin gene (57). The disease has been shown to cause the loss of medium spiny projection neurons within the striatum of the brain. This degeneration appears to be a result of a misfolding of a protein associated with the huntingtin gene. As the body ages and repairs damage done to the gene from oxidation, repeats of the extra segment found within the huntingtin gene expand and result in the malformed protein (56).

Treatments for this disease using stem cells focus on the production of the spiny projection neurons of the striatum. These grown neurons are then implanted into the striatum in an effort to replace the lost tissue (69, 70). Unfortunately, results of this treatment have been less successful than other avenues, as the number of cells needed to provide relief have been hard to generate in the lab. There is also the issue of the continuing production and accumu-

lation of the abnormal proteins which cause the loss of the neurons to begin with. This is not the end for stem cell treatment for HD, as many still believe that stem cells are a necessary component for any cure as a way to replace the lost neurons within the brain once the issue of the degenerative protein has been solved.

Concerns with stem cells

Stem cells do pose many problems along with the benefits they have shown. One of the most recent issues being addressed is the concern over cell growth and replication associated with cancer. New studies suggest that cancerous masses have some stem cells present within them and could be a cause for the expansion of the mass (71). This finding raises concerns with the treatment model of many cancers, as during many of the treatment cycles; stem cells are also introduced to the patient. This can have the unwanted effect of allowing these stem cells to be added to, or changed, by the cancerous mass and allow for the reformation of the cancer in the body at a later time. In addition, the presence of stem cells within cancers has pushed forward the idea that these cell growths are not as different from normal cell replication as once thought (72-73). Due to this, many are rethinking their approaches to cancer treatments and methods of approach.

Another subject of concern with stem cells is the ability to direct their differentiation. This issue comes in no small part from the issue of cell numbers. Since stem cells are so few in number within the body, it is important to be able, not only to direct their development into the cells of interest, but also grow their numbers in a culture. One of the issues found with culturing stem cells is the differentiation of these cells (1, 2). Since the growth medium has an effect on the stem cells due to its components, the cells begin to differentiate. This may result in cells further down a

developmental line which could cause them to be unable to differentiate into the cell line of original interest.

There is also the issue of mobilizing stem cells from certain areas within the body (75). When larger volumes of stem cells are needed for a task, it is beneficial to allow some stem cells from other areas of the body to diffuse to the region of interest. The concern here is how effective the process is with targeting the region which the stem cells should go to, and how many cells need to be mobilized to create the necessary number at that location.

The Recovery of the five senses with stem cells: Are the concepts realistic?

As we know, the five main senses of the human body are: hearing, vision, smell, taste, and touch (77-95). Sensory loss can occur due to nerve damage, head injuries, and ineffective nerve receptors from birth or infections (78, 79). However, sensory loss for the specific senses listed above

come in the form of: deafness, blindness, anosmia, ageusia, and somatosensory loss (usually through paralysis). Various types of stem cells are being used to repair or recover these damaged cells, with the most notable successes in vision and hearing repair (77, 95).

Hearing

How do we hear things? The ear has many parts that allow us to hear (Figure 2). It has the capability of processing sound waves. The most important is the Cochlear region located in the inner ear with portions containing hairs that react to sound waves (receptors for the sound). There are 11,000 of these hair cells which can convert sound waves into electrical signals, which is extremely important in the hearing process. Damage cannot be fixed naturally and has been shown to be irreversible with respect to hair regrowth. The solution is still conceptual.

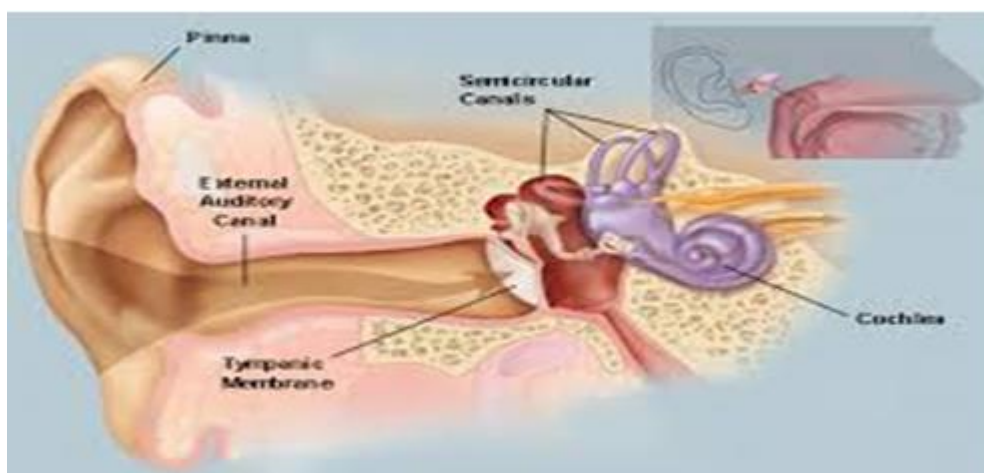


Figure 2. Ear

Stem cells in the cochlea: A concept

Using Induced pluripotency (iPSC), skin cells can be reprogrammed into stem cells. These cells can be implanted into the cochlea. This may allow the hairs inside of the cochlea to regrow. Using stem cell therapy, this is a viable way to improve

hearing in patients with hearing loss. No prosthesis is required; this uses the patient's own cells. No risk of rejection of the organ by the patient is expected (77).

Nerve cells

Directly take the signals produced in the Cochlea to the brain. Scientists have made neuron connections in-vitro with induced

stem cells (77). Experiments involving animals have shown hearing improvement (77). This may be crucial in improving/restoring human hearing. What is the future of hearing? The research and science is still new, the process of using stem cells to cure hearing loss will take time to develop. Research is being done today, leading to advancements for a

better tomorrow.

Vision: Macular degeneration

Macular Degeneration is an eye disease that leads to vision loss. It is caused when the central portion of the retina (macula) begins to deteriorate. The condition begins with a decline in detailed vision, and slowly worsens until central vision is completely lost.

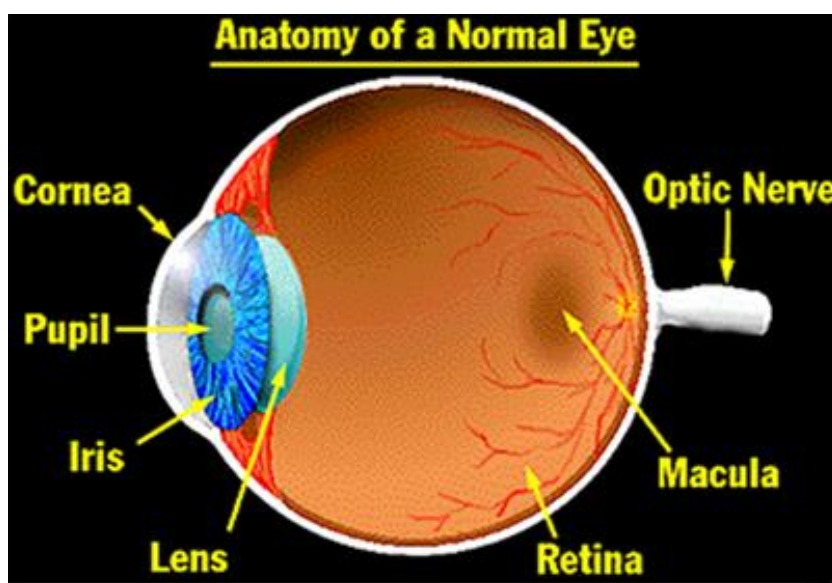


Figure 3. Eye with main parts

Macular degeneration is said to be the biggest candidate for stem cell therapy since it involves the loss of cones, rather than multiple types of cells. Stem cells that have been used in research are: embryonic, fetal, umbilical cord, and bone marrow. The most success has been seen with embryonic stem cells due to their high potency. "ARMD [Age-Related Macular Degeneration] is a common eye problem caused by the loss of cones. Bernier's team has developed a highly effective in vitro technique for producing light sensitive retina cells from human embryonic stem cells. "Our method has the capacity to differentiate 80% of the stem cells into pure cones," Professor Gilbert explained. "Within 45 days, the cones that we allowed to grow towards confluence spontaneously formed organized retinal

tissue that was 150 microns thick." (G. Bernier, Universite de Montreal) (89).

Vision - the optic nerve

Vision loss due to damage of the optic nerve is hard to treat due to the loss of functioning neurons and cells such as oligodendrocytes (89-92). Oligodendrocytes are cells that produce myelin, a fatty substance full of proteins, which surround neurons. Optical Nerve Atrophy is a new and upcoming topic of research in the field of stem cell therapy. We recommend: - <https://www.youtube.com/watch?v=qPQinGzSGFU>

What is the future of vision? Stem cell therapy towards correcting vision has a lot of potential. There are many studies that are directed towards treating the loss of

vision. Scientists are researching ways to “switch on” dormant light-sensitive cells in the retina to cure degeneration. The use of embryonic stem cells is seen as unethical, so researchers are now looking into using menstrual blood (95). It was discovered that menstrual blood has similar stem cell properties to the ones found in the umbilical due to their immaturity (95).

Smell

Humans perceive smells when odor molecules bind to cilia (hair-like receptors in the nose), which trigger neurons at the top of the nasal passage and send an electrical pattern to the brain. In the brain, the pattern is interpreted as a specific odor by the olfactory bulb (Figure 4). Old smells are linked to memory, which allow people to recognize and distinguish between different scents (83-86).

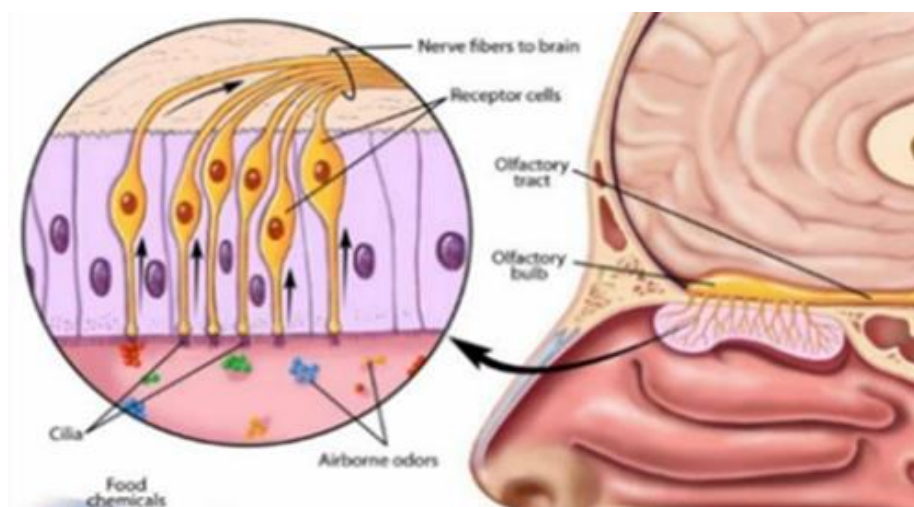


Figure 4. Sense of smell

Anosmia

Anosmia: inability or greatly lessened ability to perceive odor. Some 3-5% of American suffer from anosmia. Current treatment for anosmia is mostly limited to steroids and antibiotics, although there are surgical options for serious cases. Anosmia also affects the way food tastes. Causes: nasal-sinus disease, head trauma, exposure to toxic chemicals, and most commonly, viral infection (86).

Nasal SCs are multipotent: they can turn into neurons or supporting cells of nasal tissue. The Monell research center is cur-

rently researching SC therapy for viral anosmia.

Researchers are attempting to identify and isolate nasal stem cells from healthy volunteers and successfully develop them into olfactory receptor cells in-vitro. Then, the fully functional cells will be transplanted to an anosmiac patient.

Successful Attempts: University of Michigan successfully repaired the cilia of mice with SCs (Figure 5). The use of umbilical cord blood to regrow olfactory cells does present some problems: -Each subset of neurons can only detect specific smells. It will be difficult to make sure the engineered cells send the right signal.

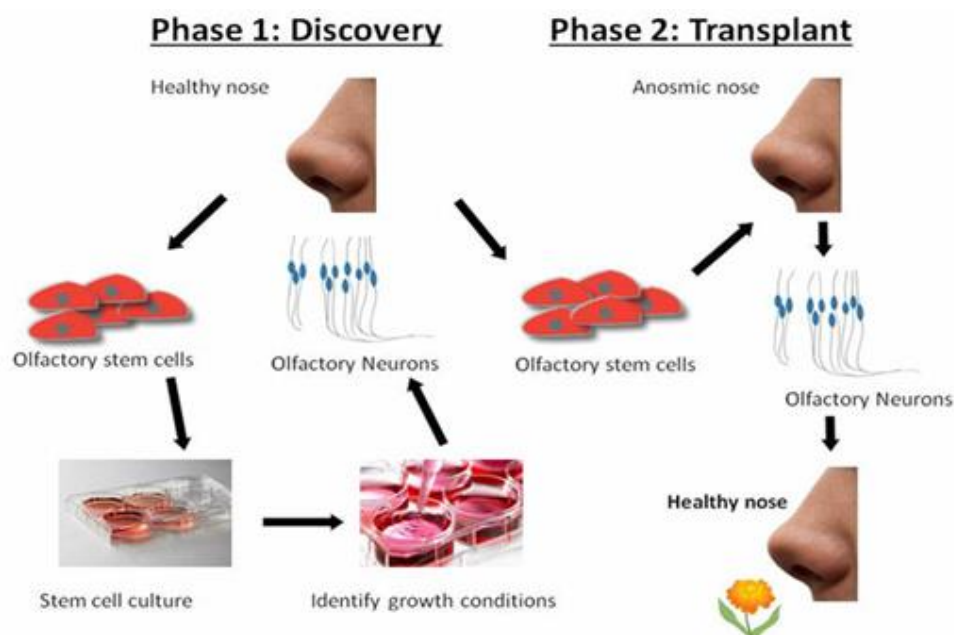


Figure 5. Smell stem cell research

Taste

Ageusia is the loss of the sense of taste (93, 94). There are many potential stem cell treatments to reverse the effects of

ageusia. Taste stem cells have recently been discovered on the surface of the tongue (Figure 6).

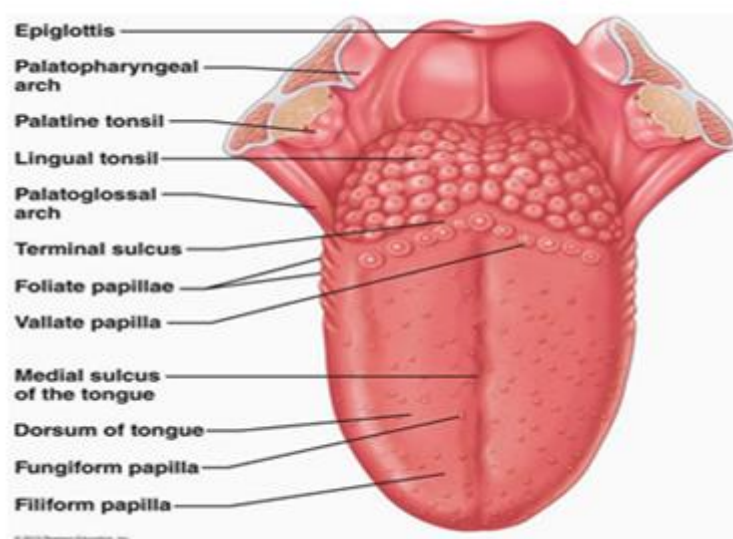


Figure 6. Tongue and gustatory bodies

The discovery of these cells could help restore the taste of patients who have undergone chemotherapy, and the elderly. The taste stem cells have a marker known as Lgr5. The marker was found to be present on two types of cells (94).

The first were strong stem cells found on the surface of the tongue, while the other type lies on a layer beneath. Future studies involving the taste stem cells and Lgr5 will be focused on differentiating the cells into different taste cell types.

The importance of touch

The sense of touch is a very important sense that allows the brain to be alerted to close proximity objects that may be harmful for the body. Discomfort, pain, and irregularities near the body may need immediate action by the brain, and the sense of touch allows the brain to react accordingly. Touch is also an important tool in the psychological development of children. It is also critical in social situations, allowing for trust to be built between people, such as. handshakes, hugs, etc.

How does it work? The sensation of touch is activated for a certain body part when it comes into contact with another object. Nerve endings that are located in the lowest layer of the skin, the Dermis, send signals to the brain and spinal cord when a sensation is triggered we understand that sensation as touch.

How touch can be damaged? Because nearly the entire body can perceive touch, the sense is very vulnerable to damage. Burns and deep cuts can damage the nerves that are responsible for detecting or transmitting the sensation of touch. Even though skin transplants are available, the sense of touch may be compromised due to skin therapy which doesn't include nerve reconstruction. A Japanese team has been able to create

skin using induced pluripotent stem cells (81). They claim that the skin functions normally, able to sense touch, produce sweat and oil, and grow hair. The researchers tested the new skin on mice and saw results within 14 days of the experiment. By furthering this technology to be used on humans, patients with large or significant wounds can recover and/or preserve in the area that has been damaged. In addition to the actual skin and its components, the innervating nerves will also need to be repaired.

Spinal cord injuries can also cause sensory malfunctions in patients, as well as other symptoms ranging from paralysis to chronic pains. By implanting stem cells into a patient's spinal cord, a tissue which cannot naturally regrow, researchers have been able to return sensory perception to patients (81).

Touch for bionic limbs

Researchers are developing technologies that will allow bionic limbs to "feel" touch, heat, and vibrations, similar to human limbs. Still early in the developmental process, the technology can prove revolutionary for people who undergo bionic limb replacement as sensory awareness of the limb is a necessity for its full functionality (Figure 7).



Figure 7. Touch for bionic limbs

The technology currently uses microchips which can mimic human neuron charges, allowing it to generate sensory signals via nerve cells.

Conclusions

Stem cells are a rapidly growing and important part of science and technology of the day. They are being used and researched for many of the diseases we face today and have been shown to be an important, if not necessary, component of most treatments and cures. This use and promise hold true even with our limited knowledge of their full function or potential. It will be critical in the future to further explore these crucial cells for not only their functionality within the body, but how we might be able to modify them for our own purposes. This will require a large commitment to the study of these cells as well as a greater partnership with research and clinical testing.

In the future, research using stem cells will need to develop not only a better method of obtaining these cells, but also an improved method of increasing their numbers. As stated earlier, the ability to keep stem cells at a high level of plasticity in-vitro has been a challenge, and one, which if solved, can be one of the greatest leaps in the field. Another point to contend with going forward is where we think the field of stem cell research should lead us.

Many feel uncertain if stem cells should be used to develop entire cellular systems, as they feel that concerns with cloning could be brought forth.

It is important to keep in mind the importance and promise these cells have. Even with our limited understanding of these cells, we have been able to not only treat, but also cure many disease states which were once thought to be incurable (even if this is still currently at the research and testing level). These giant leaps forward in science and health are too great to overlook and should be kept in the forefront of research, and given as much support as possible for the promises they hold and have even already delivered.

Overall, stem cells are a very promising option to repair sensory loss. There have already been successful attempts with regard to hearing and vision recovery in humans. It is significant fact that neural stem cells reside in well-defined areas of the adult human brain and are capable of generating new neurons throughout the life span (96). There have also been successful attempts in the recovery of the sense of smell and touch in mice, and progress is being made to use these techniques in humans. This research can be monumental for someone who has lost or is currently losing a sense. Does it mean that the future of stem cell research is bright?

References

1. Pavlovic M and Balint B. Stem cells and Tissue Engineering, Springer/Verlag, (2012). ISBN-13: 978-1-4614-5505-9, ISBN: 1-4614-5505-7
2. Pavlovic M and Balint B. Bioengineering and Cancer Stem Cell Concept. Springer/Verlag (2015). ISBN: 978-3-319-25668-9
3. Weimann JM, Johansson CB, Trejo A, Blau HM. (2003) Stable reprogrammed heterokaryons form spontaneously in Purkinje neurons after bone marrow transplant. *Nature Cell Biology*, 5 (11): 959-966
4. Phinney DG, Isakova L. (2005) Plasticity and therapeutic potential of mesenchymal stem cells in the nervous system. *Current Pharmaceutical Design*, 11 (10): 1255-1265
5. Yano S, Kuroda S, Lee JB, Shichinohe H, Seki T, et al. (2005) In vivo fluorescence tracking of bone marrow stromal cells transplanted into a pneumatic in

- jury model of rat spinal cord *Journal of Neurotrauma*, 22 (8): 907-918
6. Brittan M, Braun KM, Reynolds LE, Conti FJ, Reynolds AR, et al. (2005) Bone marrow cells engraft within the epidermis and proliferate in vivo with no evidence of cell fusion. *Journal of Pathology*, 205 (1): 1-13
7. Sigurjonsson AE, Perreault MC, Ege-land T, Glover JC. (2005) Adult human hematopoietic stem cells produce neurons efficiently in the regenerating chicken embryo spinal cord. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102 (14): 5227-5232
8. Wislet-Gendebien S, Hans G, Leprince P, Rigo JM, Moonen G, et al. (2005) Plasticity of cultured mesenchymal stem cells: Switch from nestin-positive to excitable neuron-like phenotype. *Stem cells*, 23 (3): 392-402
9. Forbes SJ, Vig P, Poulson R, Wright NA, Alison MR. (2002) Adult Stem Cell Plasticity: New Pathways of Tissue Regeneration become Visible. *Clin. Sci.* 103, 355-369
10. Ben-Hur T, Einstein O, Bulte JWM (2005) Stem cell therapy for myelin diseases *Current drug Targets*, 6 (1): 3-19
11. Pluchino S, Zanotti L, Deleidi M, Martino G. (2005) Neural stem cells and their use as therapeutic tool in neurological disorders. *Brain research reviews*, 48 (2): 211-219
12. Pluchino S, Martino G. (2005) The therapeutic use of stem cells for myelin repair in autoimmune demyelinating disorders. *Journal of the Neurological Sciences*, 233 (1-2): 117-119
13. Weissman I. (2005) Stem cell research: paths to cancer therapies and regenerative medicine. *JAMA* 294: 11: 1359-66
14. Kucia M, Rea R, Jala VR, Dawn B, Ratajczak MZ, et al. (2005) Bone marrow as a home of heterogeneous populations of nonhematopoietic stem cells. *Leukemia*, 19 (7): 1118-1127
15. Lakshminpathy U, Pelacho B, Sudo K, Linehan JL, Coucouvanis E, Kaufman DS, Verfaillie CM. (2004) Efficient transfection of embryonic and adult stem cells. *Stem Cells* 22(4): 531-43
16. Orlic D, Kajstura J, Chimenti S, Jakoniuk I, Anderson SM, Li B, et al. (2001) Bone marrow cells regenerate infarcted myocardium. *Nature* 410: 701-5
17. Stamm C, Westphal B, Kleine HD, Petzsch M, Kittner C, Klinge H, et al. (2003) Autologous bone-marrow stem-cell transplantation for myocardial regeneration. *Lancet* 361: 45-6
18. Strauer BE, Brehm M, Zeus T, Köstering M, Hernandez A, Sorg RV, et al. (2002) Repair of infarcted myocardium by autologous intracoronary mononuclear bone marrow cell transplantation in humans. *Circulation* 106: 1913-8
19. Assmus B, Schachinger V, Teupe C, Britten M, Lehmann R, Döbert N, et al. (2002) Transplantation of progenitor cells and regeneration enhancement in acute myocardial infarction (TOP-CARE-AMI). *Circulation* 106: 3009-17
20. Tse HF, Kwong YM, Chan JKF, Lo G, Ho C-L, Lau C-P. (2003) Angiogenesis in ischaemic myocardium by intramyocardial autologous bone marrow mononuclear cell implantation. *Lancet* 361: 47-9
21. Perin et al, Perin EC, Dohmann HFR, Borojevic R, Silva SA, Sousa ALS, Mesquita CT, et al. (2003) Transendocardial, autologous bone marrow cell transplantation for severe, chronic ischemic heart failure. *Circulation* 107: 2294-302
22. Obradović S, Rusović S, Dinčić D, Gligić B, Baškot B, Balint B, i sar. (2003) Autologe pluripotentne progenitorne ćelije u lečenju ishemijske bolesti srca. *Vojnosanit pregl* 60(6): 725-31. did not mobilized, they were working with aspirated BM cells
23. Körbling MD, and Estrov ZMD. (2003) Adult Stem Cells for Tissue Re

- pair –A New Therapeutic Concept? *N Engl J Med* 349:570-82
24. Omer N, Koc, Stanton L, Gerson SL, Brenda WC, Laughlin M, Meyerson H, Kutteh L, Fox RM, Emese M. Szekely, Tainer N, and Lazaru HM. Randomized Cross-Over Trial of Progenitor-Cell Mobilization: High-Dose Cyclophosphamide Plus Granulocyte Colony-Stimulating Factor (G-CSF) Versus Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor Plus G-CSF. *J Clin Oncol* 18:1824-1830. © (2000) by American Society of Clinical Oncology
25. Seggewiss R1, Buss EC, Herrmann D, Goldschmidt H, Ho AD, Fruehauf S (2003) G – CSF Kinetic of Peripheral Blood Stem cell mobilization. *Stem Cells*. 21(5):568-74
26. Capoccia BJ, Shepherd RM, and Daniel C. Link (2006) G-CSF and AMD3100 mobilize monocytes into the blood that stimulate angiogenesis in vivo through a paracrine mechanism *Blood* 108(7):2438-2445
27. Valgimigli M, Rigolin GM, Cittanti C, Malagutti P, Curello S, Percoco G, Bugli AM, Della Porta M, Bragotti LZ, Ansani L, Mauro E, Ferrari R. Lanfranchi A, Giganti M, Feggi L, Castoldi G. (2005) Use of granulocyte-colony stimulating factor during acute myocardial infarction to enhance bone marrow stem cell mobilization in humans: clinical and angiographic safety profile *Eur Heart J*. 26(18):1838-45.
28. Priller J (2003)) Adult bone marrow cells populate the brain. *Histochemistry And Cell Biology* 120 (2): 85-91
29. Kucia M, Reza R, Campbell FR, Surma-Zuba E, Majka M, Ratajczak J, and Ratajczak MZ (2006) A population of very small embryonic – like (VSEL) CXR4+SSEA-1+Oct4+ stem cells identified in adult bone marrow. *Leukemia*, 20: 857–69
30. Kucia M. et al. (2006) Cells enriched in markers of neural-tissue committed stem cells reside in the bone marrow and are mobilized into the peripheral blood following stroke. *Leukemia* 20 :18-28
31. Young-sup Y, Wecker A, Heyd L, Park JS, Douglas W, Losordo WD, et al. (2005) Clonally expanded novel multipotent stem cells from human bone marrow regenerate myocardium after myocardial infarction *J Clin Invest*; 115(2): 326–38
32. Huttman A, Li CL, Duhrsen U. Bone marrow-derived stem cells and 'plasticity'. (2003) *Annals of Hematology* 82 (10): 599-604
33. Herzog EL, Chai L, Krause DS (2003) Plasticity of marrow-derived stem cells. *Blood*, 102 (10): 3483-3493
34. Long Y, Yang KY. (2003) Bone marrow derived cells for brain repair: Recent findings and current controversies *Current Molecular Medicine* 3(8): 719-725
35. Muraro PA, Ingoni RC, Martin R. (2003) Hematopoietic stem cell transplantation for multiple sclerosis: current status and future challenges. *Current Opinion In Neurology* 16 (3): 299-305
36. Locatelli F, Corti S, Donadoni C, Guglieri M, Capra F, et al. (2003) Neuronal differentiation of murine bone marrow Thy-1-and Sca-1-positive cells. *Journal of Hematotherapy & Stem Cell Research*, 12 (6): 727-734
37. Hess DC, Hill WD, Carroll JE, Borlongan CV (2004) Do bone marrow cells generate neurons? *Archives of Neurology*, 61 (4): 483-485
38. Vitry S, Bertrand JY, Cumano A, Dubois-Dalcq M. (2003) Primordial hematopoietic stem cells generate microglia but not myelin-forming cells in a neural environment. *Journal of Neuroscience*, 23 (33): 10724-10731
39. Mezey E, et al, Chandross KJ, Harta G, Mak RA, McKercher SR. (2000): Turning Blood into Brain: Cells Bearing Neuronal Antigens Generated in Vivo from Bone Marrow. *Science* 290, 5497:1779 - 1782

40. Brazelton TR, Rossi FM, Keshet GI, Blau HM. (2000) From marrow to brain: expression of neuronal phenotypes in adult mice. *Science* 290 (5497):1775-9
41. Mezey E, Nagy A, Szalayova I, Key S, Bratincsak A, Baffi J, Shahar T. (2003) Comment on Comment on "Failure of bone marrow cells to transdifferentiate into neural cells in vivo", *Science* 299(5610), 1184
42. Mezey E, Chandross KJ, Harta Gy, Maki RA, McKercher SR. (2000) Turning Blood into Brain: Cells Bearing Neuronal Antigens Generated in Vivo from Bone Marrow. *Science* 290, 1775-1779
43. Mezey E, Key S, Vogelsang G, Szalayova I, Lange GD, and Crain B. (2003) Transplanted bone marrow generates new neurons in human brains, *PNAS* 100, 1364-1369
44. Weimann JM, Charlton CA, Brazelton TR, Hackman RC, Blau HM. (2003) Contribution of transplanted bone marrow cells to Purkinje neurons in human adult brains PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF THE UNITED STATES OF AMERICA. 100 (4): 2088-2093
45. Chen J, Zhang ZG, Li Y, Wang L, et al. (2003) Intravenous administration of human bone marrow stromal cells induces angiogenesis in the ischemic boundary zone after stroke in rats. *Circ res*, 92(6):629-9
46. Bang OY, Lee JS, Lee PH, et al. (2005) Autologous mesenchymal stem cell transplantation in stroke patients. *Ann Neurol* 57:874-882
47. Mazzini L, Fagioli F, Boccaletti R, Mareschi K, Madon E, Oliveri G, Olivieri C, Pastore I, Marasso R (2003) Stem cell therapy in amyotrophic lateral sclerosis: a methodological approach in humans, *Amiotroph Lateral Scler Other Motor Neuron Disord* 4(3):158-61
48. Bacman, SR, Bradley, WG, and Moraes, CT (2006) Mitochondrial involvement in amyotrophic lateral sclerosis: trigger or target? *Mol Neurobiol.* 33: 113-131
49. Silani CL, Corbo M, Ciammola A, Polli E (2004) Stem-cell therapy for amyotrophic lateral sclerosis. *The Lancet*, 364, 9429:200-202
50. Clement AM, Nguyen MD, Roberts EA et al. (2003) Wild-type non-neuronal cells extend survival of SOD1 mutant motor neurons in ALS mice. *Science* 302: 113-17
51. Imitola J, Snyder EY, Khoury SJ. (2003) Genetic programs and responses of neural stem/progenitor cells during demyelination: potential insights into repair mechanisms in multiple sclerosis. *Physiological Genomics*, 14 (3): 171-197
52. Peterson DA. (2004) Stem cell therapy for neurological disease and injury. *Panminerva Medica*, 46 (1): 75-80
53. Wan SG., Lu CY, Dong HQ., et al. Autologous peripheral blood stem cell transplantation for severe multiple sclerosis. *Int J Hematol* 2006; 84(3): 276-81
54. Britschgi M & Wyss-Coray T (2007) Immune cells may fend off Alzheimer disease. *Nature Medicine* – 13: 408 - 409
55. Albrecht J, Pérez-Navarro E, Canals JM. (2004) Neurotropic factors in Huntington's Disease. *Prog Brain Res.* 146:195-229.
56. Russel LM (2014). Huntington's disease like-2
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1529/>
57. Hague SM, Klaffke S, Bandmann O (2005) Neurodegenerative disorders. Huntington's disease and Parkinson's disease *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 76(8):1058-63. Review.
58. Anderson KE (2005) Huntington's disease and related disorders *Psychiatr Clin North Am.* 28(1):275-90
59. Huntington's Disease Collaborative Research Group. (1993) A novel gene containing a trinucleotide repeat that is expanded and unstable on Huntington's disease chromosome. *Cell*, 72:971-983

60. Reddy PH, Williams M, Tagle DA (1999) Recent advances in understanding the pathogenesis of Huntington's disease. *Trends Neurosci* 22(6):248-255
61. Ross CA, Margolis RL. Huntington's disease (2001) *Clin Neurosci* 1:142-152
62. McMurray CT (2001) Huntington's disease: new hope for therapeutics. *TINS* 24: S32-S38
63. Cattaneo E, Rigamonti D, Goffredo D (2001) Loss of normal huntingtin function: new developments in huntingtin's disease research. *Trends Neurosci* 24(3):182-188
64. Cha JJ. (2000) Transcriptional dysregulation in Huntington's disease. *Trends Neurosci* 23(9):387-392
65. Beal MF, Hantraye P (2001) Novel therapies in the search for a cure for Huntington's disease. *Proc Natl Acad Sci USA* 98(1):3-4
66. Jackel RJ, Maragos WF (2000) Neuronal cell death in Huntington's disease: a potential role for dopamine. *Trends Neurosci* 23:239-245
67. Schilling G, Coonfield ML, Ross CA. et al. (2001) Coenzyme Q10 and rimegeprant ameliorate motor deficits in a Huntington's disease transgenic mouse model. *Neurosci Lett* 315(3):149-153
68. Rigamonti D, Sipione S, Goffredo D, et al. (2001) Huntingtin's neuroprotective activity occurs via inhibition of procaspase-9 processing. *J Biol Chem* 276:14545-14548
69. Freeman TB, Cicchetti F, Hauser RA, et al. (2000) Transplanted fetal striatum in Huntington's disease: Phenotypic development and lack of pathology. *Proc Natl Acad Sci USA* 97(25):13877-13882
70. Bachoud-Levi AC, Remy P, Nguyen JP, et al. (2000) Motor and cognitive improvements in patients with Huntington's disease after neural transplantation. *Lancet* 356(9246):1975-19
71. Holland EC. (2001) Gliomagenesis: genetic alterations and mouse models. *Nat. Rev. Genet.* 2: 120-129.
72. Ignatova TN, Kukekov VG, Laywell ED, Suslov ON, Vrionis FD, and Steindler DA. (2002) Human cortical glial tumors contain neural stem-like cells expressing astroglial and neuronal markers in vitro. *Glia*: 193-206
73. Stankhova O, Sommer L (2013) Neural crest-derived stem cells In: Mass general Institute for Neurodegenerative Diseases A collaborative effort by UMASS Medical School
74. Klettner A (2004) The induction of heat shock proteins as a potential strategy to treat neurodegenerative disorders. *A Drug News Perspect* 17:299-306
75. Willing AE, Vendrame M, Mallery J, Cassady CJ, Davis CD, Sanchez-Ramos J, Sanberg PR. (2003) Mobilized peripheral blood cells administered intravenously produce functional recovery in stroke. *Cell Transplant* 12(4):447-8
76. Kucia M, Ratajczak J, Ratajczak MZ. (2005) Are bone marrow cells plastic or heterogeneous—that is the question. *Exp Hematol* 33(6): 613-23
77. "Hearing Loss." Harvard Stem Cell Institute. Harvard University. Web. <http://hsci.harvard.edu/hearing-loss-0>.
78. "Stem Cell Therapy." Stanford Initiative to Cure Hearing Loss. Stanford Medicine. Web. <https://hearinglosscure.stanford.edu/research/stem-cell-therapy/>.
79. Mason, Shun. "Stem cell agency's grant to UCLA help set stage for revolutionary medicine." *Science + Technology*. UCLA Newsroom, 29, Jan. 2014. Web. <http://newsroom.ucla.edu/releases/stem-cell-agency-helps-set-the-249953>.
80. "Q How does the sense of touch work?" *The Five Senses*. Qsharecare. Web. <https://www.sharecare.com/health/five-senses/how-sense-of-touch-work>.
81. Gregoire, Carolyn. "How Our Sense of Touch Affects Everything We Do." *Science*. The Huffington Post, 20, Jan. 2015. Web. http://www.huffingtonpost.com/2015/01/20/neuroscience-touch_n_6489050.html.



82. Blais, Mathieu et al. "Concise Review: Tissue-Engineered Skin and Nerve Regeneration in Burn Treatment." *Stem Cells Translational Medicine* 2.7 (2013): 545–551. PMC. Web. 23 Sept. 2016. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3697822/>.
83. Williams, Sarah C. P. "Human Nose Can Detect a Trillion Smells." *Brain & Behavior, Biology. American Association for the Advancement of Science*, 20 Mar. 2014. Web. <http://www.sciencemag.org/news/2014/03/human-nose-can-detect-trillion-smells>.
84. "Anosmia Causes." Research. Monell Chemical Senses Center, Web. http://www.monell.org/research/anosmia/anosmia_causes.
85. English, Taunya. "Can researchers reignite someone's sense of smell through nasal stem cells?" *The Pulse. newsworks*, 27, Feb. 2014. Web. <http://www.newsworks.org/index.php/local/the-pulse/65224-can-researchers-reignite-someones-sense-of-smell-through-nasal-stem-cells>.
86. Lee, Chul Hee et al. "Transplantation of Neural Stem Cells in Anosmic Mice. "Clinical and Experimental Otorhinolaryngology 3.2 (2010): 84–90. PMC. Web. 23 Sept. 2016. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2896738/>.
87. Université de Montréal. "Restoring vision with stem cells." *ScienceDaily. ScienceDaily*, 6 October 2015. Web. <https://www.sciencedaily.com/releases/2015/10/151006085213.htm>.
88. "What is Macular Degeneration." About Macular Degeneration. American Macular Degeneration Foundation. Web. <https://www.macular.org/what-macular-degeneration>.
89. "The eye and stem cells: the path to treating blindness." *Stem cell factsheet. EuroStemCell*, 27 July 2016. Web. <http://www.eurostemcell.org/factsheet/eye-and-stem-cells-path-treating-blindness>.
90. Murnaghan, Ian. "Stem Cells to Treat Blindness." *Stem Cell Therapy. Explore Stem Cells*, 11 Sept. 2016. Web. <http://www.explorestemcells.co.uk/stem-cells-treat-blindness.html>.
91. Wrenn, Eddie. "Making the blind to see: The simple wonder jab that 'could cure sight loss'." *Science. The Daily Mail*, 25 July 2012. Web. <http://www.dailymail.co.uk/sciencetech/article-2178794/Blindness-cured-simply-injection-eye.html>.
92. "Researchers identify elusive taste stem cells." *Stem Cells Transitional Medicine. AlphaMed Press*, March 2013. Web. <http://stemcellstm.alphamedpress.org/site/misc/News117.xhtml>.
93. Monell Chemical Senses Center. "Elusive taste stem cells identified." *ScienceDaily. ScienceDaily*, 4 Feb. 2013. Web. <https://www.sciencedaily.com/releases/2013/02/130204094520.htm>.
94. Khoury M., Alcayaga-Miranda F., Illanes S. E., Figueroa F. E. "The promising potential of menstrual stem cells for antenatal diagnosis and cell therapy." *Frontiers in Immunology*. 2014; 5: p. 205. Web. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4032935/>.
95. Sierra A, Encinas JM and Savatic-Maletic M.:Adult human neurogenesis: from microscopy to magnetic resonance imaging. (2011)*Frontiers in Neuroscience*,5,47:1-18.

Dräger

abbvie



The Makler logo features the word "makler" in a white, cursive script font, set against a solid dark red rectangular background.

THE NUMBER OF CD34⁺ CELL DOSE STRIKINGLY INFLUENCED SURVIVAL AFTER AUTOLOGOUS STEM CELL TRANSPLANTATION IN HODGKIN'S LYMPHOMA PATIENTS

Milena Todorovic Balint^{1,2}, Jelena Jelacic^{1,2}, Bela Balint^{3,4}, Jelena Bila^{1,2}, Darko Antic^{1,2}, Mihailo Smiljanic¹, Nada Kraguljac Kurtovic¹, Dijana Sefer¹, Dragana Vujic^{2,5}, Emilija Lazić⁵, Biljana Mihaljevic^{1,2}

¹Clinic of Hematology, Clinical Center of Serbia, , Belgrade, Serbia; ²Faculty of Medicine, University of Belgrade, Serbia; ³Institute for transfusiology and hemobiology of MMA, Belgrade, Serbia; ⁴Serbian Academy of Sciences and Arts, Belgrade, Serbia; ⁵Institute for Health Care of Mother and Child of Serbia "Dr. Vukan Cupic".

Abstract

Initial hematopoietic improvement and the number of infused CD34⁺ cell correlated with survival in patients with Hodgkin lymphoma (HL) who were treated with high dose therapy and autologous stem cell transplantation (ASCT). In this paper we analyzed the role of infused CD34⁺ cell in 90 Hodgkin lymphoma (HL) patients after ASCT.

The mean number of transplanted CD34⁺ cells in HL patients was 7.15x10⁶/kg. After ASCT, remission (partial/complete) was achieved in 83.3% HL patients. Amongst parameters that influenced survival in HL patients (infused CD34⁺ cell dose, early recovery of lymphocytes, neutrophils, platelets), a multivariate analysis indicated that the number of infused CD34⁺ cells was the most important parameter with impact on survival after ASCT

Keywords: Hodgkin's lymphoma, autologous stem cell transplantation, CD34⁺ cells

Introduction

Autologous stem cell transplantation (ASCT) improves the rate of survival in patients with hematologic malignancies such as relapsed, chemotherapy-sensitive Hodgkin lymphoma (HL) [1]. To identify patients benefiting from ASCT, few parameters were presented to have potential prognostic importance, including early lymphocyte, neutrophil and platelet recovery, infused lymphocyte dose, and the number of infused CD34⁺ cells [2]. Of particular importance is the number of CD34⁺ cells which is a common predictor of the potential engraftment of ASCT [1]. Moreover, there may be a correlation between the number of CD34⁺ cells given with disease relapse, transplant-related mortality, and survival. However, the role

of an infused autograft CD34⁺ cell dose and early lymphocyte, neutrophil, and platelet recovery following ASCT has not been established as standard procedure [2]

Our study evaluated the potential role of clinical and laboratory parameters that might influence survival after ASCT in patients with HL.

Patients and Methods

This retrospective study included a total of 90 patients with HL who underwent ASCT between November of 2006 and June of 2016.

Each patient with HL went through an initial staging evaluation before treatment began, including a physical examina

tion; computer tomography scans of the thorax, abdomen, and pelvis; bone marrow biopsy; and laboratory tests. Patients were staged according to the Ann Arbor staging classification and the International Prognostic Score (IPS) was used for risk stratification [3, 4]. All HL patients were initially treated according to an ABVD protocol (Adriamycin, Bleomycin, Vinblastine and Dacarbasin). Treatment response was evaluated according to current response criteria [5]. After disease relapse was confirmed, salvage chemotherapy was applied and standard procedures of mobilization and collection of autologous stem cells were performed. Apheresis was started upon recovery of $CD34^+$ cells to 20/mikroL. The target cell dose for collection was $\geq 2 \times 10^6 CD34^+$ cell/kg. ASCT products were processed immediately via cryopreservation and were later thawed according to proper procedure. The quantity of $CD34^+$ cells in the leukapheresis component was determined with a flow cytometer. The BEAM conditioning protocol (Carmustine, Etoposide, Cytarabine and Melphalan) was applied in 76 HL patients (84.4%), while 14 patients (15.6%) received the CBV conditioning regimen (Cyclophosphamide, Carmustine and Etoposide). Granulocyte-colony stimulating factor (G-CSF) was administered after ASCT from D+5 and was continued until the absolute neutrophil count (ANC) was at least $1.0 \times 10^9/L$ on two consecutive days. Platelet (PLT) transfusions were administered for patients with PLT of $20 \times 10^9/L$ or lower, or in patients who experienced bleeding.

The study was performed according to the guidelines of the Declaration of Helsinki Principles and Good Clinical Practice.

Statistical Analyses

Descriptive statistics were used to characterize patients' features. After ASCT, overall survival (OS) was measured from

the date of ASCT until the last follow-up or until death from any cause, while event free survival (EFS) was measured from the date of ASCT until the disease progression/relapse or the last follow-up. Survival functions were calculated using the Kaplan-Mayer approach, while a log-rank test was used to compare statistical differences between curves. The absolute lymphocyte count (ALC), and absolute neutrophil count (ANC) were calculated as the product of total white blood cell count and percentage of lymphocytes if calculating for ALC, replacing the percentage of lymphocytes with the percentage of neutrophils for ANC. We calculated that a recovery of ALC of $500 \times 10^6/L$ or greater (ALC500), $ANC \geq 500 \times 10^6/L$ (ANC500) and $PLT \geq 20 \times 10^6/L$ (PLT20), by Day +20, Day +11, and Day +13, respectively, according to previously published data (2). Spearman and Kendall correlation coefficients were used to analyze correlations among variables of interest. Cutoff value of $CD34^+$ cells for HL, in order to predict OS after ASCT, was determined as 25th percentile value of its distribution. Statistical analyses were done using IBM SPSS statistical package (version 21) and R language and environment for statistical computing (version 3.2.2).

Results

The clinical characteristics of 90 HL patients have been summarized in Table 1.

Table 1. Clinical features of Hodgkin lymphoma patients

Patient's features	Patients n (%)
Age at ASCT (years), median (range)	32 (20-52)
M/F ratio	50/40 (55.6/44.4.)
Ann Arbor clinical stage (III-IV)	57 (63.3)
B symptoms: Yes	77 (85.6)
Bulky disease: Yes	44 (48.9)
BM infiltration: Yes	4 (4.4)
IPS	
Low	28 (31.1)
High	62 (68.9)
Conditioning regimen	
BEAM	76 (84.4)
CBV	14 (15.5)
Therapeutic response after first line therapy	
CR	33 (36.7)
PR	11 (12.2)
SD	29 (32.2)
PD	17 (18.9)
Therapeutic response after ASCT	
CR	44 (49.9)
PR	31 (34.4)
SD	3 (3.3)
PD	12 (13.3)
CD34 ⁺	
<5.0x10 ⁶ /kg	20 (22.2)
≥5.0x10 ⁶ /kg	70 (77.8)
CD34 ⁺	
<5.9x10 ⁶ /kg	24 (32.0)
≥5.9x10 ⁶ /kg	51 (68.0)
ALC	
≥20x10 ⁹ /L	24 (26.7)
<20x10 ⁹ /L	63 (70.0)
NA	3 (3.3)
ANC	
≥11x10 ⁹ /L	63 (70.0)
<11x10 ⁹ /L	26 (28.9)
PLT	
>13x10 ⁹ /L	32 (35.6)
≤13x10 ⁹ /L	58 (64.4)
Relapse after ASCT	31/75 (41.3%)
Vital status: Alive	34 (69.4)
Dead	15 (30.6)

The average number of transplanted CD34⁺ cells in HL patients was 7.15x10⁶/kg (range 2-25x10⁶/kg) suspended in an average volume of 250 ml (range 100-650ml). Twenty patients (22.2%) had CD34⁺ cell doses of <5.0x10⁶/kg. The mean duration of aplasia was 11 days (4-28). The median time for

ALC500 recovery was 16 days (9-31), ANC500 was 12 days (6-26), and PLT20 was 12 days (5-44). After ASCT, 12 patients (13.3%) had disease progression (PD), 3 had stable disease (SD) (3.3%), 31 had a partial response (PR) (34.4%), and 44 had a complete response (CR) (48.9%). There was not a strong correlation between achievement of CR and CD34⁺ cell doses, or recovery of ALC500, ANC500 and PLT20, or disease relapse. There was no difference regarding the clinical characteristics of patients who had received <5.0x10⁶/kg CD34⁺ cells compared to those who had received ≥5.0x10⁶/kg CD34⁺ cells. Transplant-related mortality was less than 2.0%.

Survival Analysis

The median follow-up time for patients with HL was 67 months (range 12-192 months). There was no difference in OS and EFS regarding gender, presence of B symptoms, whether or not patients had the bulky form of the disease, or Ann Arbor clinical stage ($p>0.05$). Median EFS after ASCT was 20 months (range 1-119 months), and median OS after ASCT was 38 months (3-119 months). Initial IPS influenced EFS (Log Rank=6.00, $p=0.015$), but not OS (Log Rank=3.47, $p=0.062$). Treatment response after ASCT strongly influenced both EFS and OS (Log Rank=86.62, $p=0.0001$; Log Rank=122.351, $p=0.0001$). Survival of the patients with PD and SD was poor with a median survival of less than 12 months. The patients who experienced a favorable treatment response (CR/ PR) and had received a lower dose of CD34⁺ cells (≤5x10⁶/kg) experienced inferior OS and EFS (Figure 1) after transplantation.

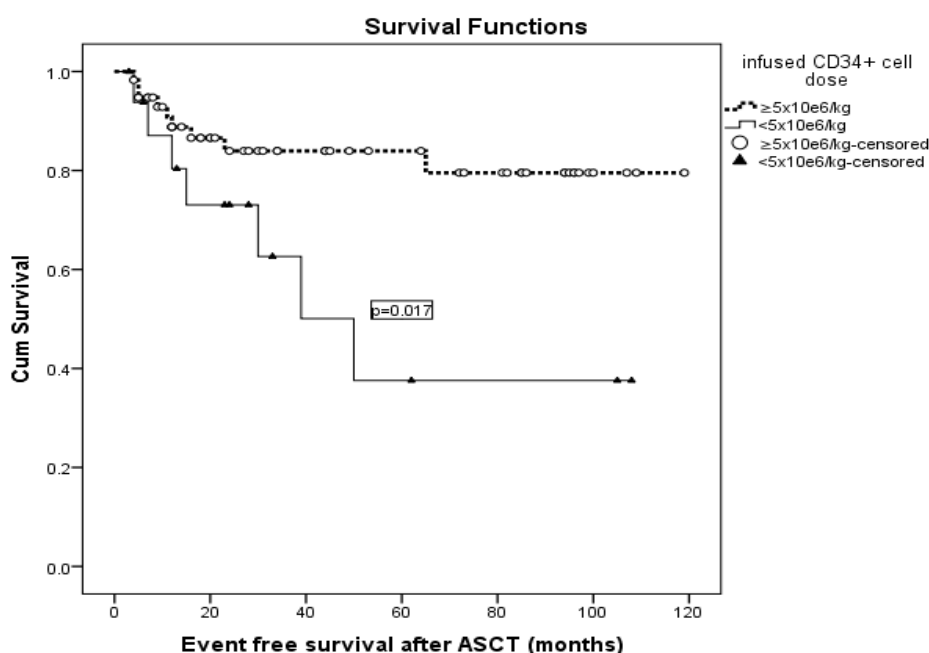


Figure 1. Graphic presentation of event free survival (EFS) after autologous stem cell transplantation (ASCT) according to infused CD34⁺ cell dose in Hodgkin lymphoma patients.

Furthermore, OS was influenced by a prolonged recovery of ALC500 ≥ 20 days (Log Rank=5.7, $p=0.017$) as well as EFS (Log Rank=4.34, $p=0.037$). Moreover, patients who were observed to have a cell recovery of ANC500 by Day +11 correlated with improved OS (Log Rank=3.99, $p=0.49$); additionally, this cell recovery had a borderline significant effect on EFS (Log Rank=3.58, $p=0.058$). Early PLT recovery by Day +13 was associated with improvement in both OS (Log Rank=6.62, $p=0.010$) and EFS (Log Rank=5.02, $p=0.025$). Different conditioning regimens (BEAM vs. CBV) influenced neither EFS nor OS ($p>0.05$).

Discussion

Published data pointed out that many clinical and laboratory variables after ASCT were connected with better survival [2,6,7]. However, there is no firm evidence as to which parameter represents the best survival predictor.

Early lymphocyte, neutrophil and platelet recovery were reported to influence OS and EFS after ASCT in patients

with NHL, HL [1,2,6]. Our results suggest that a delayed recovery of ALC500 after Day +20, ANC500 after Day +11, and PLT after Day +13 were associated with inferior OS and EFS in HL.

Even though CD34⁺ cell dose was analyzed as a potential parameter that might influence early recovery of ALC500, ANC500 and PLT20 after ASCT, this was not the case as determined by our study [2,7]. The absence of any strong correlation between blood cell recovery and the number of infused CD34⁺ cell in our study may be the result of additional variables such as the different pre-transplantation conditioning protocols that were administered to patients. Although we have not demonstrated differences regarding survival, our data supports the results of some previous studies that have suggested there might be a survival benefit from receiving higher CD34⁺ cell doses [2,6,7]. The patients with HL who had lower CD34⁺ cell doses had shorter EFS as well as OS. Furthermore, the study in question demonstrated that ALC by Day +15 was an independent prognostic indicator for the progression to free survival

(but not prognostic for OS), indicating faster overall recovery caused by CD34⁺ cell doses. Delayed ALC recovery and lower CD34⁺ cell doses may allow minimal residual disease to outgrow and overcome immunologic activity. In addition, recent studies recommend the possible task of lymphocyte subsets that contribute to early immune reconstitution, and may have a protecting role against residual disease [8].

Not only did CD34⁺ cell dose independently influenced survival, clinical parameters present at diagnosis such as IPS in HL showed prognostic significance on EFS after ASCT, though not on OS. This may suggest that high dose chemotherapy followed by ASCT overcomes the negative prognostic role of high risk IPS.

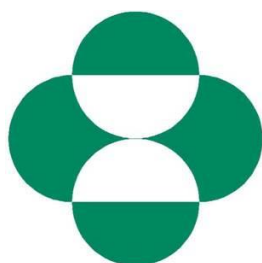
Our study pointed out the prognostic role of CD34⁺ cell doses as an easy demonstrable parameter that might influence survival after ASCT in HL patients.

References

1. Porrata LF, Inwards DJ, Micallef IN, Ansell SM, Geyer SM, Markovic SN. Early lymphocyte recovery post-autologous haematopoietic stem cell transplantation is associated with better survival in Hodgkin's disease. *Br. J. Haematol* 2002;117:629–633.
2. Yoon DH, Sohn BS, Jang G, Kim EK, Kang BW, Kim C, Kim JE, Kim S, Lee DH, Lee JS, Park SJ, Park CJ, Huh J, Suh C. Higher infused CD34⁺ hematopoietic stem cell dose correlates with earlier lymphocyte recovery and better clinical outcome after autologous stem cell transplantation in non-Hodgkin's lymphoma. *Transfusion* 2009;49:1890–1900.
3. Carbone PP, Kaplan HS, Musshoff K, Smithers DW, Tubiana M. Report of the Classification. *Cancer Res* 1971;31:1860–1861.
4. Hasenclever D, Diehl V. A prognostic score for advanced Hodgkin's disease. International Prognostic Factors Project on Advanced Hodgkin's Disease. *N. Engl. J. Med* 1998;339:1506–1514.
5. Cheson BD, Horning SJ, Coiffier B, Shipp MA, Fisher RI, Connors JM, Lister TA, Vose J, Grillo-López A, Hagenbeek A, Cabanillas F, Klippenstein D, Hiddemann W, Castellino R, Harris NL, Armitage JO, Carter W, Hoppe R, Canellos GP. Report of an international workshop to standardize response criteria for non-Hodgkin's lymphomas. NCI Sponsored International Working Group. *J. Clin. Oncol* 1999;17:1244.
6. Mavroudis D, Read E, Cottler-Fox M, Couriel D, Molldrem J, Carter C, Yu M, Dunbar C, Barrett J. CD34⁺ cell dose predicts survival, posttransplant morbidity, and rate of hematologic recovery after allogeneic marrow transplants for hematologic malignancies. *Blood* 1996;88:3223–3229.
7. Gordan LN, Sugrue MW, Lynch JW, Williams KD, Khan SA, Moreb JS. Correlation of early lymphocyte recovery and progression-free survival after autologous stem-cell transplant in patients with Hodgkin's and non-Hodgkin's Lymphoma. *Bone Marrow Transplant* 2003;31:1009–1013.
8. Skerget M, Skopec B, Zontar D, Cernelc P. Mobilization with cyclophosphamide reduces the number of lymphocyte subpopulations in the leukapheresis product and delays their reconstitution after autologous hematopoietic stem cell transplantation in patients with multiple myeloma. *Radiol. Oncol* 2016;50:402–408.



APTUS d.o.o.



MSD



MANAGEMENT OF PATIENTS WITH ACUTE PULMONARY THROMBOEMBOLISM

Slobodan Obradovic^{1,2}, Boris Dzudovic^{1,2}, Bela Balint^{2,3,4}

¹Clinic of Emergency Medicine of MMA, Belgrade, Serbia; School of Medicine, University of Defense, Belgrade, Serbia; ³Institute of Transfusiology and Hemobiology of MMA, Belgrade, Serbia; ⁴ Serbian Academy of Science and Art, Belgrade, Serbia.

Acute pulmonary embolism (PE) is the third most frequently cause of vascular death after myocardial infarction and stroke. The incidence is about 100 per 100.000 inhabitants per year (1) and early mortality depends mostly on the clinical presentation with or without acute heart and respiratory failure and later mortality depends on comorbidities which are very often present in those patients, especially malignant and autoimmune diseases. Treatment of acute PE is based on the risk assessment of patients which can be done continuously during the early treatment (2). The patients with high risk are hypotensive, they are in circulatory shock, and they have hospital mortality rate above 20%. High-risk patients need immediate reperfusion therapy with either systemic, or catheter thrombolysis, or with mechanical removal of thrombus using surgical or percutaneous techniques. The differential diagnosis of acute circulatory shock may be many diseases which can mimic or even be associated with PE. The biggest problems are internal bleeding after surgery and acute heart failure in various settings; however, severe dyspnea which is characteristic of large PE with nonspecific electrocardiography changes leads to proper diagnostic algorithm using urgent cardiac ultrasound and multi detector computed pulmonary angiography (MDCT-PA). Patients with intermediate risk PE have right ventricle (RV) dysfunction cause by the thrombus overload in the pulmonary tree with high systolic pressure, larger diastolic diameter, hypo or akinesia of the free RV wall (Mc Connell

sign) and diminished tricuspid annulus movements. Transthoracic cardiac ultrasound is most often used for the estimation of right ventricle function in PE at admission and afterwards (3). The problems are that some changes in RV function might be presented before acute PE and sometimes is very difficult to separate those premorbid and PE caused changes in RV function. The most often premorbid comorbidities which can cause chronic RV changes are left ventricle heart failure and chronic lung diseases especially chronic obstructive lung disease. Some acute processes also can cause acute RV dysfunction such as large pneumonia, acute left heart failure and acute respiratory distress. Some laboratory and clinical markers can further add to risk assessment in intermediate risk patients (4). Simplified pulmonary embolism severity index (sPESI) is clinical score which is also used in the risk stratification of intermediate risk PE (5). Simplified PESI is consisted of several easily obtained patient characteristics, in which 3 is connected to the clinical state of patients at presentation (oxygen saturation, arterial pressure and tachycardia) and 3 most important parameters which are characteristics of the patients (age, presence of chronic lung or heart failure and malignant disease). The presence of at least one sPESI risk factor means 10% 1-month mortality compared to almost 0% mortality in patients without any. Patients with intermediate risk PE without positive biomarkers should be also stratified by sPESI score and if it is 1 or above, patients should be hospitalized.

Real low risk patients are those without positive markers and RV dysfunction, haemodynamically stable and with 0 sPESI

score. They can be treated out of hospital with ambulance control. Thus management of PE patients is based on early PE diagnosis and risk assessment (Table 1).

Table 1.
Management and some key points for treatment of patients with PE according to risk assessment at presentation.

Low-risk	No hemodynamic compromise No RV dysfunction sPESI should be 0 for the really low-risk PE For diagnosis d-dimer, clinical probability assessment and MDCT-PA is mandatory Trend to ambulance treatment Introduction of direct oral anticoagulant drugs without heparin therapy Good prognosis
Intermediate-low risk	No hemodynamic compromise RV dysfunction is present Negative biomarkers For diagnosis d-dimer, clinical probability assessment and MDCT-PA is mandatory If sPESI is 0 – ambulance treatment should be considered Early introduction of direct oral anticoagulants Mortality depends on comorbidities Good prognosis in majority
Intermediate-high risk	Patients are at the edge of hemodynamic compromise Echocardiography assessment is very important MDCT-PA mandatory Biomarkers are positive In-hospital mortality is probably higher than 10% It would be wised to start anticoagulant therapy with heparins considering the possibility of deterioration and renal function Monitoring is necessary whenever patient is unstable Patients who developed hemodynamic deterioration should be treated with reperfusion and other necessary symptomatic therapy
High-risk	Patients are in shock. The state can be extremely unstable Diagnostic procedure is very cumbersome but every effort should be made to perform MDCT-PA Echocardiography and Doppler venosonography can be surrogate for MDCT-PA Fast reperfusion therapy is necessary with systemic thrombolysis in patients with low risk for major-uncontrolled bleeding In patients with firm contraindication for systemic thrombolysis catheter thrombolysis or mechanical removal of thrombus should be performed. In hospital mortality is higher than 30%. Careful bridging from heparins to oral anticoagulants

There are several caveats with current PE recommendation management mainly based on European Society of Cardiology guidelines.

1. Risk assessment according to age. Risk assessment method probably should be different for younger and elderly patients. The cardiovascular reaction to acute PA obstruction with thrombus depends on age. Younger patients are very difficult to break and they will hold arterial blood pressure with compensatory tachycardia to enormous extent with sudden breakdown of arterial pressure. Thus tachycardia should be better sign of haemodynamic compromise than arterial hypotension in younger patients. On the opposite, elderly patients would not achieve such extreme compensatory heart rate and they will develop arterial hypotension before extreme tachycardia.

2. Slow thrombolytic protocols for intermediate-high risk PE. Avoidance of thrombolytic therapy in intermediate risk PE is recommended after results of large randomized PEITHO study which investigate the role of tenecteplase in patients with troponin positive intermediate risk PE. Tenecteplase did not decrease mortality but increase major bleeding including intracranial bleeding. However, there are some serious concerns about the methodology in this study. More than one third of patients had more than 75 years, echocardiography criteria was soft and use of troponin at any level above normal favors elderly patients with renal dysfunction. The second problem is that tenecteplase is the thrombolytic that cause intracranial bleeding more often than other thrombolytics (7). And why we should use full dose bolus thrombolysis like in PEITHO study with no chance to control anything after the “bomb” is delivered. Slow protocol (streptokinase 100.000 IU/h or alteplase 5 mg/h or catheter thrombolysis with even slower alteplase infusion) may be safer because we can interrupt thrombolysis at the minor suspicion of bleeding

and we have time to monitor patient carefully and measure several parameters which can tell us what is the risk for bleeding and if the bleeding is ongoing like fibrinogen, red blood cells, hematocrit etc.

3. Assessment of bleeding risk. In the current guidelines, there are very little data about the estimation the risk for bleeding. We think that intermediate-high risk PE patients, especially younger patients should be treated with reperfusion therapy using the estimation of bleeding risk. The appropriate score should take into account some important features of PE patients, very often presence of recent surgery, malignant disease, previous use of drugs which can contribute to bleeding, renal function, history of bleeding, age etc.

4. Management of PE patients admitted in resuscitation. How to diagnose and treat patients with PE admitted in resuscitation? Risk factors for PE and signs of deep vein thrombosis could lead to suspicion of PE. ECG may be very variable, tachycardia with signs of acute RV overload, bradycardia, AV blocks, supraventricular tachyarrhythmias etc. Ventricular tachycardia and fibrillation are relatively rare before use of catecholamine and inotropes. The presence of dyspnea before loss of conscious witnessed by bystander may be a lead to PE diagnosis. Urgent echocardiography should be used during the resuscitation, however it is not easy to interpret the imaging and its quality is not satisfactory in a large number of patients. Nevertheless if we have high suspicious for PE, what therapy should be given? Tenecteplase, the only bolus thrombolytic agent is expelled from the guidelines. The right choice of thrombolytic protocol may be of importance even here. Bolus of reduced dose of alteplase may be a solution. Treatment of various diseases is based on guidelines which are based on clinical trials and medical experience. The number and quality of clinical studies are very different among different diseases. For in-

stance, in myocardial infarction there are several hundred of trials with huge number of patients, more homogenous patients and the quality of treatment is on the very high level with strong evidence strength for recommendations. For pulmonary embolism, the causes of the disease are of extreme importance for diagnosis, therapy and outcome, with a huge spectrum of possibilities and because of that it is very difficult to create and carried out randomized studies with enough number of homogenous PE cohort to have power to firmly conclude something to some subgroup of PE patients.

The field of PE is an extremely important and complex with a lot of work in front of us to established better guidelines for management PE.

Literature

1. Heit JA. The epidemiology of venous thromboembolism in the community. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2008; 28(3): 370–2.
2. Konstantinides SV, Torbicki A, Agnelli G, Danchin N, Fitzmaurice D, Galiè N, et al. 2014 ESC guidelines on the diagnosis and management of acute pulmonary embolism. Task Force for the Diagnosis and Management of Acute Pulmonary Embolism of the European Society of Cardiology (ESC). *Eur Heart J* 2014; 35(43): 3033–69.
3. Mos IC, Klok FA, Kroft LJ, de Roos A, Huisman MV. Imaging tests in the diagnosis of pulmonary embolism. *Semin Respir Crit Care Med* 2012; 33(2): 138–43.
4. Giannitsis E, Katus HA. Biomarkers for Clinical Decision-Making in the Management of Pulmonary Embolism. *Clin Chem* 2017; 63(1): 91–100.
5. Zhou XY, Ben SQ, Chen HL, Ni SS. The prognostic value of pulmonary embolism severity index in acute pulmonary embolism: a meta-analysis. *Respir Res* 2012; 13: 111.
6. Meyer G, Vicaut E, Danays T, Agnelli G, Becattini C, Beyer-Westendorf J, et al. PEITHO Investigators. Fibrinolysis for patients with intermediate-risk pulmonary embolism. *N Engl J Med* 2014; 370(15): 1402–11.
7. Marti C, John G, Konstantinides S, Combescure C, Sanchez O, Lankeit M, Meyer G, Perrier A. Systemic thrombolytic therapy for acute pulmonary embolism: a systematic review and meta-analysis. *Eur Heart J* 2015; 36(10): 605–14.



EKSTRAKORPORALNA IMUNOMODULACIJA – PRIMENA FOTOFEREZNIH POSTUPAKA U TRANSPLANTACIJSKOJ MEDICINI

Gordana Ostojić^{1,2}, Milena Todorović^{3,4}, Valentina Balint⁴,
Aleksandar Jevtić¹, Marika Ljubenov^{1,2}, Bela Balint^{1,2,5}

¹Vojnomedicinska akademija, Beograd; ²Medicinski fakultet VMA, Univerzitet odbrane, Beograd; ³Klinika za hematologiju, Klinički Centar Srbije, Beograd; ⁴Medicinski fakultet Univerziteta u Beogradu; ⁵ Srpska akademija nauka i umetnosti, Beograd, Srbija.

Sažetak

Fotofereza ili ekstrakorporalna fotoimuno terapija (EKF) je postupak koji se koristi da spreči ili leči bolest "kalem protiv domaćina" (graft versus host disease – GVHD) ali i neke druge bolesti. Trenutno je fotofereza odobrena od Ureda za hranu i lekove (USA Food and Drug Administration-FDA) za lečenje kožnih manifestacija T-ćelijskog limfoma, gde je stopa odgovora dosta visoka. Uspešnost ekstrakorporalne fotoimuno terapije je potvrđena u malim grupama bolesnika sa akutnim i sa hroničnim GVHD. Mehanizam delovanja EKF-e nije potpuno razjašnjen, istraživanja pokazuju da EKF dovodi do apoptoze limfocita T, diferencijacije monocita u dendritiske ćelije koje zatim fagocitiraju apoptozirane limfocite, i dovodi do promene obrasca proizvodnje citokina, iz pro-inflamacijskih u anti-inflamacijske, kao i stimulacije stvaranja regulacijskih limfocita T uz uspostavljanje imunske tolerancije. Minimalni neželjeni efekti kod bolesnika podvrgnutih EKF-i uključuju hipotenziju i sinkope kao rezultat obimnih promena cirkulišućeg volumena tokom leukaferenze, moguće probleme sa venskim pristupom, temperaturom i groznicom koji su najverovatnije posledica oslobođenih citokina. Moguća su i trovanja citratom tokom afereze ali se mogu sprečiti primenom kalcijuma.

Ključne reči: citafereza, fotofereza, limfociti, imunomodulacija

Uvod

Fotofereza ili ekstrakorporalna fotoimuno terapija (EKF) je postupak koji se koristi da spreči ili leči bolest "kalem protiv domaćina" (graft versus host disease – GVHD) ali i neke druge bolesti. Ovaj postupak je još jedan način pokušaja da se suzbije dejstvo donorskih limfocita da stimulišu imunsku reakciju i razvoj GVHD. Odobrena od strane Ureda za hranu i lekove (USA Food and Drug Administration-FDA) za lečenje naprednog kožnog T-ćelijskog limfoma (CTCL) od 1988. godine (1–5).

Akutna i hronična bolest "kalem protiv domaćina" (aGVHD i cGVHD) i dalje je jedna od glavnih komplikacija i

ograničenja uspešnosti transplantacije matičnih ćelija hematopoeze (MČH). Mnoštvo različitih imunosupresivnih i imunomodulatornih modaliteta su testirani u rešavanju cGVHD, među njima i ekstrakorporalna fotofereza. Trenutno je fotofereza odobrena od FDA za lečenje kožnih manifestacija T-ćelijskog limfoma, gde je stopa odgovora dosta visoka. Uspešnost ekstrakorporalne fotofereze je potvrđena u malim grupama bolesnika sa akutnim i sa hroničnim GVHD. U aGVHD kože i jetre rezistentnim na primenu steroida, zabeležen je odgovor u više od 60%, posebno kod bolesnika sa manje teškim oblicima bolesti. Postoji više iskustava u tretmanu cGVHD; ukupna

stopa odgovora od 50% i više je kod bolesnika sa promenama oralne sluznice, na koži, oku, jetri, gastrointestinalno ili na plućima (6–23). Saopštenja jednog od centara (1) govori o analizi 63 bolesnika koji su imali tri ili manje imunosupresorske linije, uključujući takrolimus i steroide, gde je ukupna stopa odgovora bila 59% (N = 37), a kompletni odgovori su viđeni u 13 bolesnika. Najbolji odgovori su primećeni u lečenju GVHD kože, jetre, oralne sluznice i oka. Kod bolesnika sa c-GVHD i Bronchiolitis obliterans sindromom, EKF ima cilj da odloži inflamacijski proces i time smanji respiratorni pad plućne funkcije, umesto otklanjanja samog oštećenja. Preliminarni rezultati u literaturi pokazuju da EKF može efikasno poboljšati/usporediti pad plućne funkcije u cGVHD bolesnika sa Bronchiolitis obliterans sindromom posle neuspeha standardnim lečenjem (24). Rezultati mnogih studija ukazuju na aktivnost EKF-e u a/cGVHD, koji zahtevaju dalju evaluaciju ove terapije u dobro dizajniranim, kontrolisanim studijama (15–28).

Postoje odobreni, potpuno integrisani sistemi za upravljanje autolognom terapijom imunskim ćelijama kroz ekstrakorporalnu fotoferezu koji se koriste u mnogim medicinskim centrima, za lečenje u više od 30 zemalja sa više od milion urađenih tretmana.

Najnovija generacija fotofereznog sistema, kombinuje kolekciju ćelija, fotoaktivaciju i reinfuzionu tehnologiju u jednom, integrisanom, zatvorenom sistemu, koji omogućava korišćenje procesa koji može da smanji rizik od infekcije, unakrsne kontaminacije i reinfuzione greške bolesniku. Ovaj sistem takođe smanjuje vreme tretmana na pola, od 3 sata na 1,5 sati, što svakako pogoduje bolesnicima ali i osoblju.

Princip rada se zasniva na radu aparata koji izdvaja limfocite iz krvi i meša ih sa fotosenzitivnim 8-methoxypsoralenom (8-MOP), sredstvom koje postaje aktivno

kada je izloženo ultraljubičastom A (UVA) zračenju unutar mašine. Na kraju se limfociti i ostatak bolesnikove krvi ponovo infuduju bolesniku. Funkcija limfocita se tokom fotofereze menja. Kada tretirani limfociti ponovo budu infundovani mogu stimulisati imunski odgovor u telu da se bori u razvoju ili progresiji GVHD (6–14). Fotofereza se može koristiti samostalno ili u kombinaciji sa drugim tretmanima.

Patofiziologija GVHD i primena EKF

Iako patofiziologija GVHD nije potpuno razjašnjena, smatra se posledicom aktivnosti davačevih aloreaktivnih limfocita T, limfocita B i NK-ćelija.

U životinjskom modelu, GVHD se pokreće oštećenjem tkiva kao posledica toksičnosti, tj. oslobađanjem inflamacijskih citokina. Druga faza se javlja sa infuzijom zrelih limfocita davaoca koji se nalaze u graftu promovšući aktivaciju i proširenje ovih limfocita pri kontaktu sa antigen prezentujućom ćelijom (APC) – koja izražava različite antigene domaćina. U završnoj efektorskoj fazi, ovi aloreaktivni T limfociti se proširuju na citotoksične efektorske T limfocite koji izazivaju dalje oštećenje tkiva i oslobađanje više inflamacijskih citokina. Ovaj model pojednostavljuje kompleksne patofiziološke mehanizme ovog poremećaja, ali donekle pruža okvir za procenu potencijalnih terapijskih mogućnosti. Dok eksperimentalni i klinički dokazi podržavaju koncept nastanka cGVHD kao autoimunskog poremećaja, postoji nemogućnost da se izoluju T-ćelijski klonovi proistekli od davaca, kod ljudi, koji prepoznaju nopolimorfne antigene izražene u davaoca i primaoca (5).

EKF predstavlja alternativnu terapijsku strategiju, trenutno je odobrena od Ureda za hranu i lekove za lečenje kožnih manifestacija T-ćelijskog limfoma, gde je stopa odgovora dosta visoka. Uspešnost ekstrakorporalne fotohemoterapije je potvrđena

u malim grupama bolesnika i sa akutnim i sa hroničnim GVHD (6–14).

Mehanizam delovanja EKF-e nije potpuno razjašnjen, istraživanja pokazuju da EKF dovodi do apoptoze limfocita T, diferencijacije monocita u dendritiske ćelije koje zatim fagocitiraju apoptozirane limfocite i dovodi do promene obrasca proizvodnje citokina, iz pro-inflamacijskih u anti-inflamacijske, kao i stimulacije stvaranja regulacijskih limfocita T uz uspostavljanje imunske tolerancije (15, 16). S obzirom na to da je tokom EKF-e manje od 10% cirkulišućih limfocita izloženo djelovanju 8-MOP i UVA zračenju, malo je verovatno da je apoptoza limfocita jedini mehanizam odgovoran za zapaženi terapijski efekat (15–25). EKF ne indukuje apoptozu monocita, već fotoaktivacija izaziva njihovu diferencijaciju u nezrele plazmacitoidne dendritiske ćelije sposobne za fagocitozu apoptoziranih limfocita. Aktivnost fotoaktiviranih monocita i fagocitoza apoptoziranih limfocita uzrokuju promene imunskog odgovora putem različitih efektorskih mehanizama koji uključuju dendritiske ćelije, regulacijske ćelije i promenu obrasca citokinskog odgovora. Lečenje EKF-om uzrokuje promene imunskog statusa bolesnika, uključujući normalizaciju odnosa CD4+/CD8+ ćelija, povećanje broja CD4+CD25+ regulacijskih limfocita T, povećanje broja CD3-/CD56+ NK-ćelija, smanjenje sposobnosti APC i dendritskih ćelija u stimulaciji limfocita T, te supresiju CD8+ efektorskih limfocita T (5, 18–22). Analiza protočnom citometrijom je pokazala značajno povećanje ćelijske smrti nakon EKF-e naročito CD4+ T limfocita kao što je opisano u literaturi i u korelaciji je sa vrednostima hematokrita (26). Najzanimljiviji podaci proizlaze iz analize protočne citometrije, odnosno citotoksičnog dejstva NK ćelija, tj. analize površinske ekspresije CD107a u prisustvu ciljnih ćelija (K562).

U svim analiziranim uzorcima je moguće dokumentovati statistički značajno smanjenje citotoksičnog dejstva NK ćelija nakon fotoaktivacije. EKF ispoljava izraziti i značajan inhibitorni efekat na citotoksično dejstvo NK ćelija. Ove studije pokazuju da se niže vrednosti hematokrita povezuju sa boljim ishodom lečenja (26). U bolesnika s razvijenim cGVHD-om zapažen je deficit regulacijskih limfocita T, a normalizacija njihovih vrednosti povezana je s kliničkim poboljšanjem (20–22). U grupi bolesnika hrvatskih autora odnos CD4+/CD8+ ćelija je bio snižen pre početka EKF-e, dok se tokom EKF-e normalizovao kod bolesnika sa poboljšanjem kliničkog stanja; slično je zapaženo i za broj NK-ćelija (5).

Apsolutni broj i procenat CD4+ T ćelija i T regulacijskih ćelije (CD4+ CD25+ FokP3+ CD127dim /-) su procenjeni koristeći protočnu citometriju u 32 bolesnika sa cGVHD lečenih EKF-om od najmanje tri do 12 meseci. Vrednosti CD4+ ili T regulacijskih limfocita na početku lečenja i do 12 meseci posle EKF-e su upoređivane sa promenama kože ili zahvaćenosti predilekcionih organa, odnosno sposobnosti da se smanjuju doze steroida, na 14, 28, i 56 nedelja. Nakon EKF-e procentualno su regulacijski T limfociti značajno porasli iznad bilo kakvih ukupnih promena u procentu CD4+ na 6, 9 i 12 meseci. Nije bilo statistički značajne povezanosti između regulacijskih T limfocita ili odgovora na terapiju steroidima, dok je veći porast broja CD4+ računat sa polaznim vrednositima, od jedan do tri meseca, i odgovara povećanju mogućnosti da se smanji doza steroida za 50% ili više na 14 nedelja. Broj i procenat regulacijskih T limfocita varira u velikoj meri među bolesnicima sa cGVHD, kao i povećanje posle EKF-e koje nije bilo značajno do 6 meseci. Korelacija između regulacijskih T ćelija i kliničkog poboljšanja ukazuje da povećanje broja i/ili proporcija T ćelija

nije vodeći mehanizam koji objašnjava odgovor nakon EKF-e (27).

EKF je odgovorana za mnoge događaje u ćelijama, od kojih je najvažniji indukcija ćelijske apoptoze. Apoptoza se prvo javlja u limfocitima i aktiviranim limfocitima (alo ili auto), koji su osjetljiviji i brže prođu apoptozu, za razliku od drugih ćelija. Monociti razvijaju apoptozu kasnije. Ubrizgavanje apoptoziranih ćelija indukuje toleranciju kod bolesnika sa GVHD i akutnim odbacivanjem grafta srca ili pluća. Kod ovih bolesnika, posebno su dendritske ćelije odgovorne za prelazak sa Th1 na Th2 imunski odgovor i porast anti-inflamacijskih citokina interleukin-10 (IL-10) i faktora rasta tumora β (Tumor Growth Factor Beta – TGF- β), smanjenja pro-inflamacijskih citokina i konačno, za proliferaciju regulacijskih ćelija. Među CD4/CD25+ ćelijama, samo CD4+ i CD25(hi) su T-regulacijske ćelije. Jedna subpopulacija T-regulacijskih limfocita proizvodi IL-10 i inhibira Th1 CD4 ćelije, dok se ostale populacije ponašaju kao supresori i inhibitori citotoksičnih T-ćelija odgovornih za odbacivanje organa i GVHD. Nije jasno zašto ubrizgavanje ranih apoptoziranih ćelija indukuje toleranciju u GVHD i odbacivanju grafta organa, ali Sezari sindrom, indukuje povećanje ekspresije anti-tumorskog imunskog odgovora. Imunski modulacijski odgovor, nakon EKF-e zavisi od mnogo faktora: rane injekcije apoptoziranih ćelija; anti-inflamacijske sredine; funkcije dendritskih ćelija; ćelijske dominacije dendritskog tipa 2, i može dovesti do imunske tolerancije, dok kasna apoptoza ili ubrizgavanje nekrotičnih ćelija i pro-inflamacijskih citokina vodi poboljšanju imunskog odgovora. Znači, imunski odgovor na EKF-u zavisi od raznih faktora koji su odgovorni za raznovrsnost oblika u različitim bolesnicima i zahteva dalja istraživanja (28).

Objavljeno je više retrospektivnih i prospektivnih istraživanja o delotvornosti primene EKF-e u lečenju bolesnika s cGVHD rezistentnim na kortikosteroide

(5, 8–11). Indukcija imunske tolerancije posle EKF-e, a porastom regulacijskih T ćelija, smatra se doprinosom EKF-e, i ispoljava njen terapijski efekat kod bolesnika sa c-GVHD (27). Istraživanja govore da je lečenje EKF-om uspešno u dve

trećine bolesnika s cGVHD tretiranih kortikosteroidima, a da do kliničkog poboljšanja dolazi od tri do 6 meseci od početka lečenja. U slučaju cGVHD kože i sluznice usne šupljine potpuni odgovor postignut je u 75 – 100% bolesnika, jetre u 30 – 80%, zglobova u 50%, a u cGVHD gastrointestinalnog trakta u 0 – 50% bolesnika (5, 8–10, 12). Multicentrične prospektivne randomizirane studije, sprovedene kod bolesnika s cGVHD kože rezistentnih na terapiju kortikosteroidima, pokazale su nakon terapije od 12 nedelja, statistički značajnu razliku u uspehu lečenja između grupe bolesnika tretiranih standardnom imunosupresivnom terapijom (N=47), u odnosu na grupu koja je uz to lečena i postupkom EKF-e (N=48). Kod 40% bolesnika koji lečeni i postupkom EKF-e nakon 12 nedelja došlo je do značajnog smanjenja ili potpunog nestanka promena na koži, dok je u drugoj grupi isti učinak postignut samo u 10% bolesnika ($p < 0,001$) (5, 13). Brojna istraživanja prikazuju da primena EKF-e omogućava snižavanje doze kortikosteroida uz poboljšanje kvaliteta života bolesnika. U grupi 29 ispitanih bolesnika, nakon 24 nedelje lečenja EKF-om u 31% bolesnika postignut je potpuni ili delimični odgovor, a u 33% bolesnika doza kortikosteroida je smanjena za više od 50%. Najbolji rezultati su postignuti kod bolesnika s promenama sluzokože usne šupljine kod kojih su u 70% slučajeva te promene nestale posle 24 nedelje primene EKF-e (14).

Izvođenje procedura EKF

Danas je EKF prihvaćena kao sigurna i neškodljiva imunoterapijska metoda koja deluje imunomodulatorno na cGVHD, a

bez generalizovane imunosupresije (2). Postupak EKF-e se sastoji od nekoliko koraka: a.) prikupljanja mononuklusnih ćelija (MĆ) iz periferne krvi bolesnika postupkom leukaferenze; b.) dodavanja fotoaktivne materije, 8-MOP prikupljenim MĆ-ma i njihovo izlaganje UVA; c.) transfuzije ozračenih ćelija bolesniku.

Prikupljene MĆ se prebacuju u kesu propusnu za UVA zrake, razređuju fiziološkim rastvorom, dodaje im se fotosenzitišući 8-MOP, te izlažu dejstvu zračenja. Tako ozračene ćelije se transfunduju bolesniku. Sprovođenje EKF-e vrši se obično u prvih mesec dana svake nedelje dva dana za redom, zatim na dve nedelje tokom dva meseca, a u narednom periodu jednom mesečno. Postoje i druge šeme za primenu, a ova je jedna od češćih (1), te se tako opisuje i tretman svake nedelje tokom tri meseca, a sledećih tri meseca šema se nastavlja dva puta mesečno (3–4).

Prikupljanje MĆ se vrši najčešće sa dva procesirana volumena, nekada i više, zavisno od broja limfocita. Produktat treba da bude sa što manjim hematokritom jer prisutni eritrociti umanjuju pristup UVE zraka MNC-ma.

Najpoznatiji i ovlašćeni Therakos CELLEKS®, Inc (Vestchester, CA, USA) sistem je najnovija generacija fotoferezne platforme, kombinuje kolekciju ćelija, fotoaktivaciju i reinfuzionu tehnologiju u jednom, integrisanom, zatvorenom sistemu. Integrisani, zatvoreni sistem omogućava upravljanje jednim operativnim fotofereznim procesom, koji može da smanji rizik od infekcije, unakrsne kontaminacije i reinfuzione greške, a takođe smanjuje vreme tretmana na pola, od 3 sata na 1.5 sati. Najpogodniji je dizajn sa kontinuiranim odvajanjem, uključujući i prilagođeno upravljanje tečnostima sa korišćenjem jednog ili dva venska puta, za različite potrebe bolesnika. Dva venska puta dodatno smanjuju vreme tretmana za oko 30 minuta. Patentirani algoritam automatizuje prikupljanje ćelija

i UVA maksimalno aktivira ćelije proizvoda. Sistem koristi set za jednokratnu upotrebu, sterilnu proceduru za lako postavljanje i minimalne gubitke, automatizovane senzore i protok za optimizaciju vremena kolekcije i

fotofereze. Automatizovane sigurnosne karakteristike, uključuju i detektor vazdušne embolije, zvučni alarm i prikaz poruka za specifični status alarma, kao i linija okluzije svih linija fluida, što će reći potpuno je bezbedno po bolesnika.

Terapijska primena i indikacije za KKF

EKF se takođe koristi kao eksperimentalni tretman kod bolesnika sa srčanim, plućnih i bubrežnih odbacivanjem alografta, bolesti "kalema protiv domaćina", autoimunskih bolesti, nefrogene sistemske fibroze i ulceroznog kolitisa. Neke od bolesti u kojima se pokušava lečenje sa EKF-om su:

- Systemic sclerosis/scleroderma
- Severe atopic dermatitis
- Epidermolysis bullosa acquisita
- Erosive oral lichen planus
- Recalcitrant pemphigus vulgaris
- Recalcitrant pemphigus foliaceus
- Psoriasis
- Scleromyxedema
- Rheumatoid arthritis
- Lupus erythematosus
- Nephrogenic systemic fibrosis/ nephrogenic fibrosing dermopathy.

EKF vodi do poboljšanja u kliničkom statusu bolesnika, omogućavajući smanjenje ili nestanak tumorskih T ćelija u CTCL, ili smanjenje ili ukupni prekid primene imunosupresivnih lekova, izbegavajući steroidima uslovljene sporedne efekte kod GVHD (29). Pokazala je prednosti u bolesnika rezistentnih na steroide (30–32) i stvorila prave nade za lečenje mnogih patoloških stanja, njena primena je veoma ograničena zbog nedostatka potencijalnih randomiziranih kliničkih ispitivanja i ne

dostatka u razumevanju mehanizama delovanja.

Infuzija apoptoziranih ćelija prethodno je opisana kao promovisanje tolerancije, istovremeno sa ćelijama kostne srži, aktivira stvaranje T regulacijskih limfocita i TGF- β , što zauzvrat "štiti" engraftment ćelija kostne srži od pojave GVHD (33). Sličan

pristup je nedavno potvrđen u fazi I kliničkog ispitivanja kao profilaksa za GVHD, gde su davaočeve apoptozirane ćelije ubrizgane primaocu jedan dan pre transplantacije kostne srži i pokazao je ohrabrujuće rezultate (34). Neke studije su predložile da se koriste EKF-om tretirane autologne ćelije kao profilaktički tretman GVHD (35), koji sprečava ili barem umanjuje pojavu aGVHD indukcijom T regulacijskih limfocita u domaćina zavisnog od IL-10 produkcije kod miševa. Pre infuzije apoptoziranih ćelija može da se izazove sistemska imunska tolerancija, što zauzvrat umanjuje ili sprečava razvoj aGVHD sledeće transplantacije. U *in vitro* modelu, Di Renzo i saradnici su pokazali da monocitima-izvedene dendritske ćelije bolesnika sa GVHD luče povećanu količinu IL-10 kada su stimulisane i u prisustvu autologih T regulacijskih limfocita tretiranih EKF-om (36).

Sveukupno ovi podaci ukazuju da bi EKF mogla da podstakne, barem delimično, imunsku toleranciju. Međutim, nema objašnjenja jedinstvenog mehanizma kako EKF selektivno pogađa patogene T ćelije bez izazivanja sistemske imunosti, niti kako funkcioniše u CTCL. Postoji hipoteza da je učinjeno izazivanje jednog odgovora protiv tumora usmereno ka T tumorskim ćelijama, a kako bi EKF mogla da izazove anti-tumorski imunski odgovor i imunsku toleranciju ostaje otvoreno pitanje (31).

Značajno, prisustvo ove patogene T ćelijske populacije unutar tretiranih ćelija je kritično za efikasnost EKF (37). Takođe je ovo zapažanje uočeno nedavno na životinjskom modelu u kojem je EKF

efikasna samo kada su tretirane patogene, a ne prirodne T ćelije (38).

Aiildiz i saradnici su objavili u svojim istraživanjima da jedan dan nakon tretmana EKF-om u cGVHD dolazi do smanjenja serumskog nivoa TNF- α . Zanimljivo, tokom prvih tretmana EKF-om, nivo serumskog TNF- α fluktuirao i utvrđeno je da je tada visok pre drugog tretmana EKF-e. Vrlo je verovatno da EKF prvo izaziva prolaznu imunsku toleranciju zbog infuzije velike količine apoptoziranih ćelija. Međutim, nakon nekoliko sesija, serumski nivoi TNF- α teže da se stabilno smanjuju u odgovoru bolesnika (39). Razumevanje procesa EKF-e će značajno pomoći u racionalizaciji rasporeda i procesa lečenja, kao i mogućnostima terapijske primene.

Neželjeni efekti

Više od 500.000 tretmana fotoferezom su izvedena širom sveta od 1997. godine. Minimalni neželjeni efekti kod bolesnika podvrgnutih EKF-i uključuju hipotenziju i sinkope kao rezultat obimnih promena procesiranih cirkulišućih volumena tokom leukaferenze. Mogući su i problemi sa ven-skim pristupom, temperaturom i groznicom koji su najverovatnije posledica oslobođenih citokina. Retko se javljaju i trovanja citratom tokom afereze ali se sprečavaju administriranjem kalcijuma.

Lek koji se koristi u toku tretmana učiniće kožu bolesnika više osetljivom na sunce na oko 24 sata posle svakog tretmana. Preporučuje se da bolesnici ostanu zaštićeni od direktne sunčeve svetlosti 24 sata posle svake procedure kada će lek i dalje biti aktivan, te da koriste kremu sa visokim faktorom zaštite tokom dva dana lečenja i 24 sata nakon tretmana. Drugi mogući neželjeni efekti su obično mali i prolaze u jednom danu, mogu da uključuju umor, privremeno pojačan svrab ili blago crvenilo ili groznicu koja se pojavljuje 6 – 8 sati nakon tretmana. Kao i kod svakog postupka sa iglama za punkciju, postoji

mali rizik od dobijanja infekcije. Preporučuje se dijeta sa niskim sadržajem masti veće pre terapije i za dva dana EKF-e, a vraćanje na normalan režim ishrane nakon lečenja. Razlog za to je smanjenje bilo kog sadržaja masti u cirkulaciji, kako bi se tretman mogao raditi bez ometanja.

Liječenje EKF-om traje prilično dugo, godinu dana ili čak duže, a za to vreme potrebno je održati odgovarajući venski pristup. Venski se pristup obično ostvaruje putem perifernih vena, ali nažalost to nije uvek moguće, zbog neodgovarajućih perifernih vena. Ako se koristiti režim sa dvostrukim iglama tretman može biti zamoran zbog samog položaja ruku, takođe i ako je ugrađen centralno venski kateter mora stajati duže vreme tokom dugotrajne procedure i remetiti kvalitet života (5). Dužina trajanja same terapije je individualna, varira u zavisnosti od stanja imunskog sistema i ozbiljnosti bolesti, a poboljšanje obično nastupa postepeno. Smatra se da bolesnik može odustati od daljeg tretmana EKF-om i potražiti druge oblike lečenja ako nakon 3 meseca redovne primene ne nastupi barem delomično poboljšanje. Greineix i saradnici su kontrolisanim randomiziranim istraživanjem pokazali da se protokol primene EKF-e treba dodatno intenzivirati sprovođenjem ciklusa od dva postupka svake nedelje prva 3 meseca, a zatim 2 puta mesečno najmanje sledeća 3 meseca, što za bolesnike može biti zahtevno, ali rezultati pokazuju da je delotvorno. Rezultati istraživanja pokazuju da lečenje postupkom EKF-e povoljno utiče na simptome cGVHD i omogućuje sniženje doze kortikosteroida uz poboljšanje kvaliteta života bolesnika i prihvatljivu učestalost nuspojava. Iako je reč o zahtevnom načinu lečenja, EKF se može preporučiti bolesnicima s cGVHD koji ne odgovaraju adekvatno na standardno liječenje (5).

Neželjene reakcije su se javile u 17 od 341 (4,9%) postupaka EKF-a. U tri bolesnika venski pristup nije bio moguć putem perifernih vena te je morao biti postavljen

centralni venski kateter. U jednog od tih bolesnika lečenje EKF-om prekinuto je zbog infekcije katetera, a u drugog je nakon tri meseca došlo do oštećenja katetera te je bilo potrebno postaviti novi kateter. Uprkos infuziji kalcijuma, blagi simptomi hipokalcemije javili su se tokom 8 leukafereza. Do porasta temperature došlo je u jednog bolesnika nakon četvrte reinfuzije ozračenih ćelija (5). Ovo su rezultati jedn

og centra, ali slični su i u saopštenjima drugih, što govori u prilog zaključku da su neželjeni efekti ređi i blagog karaktera.

Sve izneto govori o evidentnom terapijskom učinku fotofereze, ali i o neophodnosti primene većih i bolje osmišljenih studija, kao i analize prikupljenih podataka i donošenju definitivnih zaključaka.

Literatura

1. Couriel D, Hosing C, Saliba R, Shpall EJ, Andelini P, Popat U, Donato M, Champlin R. Extracorporeal photopheresis for acute and chronic graft-versus-host disease: does it work? *Biol Blood Marrow Transplant.* 2006;12(1 Suppl 2): 37–40.
2. Zic JA. Photopheresis in the treatment of cutaneous T-cell lymphoma: current status. *Curr Opin Oncol.* 2012; 24 Suppl 1:S1–10. doi: 10.1097/01.cco.0000410158.56500.c4.
3. Szczepiorkowski M, Winters J, Bandarenko N et al. Guidelines on the use of therapeutic apheresis in clinical practice-evidence-based-approach from the apheresis applications committee of the American Society for Apheresis. *J Clin Apher.* 2010; 25: 83–177.
4. Knobler R, Berlin G, Calzavara-Pinton P, Greinix H, Jaksch P, Laroche LGuidelines on the use of extracorporeal photopheresis. *J Eur Acad Dermatol Venereol.* 2014; 28 1:1–37. doi: 10.1111/jdv.12311.

5. Bojanić i saradnici. Ekstrakorporalna fotofereza i GVHD. *Liječ. vjesn* 2013; 135: 139–44.
6. James W. Hart, Lisa H. Shiue, Elizabeth J. Shpall, and Amin M. Alousi. Extracorporeal photopheresis in the treatment of graft-versus-host disease: evidence and opinion. *Ther Adv Hematol.* 2013; 4(5): 320–34.
7. Dippel E, Goerdts S, Orfanos C. Long-term extracorporeal photoimmunotherapy for treatment of chronic cutaneous GVHD: observations in four patients. *Dermatology* 1999;198:370–4.
8. Arora M. Therapy of chronic graft-versus-host disease. *Best Pract Res Clin Haematol* 2008; 21: 271–9.
9. Wolff D, Schleuning M, von Harsdorf S et al. Consensus conference on clinical practice in chronic GVHD: second-line treatment of chronic GVHD. *Biol Blood Marrow Transplant* 2010;17:1–17.
10. Greinix HT, Socie G, Bacigalupo A et al. Assessing the potential role photopheresis in hematopoietic stem cell transplant. *Bone Marrow Transplant* 2006; 38: 265–73.
11. Owsianowski M, Gollnick H, Siegert W et al. Successful treatment of chronic graft-versus-host disease with extracorporeal photopheresis. *Bone Marrow Transplant.* 1994; 14: 845–8.
12. Yoo E, Rook A, Elenitsas R et al. Apoptosis induction of ultraviolet light A and photochemotherapy in cutaneous T-cell lymphoma: relevance to mechanism of therapeutic action. *J Invest Dermatol* 1996; 107: 235–42.
13. Flowers ME, Apperley JF, van Besien K. A multicenter prospective phase 2 randomized study of extracorporeal photopheresis for treatment of chronic graft-versus-host disease. *Blood* 2008; 112: 2667–74.
14. Greinix H, van Besien K, Elmagacli A et al. Progressive improvement in cutaneous and extracutaneous chronic graft-versus-host disease after a 24-week course of extracorporeal photopheresis – results of a crossover randomized study. *Biol Blood Marrow Transplant.* 2011; 17: 1775–82.
15. Craciun LI, Stordeur P, Schandene L et al. Increased production of interleukin-10 and interleukin-1 receptor antagonist after extracorporeal photochemotherapy in chronic graft versus host disease. *Transplantation* 2002; 74: 995–1000.
16. Alcindor T, Gorgun G, Miller KB et al. Immunomodulatory effects of extracorporeal photochemotherapy in patients with extensive chronic graft versus host disease. *Blood* 2001; 98: 1622–5.
17. Kaloyannidis P, Mallouri D. The role of the extracorporeal photopheresis in the management of the graft-versus-host disease. *Transfus Apher Sci* 2012; 46: 211–9.
18. Berger C, Hanlon D, Kanada D et al. Transimmunisation, a novel approach for tumor immunotherapy. *Transfus Apher Sci* 2002; 26: 205–16.
19. Di Renzo M, Sbrano P, De Aloe G et al. Extracorporeal photopheresis affects co-stimulatory molecule expression and interleukin-10 production by dendritic cells in graft-versus-host disease patients. *Clin Exp Immunol* 2008; 151: 407–13.
20. Rieger K, Loddenkemper C, Maul J et al. Mucosal FOXP3+ regulatory T cells are numerically deficient in acute and chronic GVHD. *Blood.* 2006; 107:1717–23.
21. Zorn E, Kim HT, Lee SJ et al. Reduced frequency of FOXP3+CD4+CD25+ regulatory T cells in patients with chronic graft-versus-host disease. *Blood.* 2005;106: 2903–11.
22. Clark FJ, Gregg R, Piper K et al. Chronic graft-versus-host disease is associated with increased numbers of peripheral blood CD4+CD25high regulatory T cells. *Blood.* 2004; 103:2410–6.

24. Weitz M, Strahm B, Meerpohl JJ, Bassler D. Extracorporeal photopheresis versus alternative treatment for chronic graft-versus-host disease after haematopoietic stem cell transplantation in paediatric patients. *Cochrane Database Syst Rev*. 2014 Feb 25;(2):CD009898.doi: 10.1002/14651858.CD009898.pub2.
25. Del Fante C, Perotti C. Extracorporeal photopheresis for bronchiolitis obliterans syndrome after allogeneic stem cell transplant: An emerging therapeutic approach? *Transfus Apher Sci*. 2017 Jan 13. pii: S1473-0502 (16) 30196-3. doi:10.1016/j.transci.2016.12.010.
26. Brownback KR, Simpson SQ, Pitts LR, Polineni D, McGuirk JP, Ganguly S, Aljitawi OS, Lin TL, Singh A, Abhyankar S. Effect of extracorporeal photopheresis on lung function decline for severe bronchiolitis obliterans syndrome following allogeneic stem cell transplantation. *J Clin Apher*. 2016; 31(4): 347-52. doi: 10.1002/jca.21404. Epub 2015 May 29.
27. Becherucci V, Allegro E, Brugnolo F, Piccini L, Gori V, Bisin S, Bindi B, et al. Extracorporeal photopheresis as an immunomodulatory agent: Haematocrit-dependent effects on natural killer cells. *J Clin Apher*. 2016 Jul 31. doi: 10.1002/jca.21490.
28. Denney HA, Whittle RJ, Lai J, Jacques RM, Taylor PC. Regulatory T Cells in Chronic Graft-Versus-Host Disease After Extracorporeal Photopheresis: Correlation With Skin and Global Organ Responses, and Ability to Taper Steroids. *Transplantation*. 2017 Jan; 101(1): 204-11. doi: 10.1097/TP.0000000000001165.
29. Heshmati F. Updating EKF action mechanisms. *Transfus Apher Sci*. 2014; 50(3): 330-9. doi: 10.1016/j.transci.2014.04.003. Epub 2014 Apr 13.
30. Dalil Hannani. Extracorporeal Photopheresis: Tolerogenic or Immunogenic Cell Death? Beyond Current Dogma. *Front Immunol*. 2015; 6: 349. Published online 2015 Jul 7. doi: 10.3389/fimmu.2015.00349 PMID: PMC4493405.
31. Flowers ME, Apperley JF, van Besien K, Elmaagacli A, Grigg A, Reddy V, et al. A multicenter prospective phase 2 randomized study of extracorporeal photopheresis for treatment of chronic graft-versus-host disease. *Blood*. 2008;112(7):2667-74.10.1182/blood-2008-03-141481.
32. Abu-Dalle I, Reljic T, Nishihori T, Antar A, Bazarbachi A, Djulbegovic B, et al. Extracorporeal photopheresis in steroid-refractory acute or chronic graft-versus-host disease: results of a systematic review of prospective studies. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2014. 20(11): 1677-86.10.1016/j.bbmt.2014.05.017.
33. Kleinclauss F, Perruche S, Masson E, de Carvalho Bittencourt M, Büchle S, Remy-Martin JP, et al. Intravenous apoptotic spleen cell infusion induces a TGF-beta-dependent regulatory T-cell expansion. *Cell Death Differ*. 2006.13(1):41-52.10.1038/sj.cdd.4401699.
34. Mevorach D, Zuckerman T, Reiner I, Shimoni A, Samuel S, Nagler A, et al. Single infusion of donor mononuclear early apoptotic cells as prophylaxis for graft-versus-host disease in myeloablative HLA-matched allogeneic bone marrow transplantation: a phase I/IIa clinical trial. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2014. 20(1): 58-65.10.1016/j.bbmt.2013.10.010.
35. Florek M, Segal EI, Leveson-Gower DB, Baker J, Müller AM, Schneidawind D, et al. Autologous apoptotic cells preceding transplantation enhance survival in lethal murine graft-versus-host models. *Blood*; 2014.

- 124(11):1832–42.10.1182/blood–2014–02–555128.
36. Di Renzo M, Sbrano P, De Aloe G, Pasqui AL, Rubegni P, Ghezzi A, et al. Extracorporeal photopheresis affects co-stimulatory molecule expression and interleukin–10 production by dendritic cells in graft-versus-host disease patients. *Clin Exp Immunol.* 2008. 151(3): 407–13.10.1111/j.1365–2249.2007.03577.
 37. Marshall SR.. Technology insight: ECP for the treatment of GvHD – can we offer selective immune control without generalized immunosuppression? *Nat Clin Pract Oncol.* 2006. 3(6): 302–14.10.1038/ncponc0511.
 38. French LE, Alcindor T, Shapiro M, McGinnis KS, Margolis DJ, Porter D, et al. Identification of amplified clonal T cell populations in the blood of patients with chronic graft-versus-host disease: positive correlation with response to photopheresis. *Bone Marrow Transplant.* 2002. 30(8): 509–15.10.1038/sj.bmt.1703705.
 39. Budde H, Kolb S, Salinas Tejedor L, Wulf G, Reichardt HM, Riggert J, et al. Modified extracorporeal photopheresis with cells from a healthy donor for acute graft-versus-host disease in a mouse model. *PLoS One* (2014) 9(8):e105896.10.1371/journal.pone.0105896.
 40. Ayyildiz E, Arslan O, Topcuoglu P, Arat M, Dalva K, Soydan EA, et al. The effect of extracorporeal photopheresis (ECP) on serum TNF- α level in chronic graft versus host disease (GvHD). *Transfus Apher Sci.* 2007. 36(1):79–85.10.1016/j.transci.2006.06.007.



FRESH FROZEN PLASMA: QUALITY STANDARDS AND CLINICAL EFFICIENCY

Ana Antić¹, Zoran Stanojković^{1,2}, Marija Jelić³, Lana Mačukanović Golubović^{2,4}

¹Blood Transfusion Institute Niš, Serbia; ²Medical Faculty Niš, University of Niš, Serbia;

³Clinical Biochemical Laboratory, Military Hospital Niš, Serbia; ⁴Clinic for Haematology, Clinical Center Niš, Serbia.

Summary

Introduction: Fresh frozen plasma (FFP) is one of the most frequently used blood component and its use is continuously increasing. Preparation and storage of FFP are strongly defined by European recommendations for the preparation, use and quality assurance of blood components. The aim of this investigation was to compare the quality of FFP prepared in Blood Transfusion Institute of Niš with current recommendations and to examine the efficacy of FFP transfused to haematological patients.

Materials and methods: FFP separated from whole blood (N = 180) was frozen rapidly at a temperature $-75 \pm 5^{\circ}\text{C}$ within 45 minutes. After FFP was thawed at 37°C in a water bath it was investigated for concentration of coagulation factors and inhibitors. Clinical efficacy of transfused FFP was evaluated based on post-transfusion INR in the patients (N = 40) four hours after transfusion, determination the number of transfused units of FFP per patient and total improvement of INR.

Results: The greatest activity in plasma (%) was recorded for FV, F VII and F XII ($128,85 \pm 11,95$, $126,45 \pm 8,03$, $123,01 \pm 4,58$, respectively), while F VIII and F IX showed the lowest activity (FVIII: $103,95 \pm 6,66$, FIX: $101,75 \pm 7,58$). The activity of coagulation inhibitors corresponds to the reference values to certain recommendations (a mean value of ATIII was 93,85%, a mean value of PC was 104,28%). Investigation of the clinical effectiveness of FFP showed statistically significant improvement in the measured value of INR with each subsequent transfusion at the level of $p < 0,05$.

Conclusion: Respecting the basic standards of preparation, as well as adequate storage of FFP units are the basis for optimum product quality. Only high-quality FFP has a satisfactory therapeutic response in patients with clotting disorders.

Key words: fresh frozen plasma, coagulation, quality

Introduction

Blood transfusion therapy means the treatment of the patient with specific blood products for the purpose of reconstituting and maintenance of homeostasis. It has an effect on the volume of circulating blood and capacity for binding and transport of oxygen, blood hemostatic function and activity of mediators of the immune

response (1-4). It is not an etiological, but supportive method of therapy (3).

The differences in strategies and attitudes concerning the treatment with blood products are still great. Requirements for the type of therapy for many hematologic and other diseases are not

standardized. In fact, clinical physicians not always respect all principles of treatment of blood products. The decision for transfusion of blood products, the type and quantity of the product should be aligned with the overall clinical condition of patients, estimated and projected losses of blood, clinically significant laboratory values of parameters and compensatory mechanism of patients. For sufficiently effective transfusion therapy are also significant the efforts to improve and maintain haemobiological and therapeutic characteristics of the product, with the introduction of procedures to control their quality immediately after the preparation and during storage of blood product (4).

Fresh frozen plasma (FFP) is a blood component prepared from whole blood or collected by apheresis. There is also a quarantine plasma, which is a unit of FFP from a voluntary donor, which is issued only when the tests on a sample taken after more than six months from the same donors are negative for transmissible diseases (5). FFP is separated from a unit of whole blood within 6 hours after donation, but not more than 18 hours after and frozen at a temperature below -30°C per hour. Average volume of FFP unit is 200 - 250 ml. It contains all the labile and stable factors of the coagulation system, fibrinolysis and complement, oncotic effective proteins and immunoglobulins (6-8). The value of the factor VIII must be over 70 IU, and the number of residual red blood cells before freezing is less than $6,0 \times 10^9/\text{L}$, white blood cells less than $0,1 \times 10^9/\text{L}$ and the platelet count less than $50 \times 10^9/\text{L}$ (5,9). FFP is used to treat patients with a deficiency of coagulation factors and is a basic material for plasma fractionation.

The therapeutic dose of FFP depends mainly on the type of coagulation factors that are deficient and the degree of decrease in their activity. Before use, it is dissolved (in a water bath or dry dissolve) at 37°C . If it can not be immediately ap

plied, FFP may be stored an additional 24 hours at 4°C (10).

The aim of this investigation is to compare the quality of FFP prepared in Blood Transfusion Institute of Niš with current recommendations for the preparation, use and quality assurance of blood components and to examine the efficacy of FFP transfused to haematological patients.

Materials and methods

The whole blood taken from voluntary blood donors, average volume of 450 ml (non-reactive for markers of transmissible diseases, with regular clinical and laboratory parameters, without histories of the coagulopathy) is collected in four-part plastic bags with the conservative-anticoagulant solution CPD/SAGM (*MacoPharma, France*). Within 6 hours of collection, it is centrifuged at a speed of 3200 rpm for 15 minutes at 22°C in a centrifuge with blood cooling (*Heraeus, Cryofuga 8500*). Blood components are separated on an automatic extractor (*T-ACE Terumo, Japan*).

Units of plasma were frozen rapidly (*Blast shock freezer, Angelantoni, Italy*) at a temperature $-75 \pm 5^{\circ}\text{C}$ within 45 minutes, and then kept in a freezer a temperature of $-40 \pm 5^{\circ}\text{C}$ up to 36 months. Quality of the obtained plasma was evaluated after thawing at a temperature of 37°C in a water bath examining the following parameters: volume, the concentration of coagulation factors: FII (%), FV (%), FVII (%), FVIII: C (%), FIX (%) , FX (%) FXI (%) and FXII (%), the concentration of fibrinogen - FI (g/L), as well as the concentration of coagulation inhibitors - antithrombin III (ATIII%) and protein C (PC%), all on the ACL Elite Pro IL (*Instrumentation Laboratory, USA*). The obtained results were compared with the parameters according to the Guidelines for the preparation, use and quality assurance of the blood components (EDQM).

Results

Clinical efficacy of transfused FFP was evaluated based on:

- post-transfusion INR in the patients four hours after transfusion,
- determination the number of transfused units of FFP per patient,
- determination the total improvement of INR in patients as compared to INR before transfusion,
- incidence of posttransfusion adverse reactions.

INR (International Normalized Ratio, INR = 1) was measured on ACL Elite Pro IL (*Instrumentation Laboratory, USA*) from blood samples of patients with citrate as anticoagulant (1 ml of 3.8% sodium citrate and 9 ml of blood) before transfusion and four hours after the transfusion of FFP. Based on the obtained values of INR before transfusion and post-transfusion INR we calculated the corrected decrease of INR per transfusion.

The study included 180 units of FFP, which have been previously tested for hepatitis B antigen (HBsAg), anti-hepatitis C antibodies (anti-HCV), anti-HIV antibodies, and syphilis antibody (anti-TP). We prepared and issued two units of plasma of the same blood group per one requisition, the average volume of $257,50 \pm 18,50$ ml. Of the total of 180 blood donors, there were 132 men (73,33%) and 48 women (26,67%), which represents a statistically significant difference ($\chi^2=8,44$, $p<0,01$). On the other hand, the average age of the men was $35,97 \pm 2,87$ years ($Cv=7,97$) and women $34,76 \pm 2,55$ years ($Cv=7,35$), with the difference that is not statistically significant ($p = 0,0684$).

Concentration of coagulation factors and inhibitors in examined units of FFP are presented in table 1.

Table 1.
Concentration of coagulation factors and inhibitors in examined units of fresh frozen plasma

	Xmin	Xmax	$\bar{X} \pm SD$
FI (g/L)	3,18	4,58	$3,73 \pm 0,33$
F II (%)	90	125	$111,22 \pm 7,11$
F V (%)	101	155	$128,85 \pm 11,95$
F VII (%)	105	146	$126,45 \pm 8,03$
FVIII (%)	88	115	$103,95 \pm 6,66$
F IX (%)	86	118	$101,75 \pm 7,58$
F X (%)	96	138	$111,72 \pm 8,74$
F XI (%)	108	144	$107,87 \pm 5,30$
F XII (%)	110	130	$123,01 \pm 4,58$
ATIII (%)	85	105	$93,85 \pm 4,92$
PC (%)	90	110	$104,28 \pm 8,65$

The greatest activity in plasma was recorded for FV, F VII and F XII (FV and FVII activity always greater than 100%, the activity of F XII greater than 110%), while F VIII and F IX showed the lowest activity. All units of FFP in the study had a concentration of fibrinogen within the reference value (1,7 to 4,0 g/l), but also not a single unit of plasma had a concen-

tration of fibrinogen lower than 3,0 g/l. Also, the activity of coagulation inhibitors corresponds to the reference values to certain recommendations (a mean value of ATIII was 93,85%, a mean value of PC was 104,28%).

Investigation of the clinical effectiveness of FFP included 40 patients (25 men and 15 women, $p<0,05$) who received

112 units of plasma, which is the $2,80 \pm 1,19$ units per patient range: 1-5). The average age of patients who received plasma was $46,17 \pm 15,42$ years (men 53,17 years, women 48,15 years), the youngest patient was 33 years old and the oldest one was 76 years. The most common indications for plasma transfusion were hypoproth

rombinaemia with bleeding and impaired liver function.

Values of initial and post-transfusion INR are shown in the table 2. There is a statistically significant improvement in the measured value of INR with each subsequent measurement at the level of $p < 0,05$.

Table 2.
INR before and after transfusion of fresh frozen plasma (FFP)

	Number of patients	$\bar{X} \pm SD$
INR before transfusion	40	$3,53 \pm 1,35$
Post INR 1*	40	$2,46 \pm 0,95$
Post INR 2**	32	$1,83 \pm 0,66$
Post INR 3***	16	$1,60 \pm 0,52$

*Post INR 1 - INR after 1st transfusion of FFP

**Post INR 2 - INR after 2nd transfusion of FFP

***Post INR 3 - INR after 3rd transfusion of FFP

The decrease of INR after transfusion of FFP is shown in table 3. By comparing the falling value of INR 1 to 3, a statistically

significant difference is observed between the fall of INR 1 and fall of INR 2 ($1,07$ vs $0,79$, $t = 2.334$, $p < 0,05$).

Table 3.
INR improvement in patients after transfusion of fresh frozen plasma (FFP)

INP improvement after...	Number of patients	$\bar{X} \pm SD$
1 st FFP transfusion	40	$1,07 \pm 0,40$
2 nd FFP transfusion	32	$0,79 \pm 0,29$
3 rd FFP transfusion	16	$0,77 \pm 0,45$

Discussion

The principle of modern transfusion treatment is to compensate the blood component that is reduced. For rational and effective transfusion therapy analysis of blood counts must be done first, in order to assess the efficiency of transfusion based on clinical and laboratory parameters. The aim of transfusion therapy is not to raise the level of the blood cells on

normal value, but on the values that meet the physiological needs (11,12).

FFP contains all the labile and stable coagulation factors, and so is applied for reimbursement of coagulation factors in the absence of concentrated preparation. One mL of FFP raises the activity of coagulation factors from 1 to 2%. Therefore, for increasing the level of a plasma coagulation factors FFP must be transfused at a dose of 10-15 mL/kg, and in acute bleed

ing at a dose of 20-30 mL/kg. It is noteworthy that the plasma transfusion is justified only with laboratory parameters of blood clotting disorders (prothrombin time-PT, aPTT). PT and aPTT should be 1,5 to 2 times extended to a witness in order to apply FFP transfusion, and the effect of transfusion is laboratory monitored 4 hours after transfusion. In our study we have shown that with respect of modern principles of preparation, FFP contains all coagulation factors and inhibitors in the range recommended by the Council of Europe. All coagulation factors were present in the percentage above 100%, which shows that we retain all the coagulation factors in FFP units, also the level of fibrinogen, ATIII and PC were present in a high percentage (56).

Although FFP is now never given for replacement of FVIII alone, it is important that FFP contains a reasonable level of FVIII (0,50 IU/mL) for treatment of disseminated intravascular coagulation (DIC) and massive transfusion. We, therefore, conclude that the loss of coagulation factors observed is unlikely to be clinically significant and FFP can be used for these patients.

Observing the effectiveness of FFP transfusions our investigation showed that transfusion of FFP unit, which was previously prepared respecting the valid recommendations and standards shows the expected effect and leads to improvements of laboratory parameters (INR) 4 hours after transfusion. There was no statistically significant difference in the improvement of INR depending on the number of previously transfused FFP units, and INR improvement is higher in those patients who had a higher INR before transfusion. There is a need to undertake new investigations in order to evaluate the efficacy and adverse effects of FFP, both in bleeding and non-bleeding patients. In addition, new hemostatic tests that better define the risk of bleeding and monitor the effectiveness of the use of FFP should be validated.

Conclusions

Respecting the basic standards of preparation, as well as adequate storage of FFP units are the basis for optimum product quality. Only high-quality FFP has a satisfactory therapeutic response in patients with clotting disorders. In order to improve the security of patients and achieving high quality and efficient transfusion permanent communication between transfusion and clinical doctors is needed.

References

1. Brecher ME, ed. Technical Manual, 15th edition Bethesda, MD: AABB Press, 2005.
2. Janković R, Stanojković Z. Transfuzija krvi. U: Vučović D. (editor) Anesthesiology I (In Serbian). Institute for Textbooks Belgrade, 2014; p.480-508.
3. Klein H, Anstee D. Mollison's blood transfusion in clinical medicine. Blackwell publishing, 12th edition, 2014: 352-94.
4. Balint B, Trkluljic M, Todorovic M. Osnovni principi hemoterapije. Beograd: Institut za transfuziologiju VMA, 2010.
5. Guide to preparation, use and quality assurance of blood components, 18th edition: Council of Europe publishing, 2015.
6. Luban LCN. Transfusion Safety: Where are we today. Ann NY Acad Sci 2005; 1054: 325-41.
7. MacLennan S, Williamson LM. Risks of fresh frozen plasma and platelets. J Trauma 2006; 60: S46-S50.
8. Ketchum L, Hess JR, Hiippala S. Indications for early fresh frozen plasma, cryoprecipitate and platelet transfusion in trauma. J Trauma 2006; 60: S51-S58.
9. Naghadeh HT, Roudkenar MH. A study of the quantity of some sta

- ble and labile coagulation factors in fresh-frozen plasma produced from whole blood stored for 24 hours in Iran. *Blood Transfusion* 2009; 7(1): 39-42.
10. Cardigan R, Lawrie AS, Mackie IJ, Williamson L M. The quality of fresh-frozen plasma produced from whole blood stored at 4°C overnight. *Transfusion* 2005; 45: 1342-8.
 11. Labar B, Hauptmann E. *Hematologija*. Zagreb, Medicinska knjiga, 2007; pp. 344-54.
 12. British Committee for Standards in hematology. Guidelines for the use of fresh-frozen plasma, cryoprecipitate and cryosupernatant. *Br Jour Haemtol* 126 (1): 11-28.
 13. Wong MP, Droubatchevskaia N, Chipperfield KM, Wadsworth LD, Ferguson DJ. Guidelines for frozen plasma transfusion. *BCMJ* 2007; 49(6): 311-9.
 14. Dogra M, Dogra A, Sidhu M, Vasudev R. Comparative analysis of activity of coagulation Factors V and VIII and level of fibrinogen in fresh frozen plasma and frozen plasma. *Asian Jour of Transf Sci* 2015; 9(1): 6-8.
 15. Gonzalez EA, Moore FA, Holcomb JB, Miller CC, Kozar RA, Todd SR, et al. Fresh frozen plasma should be given earlier to patients requiring massive transfusion. *J Trauma* 2007; 62(1): 112-9.





ZIKA VIRUS - PATHOGENESIS, CLINICAL MANIFESTATIONS AND INFLUENCE ON BLOOD TRANSFUSION

Nemanja Borovčanin¹, Dušan Vučetić^{1,2}, Bela Balint^{1,2,3}

¹Institut za transfuziologiju i hemobiologiju, Vojnomedicinska akademija, Beograd;

²Medicinski fakultet VMA, Univerzitet odbrane, Beograd; ³Srpska akademija nauka i umetnosti, Beograd, Srbija.

Summary

Zika virus is a flavivirus that was first isolated in 1947 from a febrile rhesus macaque monkey in the Zika Forest of Uganda. The first major outbreak of Zika virus infection occurred in Yap. Zika virus, like other flaviviruses, is transmitted by mosquitoes, primarily of the Aedes genus. Infection is likely asymptomatic in an average 80% of cases. Commonly reported symptoms include rash, fever, arthralgia, myalgia, fatigue, headache, and conjunctivitis. If a donor volunteers has a recent history of ZIKV infection, you must not collect blood or blood components from that individual. FDA recommend that you defer such a donor for 120 days after a positive viral test or the resolution of symptoms, whichever timeframe is longer.

Key words: Zika virus, mosquito, infection, fever, blood transfusion.

Introduction

Zika virus is a flavivirus that was first isolated in 1947 from a febrile rhesus macaque monkey in the Zika Forest of Uganda and later identified in *Aedes africanus* mosquitoes from the same forest (1). In 1954, the first 3 cases of human infection were reported in Nigeria (2). Sero-surveillance studies in humans suggest that Zika virus is widespread throughout Africa, Asia and Oceania. However, these studies may overestimate the virus's true prevalence, given serologic overlap between Zika virus and related flaviviruses, such as dengue virus (DENV) and West Nile virus (WNV) (3,4). Historically, symptomatic Zika virus infections were limited to sporadic cases or small clusters of patients. This pattern changed in 2007, when the first major outbreak of Zika virus infection occurred in Yap (Federated States of Micronesia), where $\approx 73\%$ of the population were infected and symptomatic disease developed in $\approx 18\%$ of infected

persons (5). Since then, Zika virus infection has spread rapidly, as of July 22, 2016, 56 countries or territories have reported locally transmitted ZIKV infections (6), and an estimated 3 to 4 million people may be infected by the end of 2016. Outbreaks have occurred most recently the Americas, with sporadic exportations to Europe (7).

Zika virus was first reported in May 2015 in continental South America in Brazil, where $\approx 440,000$ – $1,300,000$ persons have subsequently been infected. Furthermore, 29 other countries in the Americas have reported autochthonous Zika virus transmission, including Puerto Rico and US Virgin Islands (8). Except for 2 sexually acquired cases, Zika virus in the United States, Canada, and Europe has been restricted to travelers from affected areas; a patient who delivered an infant with microcephaly in Hawaii had spent part of her pregnancy in Brazil (9, 10).

Pathogenesis

Zika virus is an enveloped, icosahedral, a positive-sense single-stranded RNA virus belonging to the genus *Flavivirus*, family *Flaviviridae*. It includes several other mosquito borne viruses of clinical importance (e.g., DENV, WNV, and yellow fever virus [YFV]). Its closest relative is Spondweni virus, the only other member of its clade. Phylogenetic analysis shows that Zika virus can be classified into distinct African and Asian lineages; both emerged from East Africa during the late 1800s or early 1900s. A study of Zika virus's molecular evolution, based on viral strains collected from 4 countries in West Africa during 1947–2007, identified several sites within the Zika viral genome that were under strong negative selection pressure. This finding suggests frequent purging of deleterious polymorphisms in functionally important genes and the possibility of recombination, which occurs rarely among flaviviruses. After mosquito inoculation of a human host, cellular entry likely resembles that of other flaviviruses, whereby the virus enters skin cells through cellular receptors, enabling migration to the lymph nodes and bloodstream. Few studies have investigated the pathogenesis of Zika virus infection. One study showed that human skin fibroblasts, keratinocytes, and immature dendritic cells allow entry of Zika virus. Several entry and adhesion factors (e.g., AXL receptor tyrosine kinase) facilitate infection, and cellular autophagy, needed for flaviviral replication, enhances Zika virus replication in skin fibroblasts. After cellular entry, flaviviruses typically replicate within endoplasmic reticulum-derived vesicles. However, Zika virus antigens were found exclusively in the nuclei of infected cells; this finding suggests a location for replication that differs from that of other flaviviruses and merits further investigation (10, 11).

Zika virus, like other flaviviruses, is transmitted by mosquitoes, primarily of

the *Aedes* (*Stegomyia*) genus. Several *Aedes* spp. have been implicated, including *Ae. aegypti*, *Ae. africanus*, *Ae. hensilli*, and *Ae. albopictus* (10, 12–14).

Mosquito acquisition of the virus likely occurs during a blood meal; after uptake, the virus replicates and is transmitted to a reservoir animal at the next blood meal (15). Isolation of the virus or of anti-Zika virus antibodies from various nonhuman primates and other wild and domestic animals suggests multiple animal reservoirs (16). One study examined the kinetics of Zika virus infectivity in *Ae. aegypti* mosquitoes by using blood-feeding membranes (17). Viral content was high on the day of feeding (inoculation), decreased to undetectable levels through day 10, increased by day 15, and remained high on days 20–60. These findings suggest an incubation period in mosquitoes of an average 10 days.

Other nonvector modes of Zika virus transmission include congenital (18), perinatal (19), and sexual (20, 21). Possible transmission by blood transfusion (22, 23), animal bite (24), and laboratory exposure (25) has been described; however, confounding by contemporaneous vector borne transmission in these instances cannot be excluded.

Intrauterine transmission is supported by the finding of Zika virus RNA by reverse transcription PCR (RT-PCR) in amniotic fluid of 2 mothers with symptoms of Zika virus infection during pregnancy; both delivered babies with microcephaly (18). Zika virus RNA has also been identified in tissue of fetuses from women infected during pregnancy and in brains of 2 live-born infants with microcephaly who died <20 hours after birth. Probable intrapartum transmission has also been described: 2 newborns were found to be viremic with Zika virus ≤ 4 days after being born to infected mothers (19). Viral RNA, but not culturable virus, has been detected in breast milk (19), but transmis

sion by breast-feeding has not been reported. Two cases of possible transfusion-transmitted Zika virus were reported in Brazil (23). Furthermore, during the French Polynesia outbreak, a study found that 42 (2.8%) of 1,505 asymptomatic blood donors were positive for Zika virus by RT-PCR; 11 donors described a Zika fever-like syndrome 3–10 days after donation (22).

Clinical Manifestations

In humans, the incubation period from mosquito bite to symptom onset is an average 3–12 days. Infection is likely asymptomatic in 80% of cases (5,15). All ages are susceptible (4 days–76 years), with a slight preponderance of cases in females. When symptoms occur, they are typically mild, self-limiting, and non-specific; similarity to other arbovirus infections (e.g., DENV and chikungunya virus [CHIKV]) may confound the diagnosis. Commonly reported symptoms include rash, fever, arthralgia, myalgia, fatigue, headache, and conjunctivitis. Rash, a prominent feature, is maculopapular and pruritic in most cases; it begins proximally and spreads to the extremities with spontaneous resolution within 1–4 days of onset (26). Fever is typically low grade (37.4°C–38.0°C) (6, 21, 25). Symptoms resolve within 2 weeks; accounts of longer persistence are rare.

More severe clinical sequelae have increasingly been associated with Zika virus. During the ongoing outbreak in Brazil, reports of infants born with microcephaly have markedly increased (>3,800 cases; 20 cases/10,000 live births vs. 0.5/10,000 live births in previous years). However, concern exists that these findings may in part be artifactual, resulting from previous underreporting of cases and confounding by other risk factors for microcephaly. Because systematic surveillance for microcephaly was not previously

undertaken, the baseline rate of microcephaly in Brazil is unknown, and subsequent reports suggest that a substantial proportion of infants that reportedly have microcephaly do not actually have the condition (10).

Health officials in French Polynesia have reported an apparent increase in congenital central nervous system (CNS) malformations, coinciding with the outbreak occurring during 2013–2014. However, this finding should be cautiously interpreted; reports included only 17 cases, and none were laboratory-confirmed Zika virus cases (10).

Severe neurologic sequelae have also been described in adults, including meningitis, meningoencephalitis, and Guillain-Barre syndrome. A surge in Guillain-Barre syndrome cases has been observed in Brazil, Colombia, El Salvador, Suriname, Venezuela, and French Polynesia during outbreaks; however, Zika virus has been laboratory confirmed in only some of these cases.

Nonneurologic sequelae include transient hearing loss, hypotension, and genitourinary symptoms (20, 21). Hematospermia was reported in 2 cases (20, 21). A 44-year-old man in Tahiti in whom hematospermia developed 2 weeks after symptoms of Zika virus infection was found to have replicative cultured Zika virus particles in his semen (21). In addition, a 36-year-old man from the United States contracted Zika virus infection while in Senegal, and subsequently, his wife was infected in the United States; this case supports sexual transmission (20). A second sexually acquired case was reported in Texas (10).

Rare deaths have been described in patients infected with Zika virus. Besides one infant death, three other fatalities were reported (two from Brazil and one from Colombia): one man with lupus erythematosus, chronic corticosteroid use, rheumatoid arthritis, and alcoholism; and

two girls 16 years of age, one with sickle cell disease (10).

Influence on Blood Transfusion

To date, there have been no confirmed transfusion-transmission cases of Zika virus in the United States. There is uncertainty surrounding the impact of ZIKV on the blood supply. Current evidence suggests that TTZ is likely; however clinical penetrance has not been established. Despite the scale of the current epidemic, only 4 possible cases of TTZ have been reported (9, 27, 28). The first case was a liver transplant patient who received a platelet concentrate from a blood donor who reported symptoms two days after donation and was found to be positive for ZIKV; the recipient tested positive for ZIKV yet remained asymptomatic (9, 27, 28). The second case of suspected TTZ was a gunshot victim who received multiple transfusions from different donors. The patient died as a direct result of the gunshot wounds. Several months later, as part of an epidemiological study, the recipient's archived blood sample tested positive for ZIKV. This patient had been in a hospital intensive care unit for three months and a lookback study revealed that he had received donations from 18 donors and that one of the retention samples was positive for ZIKV. The positive donor was contacted, and he reported that three days after the donation he developed a rash, conjunctivitis, pruritus, generalized pain, and hypotension. He had been diagnosed with DENV without laboratory confirmation, in the setting of an ongoing outbreak in the area (9, 29). However, low genetic variation in the circulating virus precludes definitive confirmation of transfusion transmission; therefore, vector-borne transmission is possible. Two additional cases have yet to be published (30).

FDA issued revised guidance, on August 26, 2016, recommending that blood centers in all states and U.S. territories screen individual units of donated

whole blood and blood components with a blood screening test authorized for use by FDA under an investigational new drug (IND) application, or with a licensed test when available. A pathogen reduction device (amotosalen + UV illumination) for plasma and platelets has recently been approved by the Center for Biologics Evaluation and Research (CBER), FDA. This device demonstrated effective reduction of a panel of viruses, including flaviviruses, such as dengue and West Nile virus. A recent publication showed that the same pathogen reduction technology (PRT) can effectively reduce ZIKV in plasma. These devices have been used to reduce the risk of ZIKV infection by plasma or apheresis platelet components that are collected in areas experiencing ZIKV outbreaks. Most people infected with the Zika virus don't show any symptoms, blood donors may not know they have been infected. Screening of blood donors on the basis of a questionnaire, without a laboratory test, is insufficient for identifying Zika-infected donors in areas with active mosquito-borne transmission of Zika virus due to the high rate of asymptomatic infection. Although there is no FDA-licensed test for Zika virus, testing for Zika became available through two separate Investigational New Drug (IND) applications for blood collected in Puerto Rico and mainland United States. The tests became available on April 3, 2016 (Roche Molecular Systems, Inc.) and June 20, 2016 (Hologic, Inc./Grifols). Blood donations that were tested positive for Zika virus, are removed from the blood supply. If a donor volunteers has a recent history of ZIKV infection, you must not collect blood or blood components from that individual. We recommend that you defer such a donor for 120 days after a positive viral test or the resolution of symptoms, whichever timeframe is longer.

FDA has identified ZIKV as a transfusion-transmitted infection (TTI) and a relevant transfusion-transmitted infection (RTTI). This determination is based on the severity

of the disease, risk of transfusion transmission by blood and blood components, the availability of appropriate screening measures and significant incidence and prevalence affecting the potential donor population (10, 23, 26, 31–33).

Conclusion

The first ZIKV outbreak in Yap State was unexpected and demonstrated the potential for ZIKV emergence. The epidemic has serious medical, ethical, and economic ramifications, particularly in countries where the resources for early diagnosis are lacking and potential intervention measures (e.g., contraception or termination of pregnancy) are discouraged or illegal. Although autochthonous transmission in the United States is unlikely to match the scale of the epidemic in Central and South America, much about Zika virus and the way the pandemic will evolve are unknown. The future of ZIKV is unpredictable, but its recent spread confirms that ZIKV is following in the path of CHIKV and DENV. Continued vigilance is warranted, along with a concerted effort toward improving our understanding, management, and prevention of this emerging pathogen. These include a complete understanding of the frequency and full spectrum of clinical outcomes resulting from fetal Zika virus infection and of the environmental factors that influence emergence, as well as the development of discriminating diagnostic tools for flaviviruses, animal models for fetal developmental effects due to viral infection, new vector control products and strategies, effective therapeutics, and vaccines to protect humans against the disease.

References

1. Dick GW, Kitchen SF, Haddow AJ. Zika virus. Isolations and serological specificity. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 1952; 46:509–20.
2. MacNamara FN. Zika virus: a report on three cases of human infection during an epidemic of jaundice in Nigeria. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 1954; 48:139–45.
3. Korhonen EM, Huhtamo E, Smura T, Kallio-Kokko H, Raassina M, Vapalahti O. Zika virus infection in a traveller returning from the Maldives, June 2015. *Euro Surveill.* 2016; 21:301–07.
4. Baba SS, Fagbami AH, Ojeh CK. Preliminary studies on the use of solid-phase immunosorbent techniques for the rapid detection of Wesselsbron virus (WSLV) IgM by haemagglutination-inhibition. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis.* 1999; 22:71–9.
5. Duffy MR, Chen TH, Hancock WT, Powers AM, Kool JL, Lanciotti RS, et al. Zika virus outbreak on Yap Island, Federated States of Micronesia. *N Engl J Med.* 2009; 360:2536–43.
6. European Centre for Disease Prevention and Control. Zika virus infection: Zika outbreak in the Americas and the Pacific: Zika transmission in past 9 months. Stockholm: ECDC; 2016.
7. Fauci AS, Morens DM. Zika virus in the Americas—yet another arbovirus threat. *N Engl J Med.* 2016; 374:601–4.
8. Hennessey M, Fischer M, Staples JE. Zika virus spreads to new areas—region of the Americas, May 2015–January 2016.
9. European Centre for Disease Prevention and Control. Rapid risk assessment: Zika virus epidemic in the Americas: potential association with microcephaly and Guillain-Barré syndrome (first update). Stockholm: ECDC; 2016.
10. Plourde RA, Bloch ME. A Literature Review of Zika Virus. *Emerging Infectious Diseases* 2016; 22:1185–1191.
11. Hamel R, Dejarnac O, Wichit S, Ekchariyawat P, Neyret A, Luplertlop N, et al. Biology of Zika virus infection in human skin cells. *J Virol.* 2015; 89:8880–96.
12. Marchette NJ, Garcia R, Rudnick A. Isolation of Zika virus from *Aedes aegypti* mos-

- quitos in Malaysia. *Am J Trop Med Hyg.* 1969; 18:411–5.
13. Hayes EB. Zika virus outside Africa. *Emerg Infect Dis.* 2009;15:1347–50.
14. Grard G, Caron M, Mombo IM, Nkoghe D, Mboui Ondo S, Jiolle D, et al. Zika virus in Gabon (Central Africa)—2007: a new threat from *Aedes albopictus*? *PLoS Negl Trop Dis.* 2014; 8:e2681.
15. Iosifidis S, Mallet HP, Leparac Goffart I, Gauthier V, Cardoso T, Herida M. Current Zika virus epidemiology and recent epidemics. *Med Mal Infect.* 2014;44:302–7. <http://dx.doi.org/10.1016/j.medmal.2014.04.008>
16. Haddow AD, Schuh AJ, Yasuda CY, Kasper MR, Heang V, Huy R, et al. Genetic characterization of Zika virus strains: geographic expansion of the Asian lineage. *PLoS Negl Trop Dis.*
17. Boorman JP, Porterfield JS. A simple technique for infection of mosquitoes with viruses; transmission of Zika virus. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 1956; 50:238–42.
18. Oliveira Melo AS, Malinger G, Ximenes R, Szejnfeld PO, Alves Sampaio S, Bispo de Filippis AM. Zika virus intrauterine infection causes fetal brain abnormality and microcephaly: tip of the iceberg? *Ultrasound Obstet Gynecol.* 2016; 47:6–7.
19. Besnard M, Lastere S, Teissier A, Cao-Lormeau V, Musso D. Evidence of perinatal transmission of Zika virus, French Polynesia, December 2013 and February 2014. *Euro Surveill.* 2014; 19:20751.
20. Foy BD, Kobylinski KC, Chilson Foy JL, Blitvich BJ, Travassos da Rosa A, Haddow AD, et al. Probable non-vector-borne transmission of Zika virus, Colorado, USA. *Emerg Infect Dis.* 2011; 17:880–2.
21. Musso D, Roche C, Robin E, Nhan T, Teissier A, Cao-Lormeau VM. Potential sexual transmission of Zika virus. *Emerg Infect Dis.* 2015; 21:359–61.
22. Musso D, Nhan T, Robin E, Roche C, Bierlaire D, Zisou K, et al. Potential for Zika virus transmission through blood transfusion demonstrated during an outbreak in French Polynesia, November 2013 to February 2014. *Euro Surveill.* 2014; 19:20761.
23. Recommendations for Donor Screening, Deferral, and Product Management to Reduce the Risk of Transfusion-Transmission of Zika Virus. FDA February 2016; 1–14.
24. Leung GH, Baird RW, Druce J, Anstey NM. Zika virus infection in Australia following a monkey bite in Indonesia. *Southeast Asian J Trop Med Public Health.* 2015; 46:460–4.
25. Simpson DI. Zika virus infection in man. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 1964;58:335–8.
26. Donor Screening Recommendations to Reduce the Risk of Transmission of Zika Virus by Human Cells, Tissues, and Cellular and Tissue-Based Products. FDA March 2016; 1–8.
27. Herriman R. Transfusion-associated Zika virus reported in Brazil. *Outbreak news today*, 2015.
28. Barjas-Castro ML, Angerami RN, Cunha MS, Suzuki A, Nogueira JS, Rocco IM, et al. Probable transfusion-transmitted Zika virus in Brazil. *Transfusion* 2016;56:1684–8.
29. Boadle A. Brazil reports Zika infection from blood transfusions: Reuters website; 2016.
30. AABB Zika Virus Symposium: blood & HCT/P safety; 2016 [Washington, DC].
31. Revised Recommendations for Reducing the Risk of Zika Virus Transmission by Blood and Blood Components. FDA August 2016; 1–15.
32. Musso D, Gubler JD. Zika Virus 2016; 29:487–512.
33. Petersen RL, Jamieson JD, Powers MA, Honein AM. Ed: Baden LR. Zika Virus. *N Engl J Med* 2016; 374:1552–63.

LEČENJE PRODUKTIMA I PREPARATIMA OD KRVI – USMERENA HEMOTERAPIJA

Ivana Jovanović¹, Dragana Gojkov¹, Milena Todorović^{2,3}, Gordana Ostojić¹,
Valentina Balint³, Aleksandar Jevtić¹, Bela Balint^{1,4}

¹Vojnomedicinska akademija, Beograd; ²Klinika za hematologiju KCS, Beograd;
³Medicinski fakultet, Univerzitet u Beogradu; ⁴Srpska akademija nauka i umetnosti, Beograd, Srbija.

Hemoterapija u užem smislu reči predstavlja nadoknadu hemoproduktima u cilju rekonstitucije i održavanja homeostaze u cirkulaciji. Njenom primenom utiče se na kapacitet krvi za transport kiseonika (oksiformna funkcija), na procese hemostaze, na ispoljavanje imunskog odgovora, uz brojne druge uloge i efekte. Za efikasnu i bezbednu hemoterapiju, od posebnog značaja su utvrđivanje vrste i stepena deficitarnog krvnog sastojka – od čega zavisi izbor i doziranje hemoprodukta. Terapiju treba započeti što ranije radi svođenja neželjenih sekvela na minimum. Međutim, pre donošenja odluke o uvođenju pojedinih hemomodulacijskih postupaka i/ili produkata od krvi, uvek moraju biti dobro procenjeni koristi i rizici njihove primene.

Ključne reči: hemoterapija, eritrociti, trombociti, plazma, krioprecipitat.

U procesu pripremanja komponenata/derivata krvi najvažnija su dva zadatka. Prvi je pripremanje ćelijskih komponenata, što se postiže relativno jednostavnim fizičkim postupkom centrifugovanja i razdvajanja. Na osnovu razlika u gustini sastojaka, a pod dejstvom sile ubrzanja, dolazi do razdvajanja ćelija od plazme. Nakon otklanja supernatantne plazme, sprovodi se redukcija broja leukocita (izdvajanje "buffy coat"-a u kome se, pored leukocita nalaze i trombociti), uz resuspenziju koncentrovanih eritrocita u aditivnom rastvoru (Aditive Solution – AS).

Pored eritrocita, iz krvi je moguće izdvojiti KT: 1) iz plazme bogate trombocitima ili Platelet Rich Plasma – PRP i 2) iz "buffy coat"-a – BC-KT. Rok terapijske upotrebljivosti ovako dobijenih trombocita je do 5–7 dana ukoliko se skladište na temperaturi od 22±2 °C, u odgovarajućim kesama za razmenu gasova na mešalicama za trombocite (1–9).

Drugi zadatak prilikom procesiranja i prerade jedinica krvi je izdvajanje sveže plazme iz jedinice cele krvi i njeno zamrzavanje. Zamrznuta sveža plazma (ZSP) se čuva na temperaturi od -30±5 °C. Sveža (ili prethodno zamrznuta) plazma je istovremeno izvor za dobijanje krioprecipitata, ali i za prečišćavanje albumina, činilaca koagulacije i imunoglobulina u procesu frakcionisanja (2–8).

Iz plazme u poslednjih decenija, razvojem novih tehnoloških postupaka u procesu frakcionisanja, moguće je proizvoditi i nove derivate iz plazme, koji imaju veću čistoću, uz maksimalnu redukciju rizika od transmisije virusa (inaktivacija). Uvođenjem nanofiltracije, uticalo je na postizanje još veće bezbednosti ovih produkata za kliničku primenu (10–12).

Terapija eritrocitima

Danas transfuzija krvi praktično označava terapijsku upotrebu eritrocita koja (po

potrebi) može biti udružena primenom i drugih hemoprodukata. Pored toga što dovodi do povećanja ukupnog volumena eritrocita (UVE) – a time i poboljšanja u prenosu O_2 i CO_2 – transfuzija eritrocita doprinosi i normalizaciji nekih funkcija plazme i sistema hemostaze. Ipak, osnovni cilj transfuzija koncentrovanih eritrocita je da se postigne povećanje koncentracije hemoglobina (Hb) do vrednosti većih od onih koji izazivaju simptome anemije.

Kod bolesnika sa normovolemijskom anemijom, godinama je upotrebljavan Hct od 0,30 ili koncentracija Hb od 100 g/L, kao "prag" za uvođenje transfuzija ("transfusion trigger") (1–4). Nakon uočavanja moguće transmisije uzročnika hepatitisa tipa B i C, ali i AIDS-a hemoproduktima, značajno je smanjen broj datih transfuzija, odnosno pooštreni su kriterijumi za njihovu primenu u terapiji. Danas je opšteprihvaćeno da je gore navedeni "prag za uvođenje transfuzija" neopravdano visok – što znači da bolesnicima sa normovolemijskom anemijom čiji je $Hct \geq 0,21$ odnosno koncentracija Hb ≥ 70 g/L, ne treba transfundovati krv/eritrocite (12–16). Međutim, navedeni kriterijumi nisu primenljivi kod bolesnika sa hipovolemijskih stanja usled udruženog efekta hipovolemije i anemije. Tako, npr. kod bolesnika sa 20%-nim deficitom ukupnog volumena krvi i vrednostima $Hct = 0,21$ i $Hb = 70$ g/L, nakon korekcije volumena krvi imaće Hct od 0,18 i Hb od 60 g/L – prvenstveno usled porasta volumena plazme. To treba imati u vidu prilikom proračuna potrebnih količina eritrocita za transfuziološko zbrinjavanja bolesnika sa hipovolemijskom anemijom. Prema tome, vrednosti Hct i Hb su samo delimično prihvatljivi za realnu procenu stepena anemije, jer ne daju potrebne podatke o UVE, volumenu plazme, niti o totalnom volumenu cirkulišuće krvi. Najzad, među bolesnicima, svakako, ima i onih kojima je pogodniji Hct od oko 0,24 i koncentracija Hb od oko 80 g/L. To se odnosi i za starije

bolesnike, za njih vrednosti treba da su još više – Hct oko

0,30 a koncentracija Hb oko 100 g/L. Kao opšte načelo, važi da će svaka jedinica koncentrovanih eritrocita – transfundovana prosečnoj odrasloj osobi sa normovolemijskom anemijom – dovesti do porasta Hct za oko 3%, uz istovremeno povećanje koncentracije Hb za oko 10 g/L (12–22).

U terapiji bolesnika sa anemijom, a u zavisnosti od potreba (npr. aloimunizacija protiv antigena krvnih ćelija i/ili plazmatskih proteina, "hronične" transfuzije, planirana transplantacija) primenjuju se različiti preparati koncentrovanih eritrocita. Upotreba svake od njih ima niz potencijalnih koristi, ali i sporedne efekte – što će biti predmet raspravljanja narednog dela teksta.

Resuspendovani eritrociti

Transfuzija RE je sredstvo izbora za lečenje potencijalno multitransfundovanih bolesnika, kojima se predviđa dugovremensko transfundovanje eritrocita – te mogu da razvijaju sporedne efekte hemoterapije. Od njih treba spomenuti: febrilnu nehemoliznu transfuzijsku reakciju (FNHTR), zatim transfuzijom udruženo akutno oštećenje pluća (TRALI), transfuzijom udruženu bolest "kalem protiv domaćina" (TA-GvHD) i druge imunomodulacijske (imunosupresija) efekte i komplikacije. Tako, terapijskom upotrebom RE postižu se: 1) otklanjanje leukocita ("buffy coat"-a) i mikroagregata; 2) prevencija TRALI; 3) sprečavanje TA-GvHD; 4) odlaganje imunske refraktornosti na transfuzije trombocita i 5) redukcija rizika od transmisije virusa – npr. citomegalovirusa (12, 20–23).

U praktičnom radu, jedinice RE pripremaju centrifugiranjem i izdvajanjem "buffy coat"-a iz jedinica krvi (otklonjeno je oko 70–80% leukocita) manuelnim ili automatizovanim postupkom, uz resuspendovanje eritrocita u AS (100 mL). Ovim postupkom nije

moгуće postići potreban stepen redukcije broja leukocita (leukodeplecija), neophodan za prevenciju FNHTR i drugih imunskih sporednih efekata alogenih transfuzija. Naime, metod otklanjanja "buffy coat"-a najmanje efikasan u pogledu redukcije broja leukocita, prednost mu je u tome što njegovo izvođenje ne zahteva korišćenje "otvorenog sistema" kesa, te ne postoji rizik od bakterijske kontaminacije jedinica hemoprodukta. Najzad, ovaj metod stvara povoljnije preduslove za naknadno filtriranje jedinica DK (1–4, 12).

Filtrovani leukociti

Filteri za otklanjanje leukocita prve, odnosno druge "generacije" su delovali, u prvom redu mehanički – zadržavajući ćelije (veličina pora im je bila različita, 170–260 μm , odnosno 20–40 μm) i omogućavali su otklanjanje većine leukocita i mikroagregata iz hemoprodukta. Filteri treće "generacije" su znatno efikasniji u redukciji broja leukocita jer pored mehaničkog zadržavanja, deluju i "adsorbujući" na leukocite. Filteri prve i druge generacije omogućavali su leukodepleciju u jedinicama FE za oko 99% do 99,99% – odnosno za oko 2–4 Log_{10} . Na taj način, oni su bili dovoljno efikasni za prevenciju kliničkog ispoljavanja FNHTR, ali ne i za sprečavanje aloimunizacije. Važeći standardi Asocijacije krvnih banaka SAD i Saveta Evrope predviđaju da nakon filtriranja u jedinici FE broj rezidualnih leukocita ne sme biti veći od 5×10^6 . Upotrebom filtera treće "generacije" to je moguće postići – leukodepleciju $\geq 4\text{--}5 \text{ Log}_{10}$, a time sprečiti ili odložiti i nastanak aloimunizacije, a ne samo pojavu FNHTR (1–4, 24–31).

Danas se prednost daje "ranom" filtriranju neposredno posle uzimanja, tokom procesiranja krvi ("in line" sistemi) – omogućavaju korišćenje "zatvorenog sistema" jer su integralni deo sistema kesa za prikupljanje krvi – nasuprot filtraciji pre ili posle skladištenja ("pre- i

post-storage" leukodeplecija) eritrocita. Primenom "in line" filtracije svedena je na najmanji stepen i *in vitro* produkcija imunoinflamacijskih citokina (u hemoproduktima), a time se sprečava ne samo aloimunizacija primaoca, nego pojava citokinima posredovane FNHTR. Po filtriranju, eritrocite treba resuspendovati i čuvati u nekom standardnom AS (12).

Najzad, zračenje hemoprodukta ultravioletnim (UV) zracima, odnosno inaktivacija leukocita je takođe efikasan metod prevencije aloimunizacije protiv leukocitnih antigena. Korišćenje UV zraka dovodi do smanjene ekspresije molekula sistema HLA na antigen prezentujućim ćelijama i promena u strukturi i funkciji adhezivnih molekula, odgovarajućih citokina, uz izmena u broju i funkciji limfocita CD8^+ . Važno je istaći to da doze UV zraka, koje mogu redukovati aktivnost limfocita, ne smanjuju funkcionalna svojstva i posttransfuzijsko preživljavanje eritrocita i trombocita (20–22).

Terapija koncentrovanim trombocitima

Spontana krvarenja su retka kod bolesnika sa brojem trombocita $10\text{--}20 \times 10^9/\text{L}$. To potvrđuje postojanje tzv. "individualnog trombocitopenijskog praga" – kritičnog za nastanak krvarenja. Zato, ne bi trebalo samo na osnovu broja trombocita u krvi bolesnika odlučivati o uvođenju transfuzija KT. Upotreba KT omogućava primenu veoma intenzivne hemioterapije, a korisni su i u zbrinjavanju drugih trombocitopenijskih stanja – na primer, bolesnici tretirani masivnom transfuzijom, izvođenje operacija na otvorenom srcu i drugo. Profilaksne transfuzije KT opravdane kada je broj trombocita oko $5\text{--}10 \times 10^9/\text{L}$ u klinički stabilnih bolesnika, odnosno oko $20 \times 10^9/\text{L}$ u onih sa povišenom telesnom temperaturom, sa udruženim poremećajem koagulacije i anatomskim lezijama. Kod bolesnika kod kojih se planira hirurška intervencija, indikacija za transfuziju KT je broj trombocita oko $50\text{--}100 \times 10^9/\text{L}$ (12, 20–22).

Terapijsku efikasnost KT moguće je proceniti proračunom vrednosti "korigovanog broja trombocita" (KBT) jedan sat posle transfuzije, uz praćenje in vivo efekta (normalizacija vremena krvarenja). KBT treba da iznosi oko $7 \times 10^3/\mu\text{L}$ po jedinici KT, a moguće je izračunat pomoću sledeće jednačine: $\text{KBT} = (\text{porast broja trombocita } [\mu\text{L}] \times \text{telesna površina } [\text{m}^2]) : \text{broj datih trombocita } [x10^{11}]$. S obzirom na to da su gore navedeni parametri funkcija više činilaca (na primer, funkcionalne očuvanosti trombocita u jedinici KT, pojave sepse, DIK-a ili aloimunizacije u primaoca i drugih), najpouzdaniji pokazatelj terapijskog učinka transfuzija KT je ipak sprečavanje ili prestanak krvarenja. U praktičnom radu koriste se dva osnovna metoda za prikupljanje ili za (obezbeđenje doze od oko $0,7 \times 10^{10}$ ćelija po kg telesne mase) i trombocitaferenza korišćenjem separatora krvnih ćelija (6–12, 22).

Što se tiče izdvajanja KT iz jedinica cele krvi, već je rečeno da KT mogu biti pripremani: 1) izdvajanjem KT iz plazme (PRP) ili 2) izdvajanjem iz "buffy coat"-a (BC-KT). Ova druga procedura podrazumeva automatizovano izdvajanje "buffy coat"-a korišćenjem procesora krvnih ćelija. Korišćenjem leukocitnih filtera, moguće je smanjiti broj leukocita u jedinicama KT za 5–7 Log_{10} . Ozračenje KT pomoću UV zraka samo delimično isključuje mogućnost nastanka aloiminizacije i TA-GvHD u imunosuprimovanih bolesnika. Izvođenje "in line" ili "pre-storage" leukodeplecije uglavnom sprečava *in vitro* produkciju imunoinflamacijskih citokina – te i posledičnu pojavu citokinima posredovane FNHTR (12).

Najbolji postupak pripremanja trombocita onaj koji podrazumeva upotrebu separatora krvnih ćelija. Pomoću ove tehnike moguće je ostvariti prinos od oko $2\text{--}4 \times 10^{11}$ trombocita po jedinici KT. Jedinica sadrži trombocite prikupljene od jednog davaoca (manji rizik transmisije virusa i

aloimunizacije), uz manji broj rezidualnih leukocita (separatori sadrže posebnu integralnu jedinicu za redukciju broja leukocita) (32–36).

Već je rečeno da KT treba transfundovati neposredno po pripremanju, a po potrebi one mogu biti skladištene do 5 do 7 dana na temperaturi $20 \pm 2^\circ\text{C}$, uz permanentno mešanje električnom tresilicom. Međutim, tokom skladištenja, broj trombocita u jedinicama KT se progresivno smanjuje u odnosu na njihov broj neposredno po pripremanju. Promenom morfološke distribucije, dolazi do opadanja funkcionalne vrednosti trombocita.

Zahtevi za transfuzijama trombocita su u stalnom porastu – pokazalo se da su KT veoma efikasni, ali (kao što je rečeno) ne i bez potencijalnih komplikacija. Zato, treba revidirati postojeće kriterijume za uvođenje transfuzija trombocita, ponekad koristiti KT u nezavisnosti od krvnogrupne pripadnosti ABO, uz moguću modifikaciju titra aloantitela (dodavanje aditivnog rastvora, puliranje i drugo). Uz sve to – a u cilju smanjenja rizika terapije alogenim hemoproduktima – treba raditi i na usavršavanju alteraniva suportivnog lečenja (primena KT) trombocitopenijskih bolesnika (12, 20–22).

Terapija plazmom i njenim derivatima

Hemoprodukti koji sadrže FVIII i FIX u koncentrovanom obliku se dobijaju prečišćavanjem iz plazme već više decenija. Pre pedesetak godina započeto je sa pripremanjem krioprecipitata – prvenstveno za nadoknadu FVIII:C, von Willebrand-ovog činioca (vWF) i fibrinogena. Međutim, ređe i blaže alergijske reakcije posle primene visokoprečišćenih produkata FVIII i FIX u odnosu na krioprecipitat, uz mogućnost upotrebe i u kućnim uslovima, dali su ovim koncentrovanim preparatima veliku popularnost. Tome su doprineli i stabilnost preparata u liofilizovanom stanju (mogućnost čuvanja

na temperaturama 4 ± 2 °C i 20 ± 2 °C) i njihova laka rekonstitucija, odnosno terapijska primena (6–8, 12). Ciljevi pri prečišćavanju i primeni hemostatskih hemoprodukta su:

- postizanje maksimalnog prinosa aktivne supstance;
- optimizirani terapijski učinak, uz minimizaciju sporednih efekata i
- redukcija rizika transmisije uzročnika hematogenih bolesti.

Produkti FVIII i FIX niske čistoće imaju specifičnu aktivnost oko 1 IJ/mg proteina; produkti srednje čistoće 1–5 IJ/mg; produkti visoke čistoće 100–150 IJ ili više po mg proteina (6–8, 12, 20).

Rizik od transmisije virusa može biti smanjen pravilnim izborom i testiranjem davalaca na markere transmisivnih bolesti, odnosno primena procedura inaktivacije virusa. Efikasnijim procedurama prečišćavanja ne samo što se doprinosi poboljšavanju kvaliteta preparata, nego i redukciji broja virusnih čestica u njima (10, 37–38).

Suština uspešne profilakse i lečenja hemostatskih poremećaja su brzo utvrđivanje deficitarnog činioca i kvantifikacija aktivnosti, od čega zavisi izbor i doziranje hemostatskih hemoprodukta i trajanje lečenja. Terapiju treba započeti što ranije radi svođenja neželjenih sekvela na minimum.

Zamrznuta sveža plazma

ZSP je plazma izdvojena iz jedinice sveže krvi, a samo ponekad prikupljena plazmaferezom i zamrznuta u roku od najkasnije 6 sati od uzimanja krvi na -90 °C, a zatim uskladištena do terapijske upotrebe na temperaturi od -30 ± 5 °C i nižoj. Volumen prosečne jedinice ZSP iznosi 200–250 mL. U tako pripremljenoj ZSP gubitak labilnih činilaca koagulacije (FV i FVIII) sveden na minimum, te ona sadrži u dovoljnim količinama sve činioce sistema koagulacije, ali i fibrinolize i komplementa, uz onkotski efikasne proteine i imunoglobuline (12, 20–22).

ZSP može biti korišćen neposredno u lečenju bolesnika, prvenstveno, sa globalnim deficitom činilaca hemostaze ili služi kao izvor prilikom pripremanja

odgovarajućih plazmatskih derivata. Mišljenja u vezi sa neposrednom terapijskom primenom ZSP, nisu u potpunosti ujednačena jer su limitirane specifične indikacije njene upotrebe. Ipak, poslednje dve decenije nisu konstatovane značajne promene u zastupljenosti ovog krvnog produkta u hemoterapiji.

Generalno, terapijska doza i učestalost infuzija ZSP zavisi od vrste i stepena deficita činilaca hemostaze. Takođe, ukoliko vrsta deficita određenog činioca kod bolesnika koji masivno krvari nije mogao biti utvrđen, preporučuje se infuzija ZSP radi brzog postizanja hemostatskog efekta, s tim što treba voditi računa o zapremini ZSP – da ne bi došlo do preopterećenja cirkulacije i trovanja citratom (1–3, 12).

Krioprecipitat

Krioprecipitat je hemoprodukt koji sadrži plazmatske proteine, izdvojene taloženjem u toku odmrzavanja ZSP na temperaturi od 4 ± 2 °C. U krioprecipitu 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, uz terapijski efikasnu količinu fibronektina. Pripremljeni krioprecipitat može biti čuvan na temperaturi -30 ± 5 °C do terapijske upotrebe. Primena krioprecipitata je opravdana kod bolesnika koji aktivno krvare ili su neposredno pred hirurškim zahvatom, a imaju: 1) blagi oblik hemofilije A (odsustvo koncentrata ovog činioca); 2) von Willebrand-ovu bolest; 3) hipofibrinogenemiju. Prema važećim standardima, aktivnost FVIII:C po jedinici krioprecipitata treba da iznosi 80 IJ ili više (12, 39–46).

U vezi sa primenom krioprecipitata kod bolesnika sa hipofibrinogenemijom treba

napomenuti da je to danas najpogodniji koncentrovani preparat fibrinogena (osim komercijalnog fibrinogena). Prosečan sadržaj fibrinogena po jedinici krioprecipitata iznosi oko 250 mg, a prema standardima njegova minimalna količina treba da

bude 150 mg. Najzad, zbog relativno visokog sadržaja fibronektina, krioprecipitat se uspešno primenjuje i u lečenju bolesnika sa sepsom, teškom traumom ili opekotinom (12). Zavisno od krvne grupe davaoca, u krioprecipitatu mogu biti prisutna i aloantitela anti-A ili anti-B u približno istom titru kao i u izvornim jedinicama plazme, te prilikom primene treba poštovati kompatibilnost u sistemu ABO, da bi se izbegla hemolizna reakcija u primaoca (1–4).

Izvođenjem krioprecipitacije plazme (posebno reciklažne modifikacije osnovne metode), moguće je pripremati kvalitetni fibrinski lepak (FL) za lokalnu terapijsku primenu. Najkraće rečeno, FL je dvokomponentni biološki sistem, namenjen postizanju lokalnog hemostatskog, adhezivnog i “zaptivnog” efekata. FL može služiti i kao “matriks” za lokalnu aplikaciju aktivnih supstanci – na primer, faktora rasta fibroblasta, antibiotika, citostatika, itd. (12, 39–46). 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 tromboembolizma kod primaoca. Zato ne treba dozvoliti neopravdanu i prekomernu upotrebu krioprecipitata. Na kraju, moguće je sumirati da je primena krioprecipitata danas sigurno opravdana za nadoknadu fibrinogena i za pripremanje 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 bolesnika sa von Willebrand-ovom bolešću.

Literatura

1. Mollison PL, Engelfriet CP, Contreas M. Blood transfusion in clinical medicine. 10th ed. Oxford: Blackwell Scientific Publications; 1997.
2. Balint B, Radović M, Ciko Z, Milenković Lj, Đurić D, Đuričković V. Hemoterapija hemoragijskih sindroma. Vojnosanit Pregl 1985; 42: 39–43.
3. Balint B. Lečenje bolesnika sa anemijskim sindromom. U: Gligorović V, Balint B, urednici. Klinička transfuziologija. Beograd: Zavod za udžbenike i nastavna sredstva; 1998; 189-210.
4. Balint B, Taseski J. Terapijska primena hemoprodukata i njihovih alternativa kod poremećaja hemostaze. Beograd: Udruženje ART Jugoslavije, 2001.
5. Roback DJ, Grossman JB, Harris T, Hillyer DC (Eds). Technical Manual, 17th Edition. Bethesda: AABB Press; 2011.
6. Klein HG, Anstee DJ. Mollison's Blood Transfusion in Clinical Medicine. 12th ed. Wiley-Blackwell; 2014.
7. Balint B. Principi intenzivne hemoterapije. Beograd: GŠ–SCG i VMA; 2004.
8. Balint B, Trkuljić M, Todorović M. Osnovini principi hemoterapije. Beograd: Čigoja štampa; 2010.
9. Liumbruno G, Bennardello F, Lattanzio A, Piccoli P, Rossetti G; Italian Society of Transfusion Medicine and Immunohaematology (SIMTI) Work Group. Recommendations for the transfusion of plasma and platelets. Blood Transfus 2009; 7: 132–50.
10. Radović M, Balint B, Popov P: Funkcija 2,3 difosfoglicerata u oksigenaciji tkiva. Sombor: Zbornik radova XII Somborskih medicinskih dana, 1988; 91-111.
11. Klein HG, editor. Standards for blood banks and transfusion services. 17th ed. Bethesda, MD: American Association of Blood Banks, 1996.

12. Balint B, Vucetic D, Ostojic G, Ljubenov M. Osnovi transfuziologije sa hemobiologijom. Beograd: Medicinski fakultet VMA – Medija centar Odbrana; 2015.
13. Balint B, Todorović M, Ostojić G, Urošević I. Hemobiologija i terapijska primena eritrocita – od dogmi do savremenih pristupa. Beograd: Udruženje ART Srbije; 2007.
14. Valeri CR, Crowley JP, Loscalzo J. The red cell transfusion trigger: has a sin of commission now become a sin of omission? *Transfusion* 1998; 38: 602–10.
15. Čalija B, Balint B. Principi transfuzione terapije. U: Vučović D, urednik. Intenzivna terapija. Beograd: Zavod za udžbenike i nastavna sredstva; 1998. p. 229–74.
16. Wang JK, Klein HG. Red blood cell transfusion in the treatment and management of anaemia: the search for the elusive transfusion trigger. *Vox Sang* 2010; 98: 2–11.
17. Reiles E, Van der Linden P. Transfusion trigger in critically ill patients: has the puzzle been completed? *Crit Care* 2007; 11: 142.
18. So-Osman C, Cicilia J, Brand A, Schipperus M, Berning B, Scherjon S. Triggers and appropriateness of red blood cell transfusions in the postpartum patient—a retrospective audit. *Vox Sang* 2010; 98: 65–9.
19. Blajchman MA. Immunomodulatory effects of allogeneic blood transfusions: clinical manifestations and mechanisms. *Vox Sang* 1998; 3 (Suppl 2): 315-19.
20. Gligorović V, Balint B. Klinička transfuziologija. Beograd: Zavod za udžbenike i nastavna sredstva; 1998.
21. Gligorović V, Balint B, Čalija B. Osnovi kliničke transfuziologije. Urgentna i elektivna hemoterapija hemobioloških poremećaja. Beograd: ZTK Srbije, 1996.
22. Balint B. Hemomodulatorni mehanizmi i terapijski pristupi. Beograd: Zavod za udžbenike i nastavna sredstva, 1999.
23. Mynster T, Dybkaer E, Kronborg G, Nielsen HJ. Immunomodulating effect of blood transfusion: is storage time important? *Vox Sang* 1998; 74: 176-81.
24. Nightingale SD. Universal WBC reduction. *Transfusion* 2001; 41: 1306–9.
25. Vamvakas EC, Blajchman MA. Universal WBC reduction: the case for and against. *Transfusion* 2001; 41: 691–712.
26. Engelfriet CP, Reesink HW, Pietersz RN, Schwartz DW, Mayr WR, Blajchman MA, et al. Universal leucocyte-depletion of blood components: cell concentrates and plasma. *Vox Sang* 2001; 81: 56–77.
27. Sollberger T5, Walter R, Brand B, Contesse J, Meredith DO, Reinhart WH. Influence of prestorage leucocyte depletion and storage time on rheologic properties of erythrocyte concentrates. *Vox Sang* 2002; 82: 191–7.
28. Chabanel A, Andreu G, Carrat F, Herve P. Quality control of leucoreduced cellular blood components in France. *Vox Sang* 2002; 82: 67–71.
29. Rapaille A, Moore G, Siquet J, Flament J, Sondag-Thull D. Prestorage leukocyte reduction with in-line filtration of whole blood: evaluation of red cells and plasma storage. *Vox Sang* 1997; 73: 28-35.
30. Riggert J, Schwartz DWM, Wieding JU, Mayr WR, Köhler M. Prestorage in-line filtration of whole blood for obtaining white cell-reduced blood components. *Transfusion* 1997; 37: 1039-44.
31. Shanwell A, Kristiansson M, Remberger M, Rinden O. Generation of cytokines in red cell concentrates during storage is prevented by prestorage white cell reduction. *Transfusion* 1997; 37: 678-83.
32. Arsić M, Balint B, Radović M. Separatori krvnih ćelija i njihova primena u savremenoj medicini. *Anest Reanim Transf* 1982; 14: 85–90.
33. Moog R, Muller N Goergens D. Platelet collection with the Amicus and the

- AS.TEC 204 blood cell separators. Transfusion 1998; 38: 285–9.
34. Palmer DS, Aye MT, Dumont L, Dumont D, McCombie N, Giulivi A, et al. Prevention of cytokine accumulation in platelets obtained with the COBE Spectra apheresis system. Vox Sang 1998; 75: 115–23.
 35. Benjamin RJ, Rojas P, Christmas S, Neal J, Broughton S, Burgio C, et al. Plateletpheresis efficiency: a comparison of the Spectra LRS and AMICUS separators. Transfusion 1999; 39: 895–9.
 36. Colman RW, Clowes AW, Goldhaber SZ, Marder VJ, George JN (Eds). Hemostasis and Thrombosis: Basic Principles and Clinical Practice, 5th edition. Philadelphia: Lippincott Williams and Wilkins; 2006.
 37. Hellstern P. Fresh–frozen plasma, pathogen–reduced single–donor plasma or bio–pharmaceutical plasma? Transfus Apher Sci 2008; 39: 69–74.
 38. De Backer D, Vandekerckhove B, Stanworth S, Williamson L, Hermans C, Van der Linden P, et al. Guidelines for the use of fresh frozen plasma. Acta Clin Belg 2008; 63: 381–90.
 39. Elliott BM, Aledort LM. Restoring hemostasis: fibrinogen concentrate versus cryoprecipitate. Expert Rev Hematol 2013; 6: 277–86.
 40. Levy JH, Welsby I, Goodnough LT. Fibrinogen as a therapeutic target for bleeding: a review of critical levels and replacement therapy. Transfusion 2013. doi:10.1111/trf.12431. [Epub ahead of print].
 41. Holcomb JB, Fox EE, Zhang X, White N, Wade CE, Cotton BA, et al. Cryo precipitate use in the prospective observational multicenter major trauma transfusion study (PROMMTT). J Trauma Acute Care Surg 2013; 75(1 Suppl 1): S31–S39.
 42. Mejak BL, Ing RJ, McRobb C, Ellis WC, Lawson DS, Twite MD, et al. Cryoprecipitate and platelet administration during modified ultrafiltration in children less than 10 kg undergoing cardiac surgery. J Extra Corpor Technol 2013; 45: 107–11.
 43. Liu S, Fan J, Wang X, Gong Z, Wang S, Huang L, et al. Intraoperative cryoprecipitate transfusion and its association with the incidence of biliary complications after liver transplantation—a retrospective cohort study. PLoS One 2013; 8: e60727.
 44. Balint B, Radović M, Balint L. Fibrinski lepak – efektivni adhezivno–hemostazni sistem. Vojnosanit Pregl 1995; 52: 477–82.
 45. 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: 135–46.
 46. Malicevic Z, Balint B, Ninkovic M, Ostojic G. Intrabdominal hemostatic efficacy of single–donor fibrin sealant in experimental model of uncontrolled truncal hemorrhage. Blood Banking Transf Med 2004; 2: 104–11.



NOVA MUTACIJA PROTROMBINA F2 c.1787G>A - GENSKA MUTACIJA KOJA DOVODI DO REZISTENCIJE NA ANTITROMBIN

Mirjana Kovač^{1,2}

Medicinski fakultet Beograd¹

Institut za transfuziju krvi Srbije, Beograd, Srbija²

Sažetak

Nedavno otkrivena i opisna mutacija protrombina F2 c.1787G>T, koja uslovljava nastanak rezistencije na antitrombin je poslednja otkrivena, genetski determinisana trombofilija. Mutacija predstavlja vrlo ozbiljnu trombofiliju sa klinički jasno ispoljenim efektom u smislu pojave tromboembolijskih komplikacija, koje se vrlo rano javljaju i imaju tendenciju rekurentnosti. Incidenca ove nove mutacije je niska, tako da za sada imamo podatke o pojavi mutacije u nekoliko porodica različite etničke pripadnosti. Za novootkrivenu mutaciju F2 c.1787G>T (p.Arg596Leu), koja je opisana kao Yukuhashi mutation dato je i objašnjenje mehanizma dejstva, odnosno njenog efekta u hemostaznom sistemu. U našoj populaciji otkrivene su do sada dve porodice sa novom mutacijom protrombina, nazvanom Belgrade mutation F2 c.1787G>A (p.Arg596Gln). Ta novootkrivena mutacija je ujedno predstavljala prvi slučaj nove mutacije protrombina u beloj populaciji. Nedavno su istraživači iz Italije i Indije dali dokaz o postojanju nove mutacije na nivou protrombina u njihovim populacijama (Padua i Amrita), što ukazuje da će tek u budućnosti biti poznata prevalenca ove nove trombofilije kao i njen klinički značaj. Otkriće ove urođene trombofilije ukazuje na značaj nastavka istraživanja u ovoj oblasti i primene genetskih analiza, koje nam daju uvid o određenom poremećaju na molekularnom nivou, koji u hemostaznom sistemu dovodi do nastanka patofizioloških mehanizama koji doprinose stvaranju tromboznih komplikacija.

Ključne reči: venski tromboembolizam, genske mutacije, urođena trombofilija

Uvod

Pacijenti sa urođenom trombofilijom imaju kliničku sliku ispoljavanja venskog tromboembolizma (VTE) veoma rano. Kod određenog broja pacijenata tromboze se ispoljavaju kao tromboze neuobičajene lokalizacije, često se ponavljaju i prisutne su kod određenog broja članova porodice (1). Takođe mogu biti udružene sa komplikacijama trudnoće, a najčešće sa ponavljanim gubicima trudnoće. Genetska ispitivanja su pokazala da genski defekt može da dovede do dve vrste poremećaja:

I Genski defekti koji uslovljavaju gubitak funkcije (primer deficita prirodnih inhibitora) U tom slučaju funkcionalni testovi pokazuju sniženu biološku

aktivnost inhibitora. Smanjenje aktivnosti inhibitora dovodi do smanjene mogućnosti za inaktivaciju već stvorenog trombina, kada se radi o deficitu antitrombina (AT), odnosno smanjenja inaktivacije faktora koagulacije koji učestvuju u stvaranju trombina kada se radi o deficitu proteina C odnosno proteina S (1,2).

II Genske mutacije na nivou prokoagulantnih faktora koagulacije (primer mutacije, FVLeiden i protrombina FIIG-20210A)

U tom slučaju dolazi do porasta nivoa mutiranih faktora koagualacije, čiju aktivnost u plazmi merimo kao povećanu. Dolazi do uvećanog rizika za

povećano stvaranje trombina. U slučaju ove trombofilije određene rizične situacije najčešće uslovljavaju nastanak VTE (1).

Primena genstkh testova u detekciji molekularnog poremećaja

Saznanje da VTE ima snažan genetski rizik datira još od šezdesetih godina prošlog veka, a danas se procenjuje da 50 % VTE uzrokuju različite genske mutacije, koje su udružene sa rizikom za pojavu VTE (2). Jordan i Nandorff su 1956. godine po prvi put opisali porodično prisutne tromboze, da bi deset godina kasnije 1965. godine usledilo otkriće mutacije koja dovodi do deficita antitrombina (AT), u norveškoj porodici sa epizodama VTE (3). Nekoliko godina kasnije 1969. godine usledilo je otkriće povezanosti ABO lokusa koji kodira ABO krvno grupni sistem sa pojavom VTE (4). Međutim tačan uticaj ABO lokusa na razvoj VTE razjašnjen je tek nakon 40 godina, otkrićem povezanosti ABO lokusa. Naime A1 i B krvne grupe su povezane sa povećanim nivom vWF/FVIII, što uvećava rizik za VTE 1.5 puta (5). U ranim osamdesetim identifikovan je novi genski rizik za VTE vezan za deficit preostala dva prirodna inhibitora hemostaznog sistema proteina C i proteina S (6). Potom je u toku 1994. godine usledilo otkriće rezistencije na aktivirani protein C (APC) da bi ubrzo bila identifikovana mutacija *FV Leiden* (*F5 R606Q*), koja je razlog prisutne rezistencije na APC i ujedno najučestalija urođena trombofilija kod bolesnika sa VTE (7, 8). Potom je 1996. godine usledilo otkriće po učestalosti druge najznačajnije urođene trombofilije, mutacije protrombina *F2 G20210*. Ova mutacija uslovljava povećanje aktivnosti protrombina u plazmi i na taj način uvećava rizik za trombozu (9). Nakon desetak godina je usledilo otkriće

PROCR gena koji kodira sintezu endotelijalnog protein C receptora (*EPCR*), glavnog regulatora PC aktivacije (10). Mutacija na nivou fibrinogen gama gena (*FGG*) koji pripada fibrinoliznoj kaskadi, otkrivena je 2005. godine. Njeno prisustvo redukuje nivo gama fibrinigena i tako uvećava rizik za trombozu (11). Koliko je značajno istraživanje genske pozadine za razvoj VTE, a koji se javlja u sklopu porodica, pokazalo je nedavno otkriće na nivou protrombina koje su nedavno objavili istraživači iz Japana.

III Genska mutacija na nivou prokoagulantnog faktora koja dovodi do rezistencije na AT

Radi se o potpuno novom mehanizmu dejstva genske mutacije koji dovodi do stvaranja rezistencije na AT. Naime, Miyawak-i i saradnici su u toku 2012. godine u japanskoj porodici sa juvenilnim trombozama otkrili novu mutaciju protrombina, *F2c.1787G>T* (p.Arg596Leu), i nazvali je „*Yukuhashi mutation*“. Mutacija je otkrivena kod devojčice starosti 17 god sa ozbiljnom venskom trombozom. Takođe, kod 9 članova porodice je bila prisutna jedna ili više tromboza, komplikovanih PE, a kod 5 članova porodice tromboze su se javljale veoma rano (juvenilne). Zabeležena su tri smrtna ishoda (12). Ista grupa autora je uspela da definiše i test kojim se na osnovu merenja kinetike inaktivacije stvorenog trombina utvrđuje postojanje rezistencije na AT (13). Naredne godine, gotovo identičan mehanizam je utvrđen u slučaju mutacije *F2 c.1787G>T* (p.Arg596Gln), „*Belgrade mutation*“, koja je utvrđena kod dve naše porodice sa juvenilnim trombozama (14). Mutacija predstavlja prvo otkriće mutacije protrombina koja uzrokuje rezistenciju na AT u beloj rasi. Novootkrivena mutacija pogađa rezidualni deo molekula protrombina u okviru dva vezujuća mesta:

“Sodium - binding site” deo aktivnog molekula protrombina;

“Antithrombin - binding site” deo molekula koji se u prisustvu heparina vezuje za AT.

Mutacija u okviru vezujućeg mesta „Sodium-binding site“ uslovljava da je prokoagulantna aktivnost mutiranog protrombina nešto poremećena.

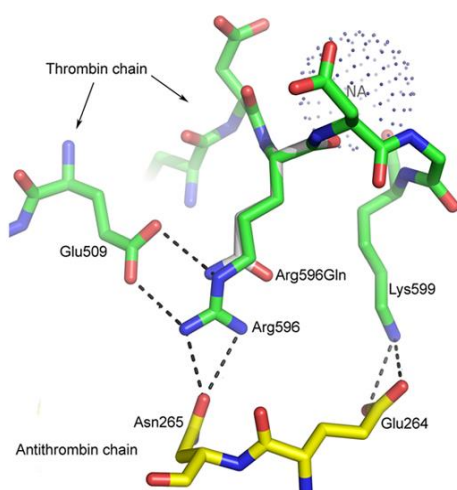
Mutacija u okviru vezujućeg mesta „Antithrombin - binding site“ uslovljava poremećaj inaktivacije trombina i stvaranje inaktivisanog kompleksa trombin-antitrombin (TAT).

Nasuprot prethodno ustanovljenoj mutaciji protrombina *FII G20210A*, koja je povezana sa povećanom aktivnošću protrombina u plazmi, kod novoutvrđene mutacije aktivnost protrombina u plazmi je normalna ili čak blago snižena (9, 12).

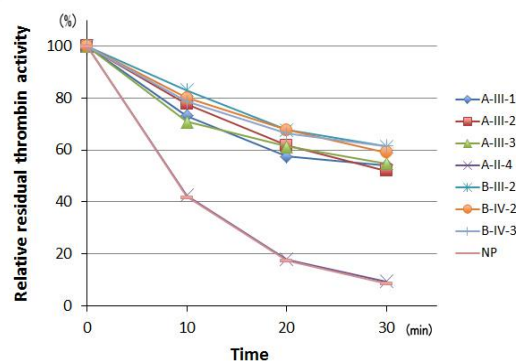
Nova mutacija protrombina *F2 c.1787G>A (p.Arg596Gln) - Belgrade mutation*

Grafikon 1. Model efekta nove mutacije i kinetička analiza inaktivacije trombina antitrombinom

A



B



Relative residual thrombin activity

	0 min	10 min	20 min	30 min
A-III-1	100*	73.2	57.5	54.1
A-III-2	100	77.7	61.8	51.9
A-III-3	100	70.9	61.3	54.8
A-II-4	100	42.5	17.7	9.4
B-III-2	100	83.1	67.6	61.4
B-IV-2	100	80.0	67.7	59.0
B-IV-3	100	78.6	66.3	61.6
NP**	100	42.0	17.5	8.7

*number: %, ** NP: normal pooled plasma

Mutacija *F2 c.1787G>T (p.Arg596Gln)*, „Belgrade mutation“, je smeštena u zadnjem egzonu protrombin gena, a rezultira u zameni Arg596Gln. Utvrđena je kod dve naše porodice sa juvenilnim trombozama. Od ukupno 8 članova obe porodice kod polovine tromboze su se javljale kao juvenilne. Imale su tendenciju rekurentnosti i kod velikog broja članova porodice su se komplikovale plućnom embolijom. Osim venskih tromboza u obe porodice se zabeležene arterijske tromboze: infarkt miokarda, CVI te tromboze mezenterijalnih arterija (14). U najmlađeg nosioca mutacije neposredno posle rođenja se razvija tromboza centralnog nervnog sistema(CNS), duralni sinus.

U svih naših nosilaca ove mutacije dokazan je mehanizam rezistencije na AT (graf 1). Analize su urađene u Japanu u saradnji sa prof Tetsuhito Kojima (Department of Pathophysiological Laboratory Sciences, Nagoya University Graduate School of Medicine, Nagoya).*

(A) Trombin- antitrombin pristup i moguće posledice prisutne mutacije A: trombin (zeleno), antitrombin (žuto) i model Gln596 mutirane rezidue (sivo), N+vezujuće mesto. Vodonične veze su prikazane sa isprekidanim crnim linijama. (B) Kinetička analiza inaktivacije trombina antitrombinom (referenca 14)

Povezanost nove mutacije sa komplikacijama u trudnoći

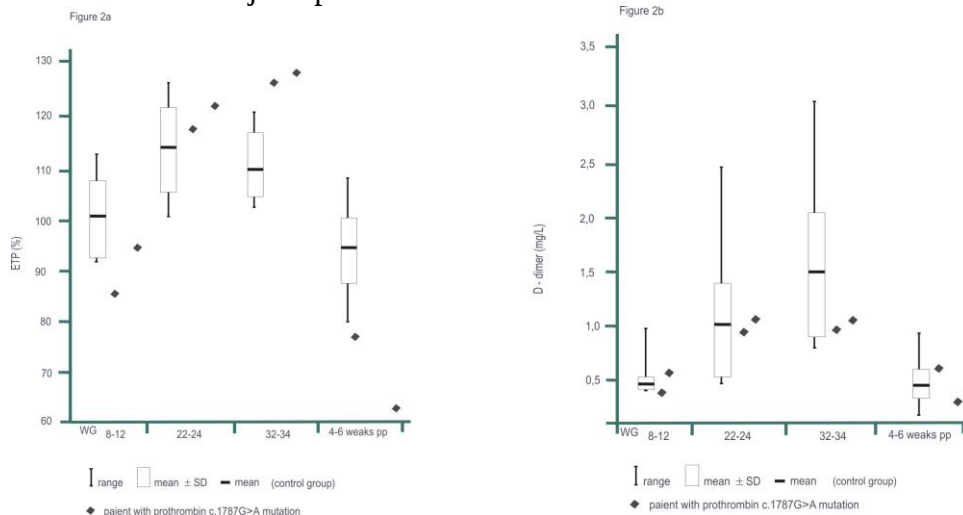
Dok je udruženost protrombin G201210A mutacije sa rizikom za venske tromboze i komplikacije trudnoće dobro dokumentovana (15-18), uloga novo-otkrivene mutacije c.1787G>A još uvek je neistražena. U toku trudnoće, kod više članova obe porodice, javljaju se ozbiljne komplikacije kao što su venske tromboze koje se komplikuju PE, CVI te spontani pobačaji.

Nedavno je publikovan prvi uspešan ishod trudnoće u nosioca nove mutacije c.1787G>A. To je bila prva trudnoća kod najmlađeg člana jedne od dve srpske porodice sa utvrđenim genskim defektom (19). Ona je prethodno imala dve tromboze komplikovane plućnom embolijom.

U planiranju terapijskog tretmana uzet je u obzir anamnestički podatak da je njena

starija sestra već imala pobačaj uz primenu standardne doze niskomolekularnog heparina (LMWH), a ubrzo potom razvila i PE, dok je njena majka umrla neposredno nakon trećeg porođaja zbog masivne PE. Imajući u vidu sve ove podatke, u toku trudnoće je primenjena visoka profilaktička doza LMWH od rane trudnoće, koja je podešavana u odnosu na rezultate anti-Xa, da bi se održavao nivo heparinemije iznad 0.5 IU/ml (0.62-0.80 IU). Sa ciljem da se dokaže da li je primenjena doza LMWH dovoljna za supresiju hemostatske aktivacije, u toku trudnoće su praćena dva testa endogeni trombin potencijal (ETP) i D-dimer (graf 2). Oba testa su pokazala da je primenjena doza od 0.6 ml, koja je potom od 14. nedelje povećana na 0.6 + 0.3 ml, na 12 h bila dovoljna da prevenira efekat mutacije na lokalnom (placentarnom), odnosno sistemskom nivou u smislu prevencije tromboze. Međutim, kod bebe se nakon porođaja u prvim danima života razvija tromboza CNS. Ovi naši rezultati su bili ohrabrujući za one nosioce mutacije koji su planirali trudnoću. Međutim, podatak da kod njene setre uprkos profilaktičke primene visokih doza LMWH dolazi do gubitka trudnoće, ukazuje da je ovo još uvek nedovoljno istražena oblast.

Grafikon 2 Endogeni trombin potencijal i D-dimer u toku trudnoće kod zdravih trudnica i ispitanice sa novom mutacijom protrombina c.1787G>A



Perspektive i značaj genskih testova u identifikaciji molekularnih defekata u hemostaznom sistemu

Venski tromboembolizam (VTE) predstavlja treći vodeći razlog kardiovaskularnog mortaliteta posle koronarne arterijske bolesti i moždanog udara (20). Godišnja incidenca VTE je oko 1% (21), međutim varijabilnost incidence je zavisna od populacije. Etnička pripadnost je veoma važna u sagledavanju prevalencije najznačajnijih genskih mutacija koje su udružene sa VTE. Primer za to je učestalost mutacija FV Leiden i protrombin G 20210A, koje su za razliku od bele populacije vrlo retke ili gotovo odsutne u ostalim rasama, a u evropskoj populaciji predstavljaju najučestaliji genski defekt udružen sa VTE (22). Stoga, *genome-wide association study* (GWAS studije) koje su sprovedene u evropskoj populaciji (6), a u sklopu kojih se nalaze i podaci za naše ispitanike su relevantne za nas i našu populaciju. Oko 50% VTE nastaje bez preoznatljivog faktora rizika kao što je malignitet, trudnoća, operacija, povreda, infekcija ili pak dugotrajno sedenje i navičaju se idiopatskim trombozama. Godišnja stopa rekurentnosti idiopatskih tromboza, nakon obustavljanja antikoagulantne terapije je oko 10%, sa činjenicom da 10% pacijenata umire od fatalne PE (23). S druge strane kod 20-50% pacijenta se javlja posttrombotički sindrom, povezan sa problemom pokretljivosti funkcionalnosti kao i velikim uticajem na kvalitet života (24, 25).

Zaključak Imajući u vidu sve navedene činjenice nastavak istraživanja u ovoj oblasti je od velikog značaja, pri čemu genske analize omogućavaju razjašnjenje molekularnih defekata koji u hemostaznom sistemu dovode do patofiziološkog mehanizama koji je povezan sa rizikom za nastanak trombotičke komplikacije.

Reference:

1. Bertina RM. Genetic approach to thrombophilia. *Thromb Haemost* 2001; 86:92-103.
2. Zöller B, et al. Age- and gender-specific familial risks for venous thromboembolism: a nationwide epidemiological study based on hospitalizations in Sweden. *Circulation* 2011; 124: 1012–1020.
3. Egeberg O. Inherited antithrombin deficiency causing thrombophilia. *Thromb Diath Haemorrh* 195; 13: 516–530.
4. Jick H, et al. Venous thromboembolism disease and ABO blood type. A cooperative study. *Lancet* 1969; 1: 539–542.
5. Heit JA, et al. A genome-wide association study of venous thromboembolism identifies risk variants in chromosomes 1q24.2 and 9q. *J Thromb Haemost* 2012; 10: 1521–1531.
6. Griffin JH, et al. Deficiency of protein C in congenital thrombotic disease. *J Clin Invest* 1981; 68: 1370–1373.
7. Dahlbäck B, et al. Familial thrombophilia due to a previously unrecognized mechanism characterized by poor anticoagulant response to activated protein C: prediction of a cofactor to activated protein C. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993;90: 1004–1008.
8. Bertina RM, et al. Mutation in blood coagulation factor V associated with resistance to activated protein C. *Nature* 1994; 369: 64–67.
9. Poort SR, et al. A common genetic variation in the 3'-untranslated region of the prothrombin gene is associated with elevated plasma prothrombin levels and an increase in venous thrombosis. *Blood* 1996; 88: 3698–3703.
10. Stearns-Kurosawa DJ, et al. The endothelial cell protein C receptor augments protein C activation by the thrombin-thrombomodulin complex. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996; 93: 10212–10216.

11. Uitte de Willige S, et al. Genetic variation in the fibrinogen gamma gene increases the risk for deep venous thrombosis by reducing plasma fibrinogen gamma' levels. *Blood* 2005; 106: 4176–4183.
12. Miyawaki Y, Suzuki A, Fujita J, Maki A, Okuyama E, Murata M, Takagi A, Murate T, Kunishima S, Sakai M, Okamoto K, Matsushita T, Naoe T, Saito H. & Kojima, T. Thrombosis from a prothrombin mutation conveying antithrombin resistance. *New Engl J Med* 2012; 366: 2390-2396.
13. Murata M, Takagi A, Suzuki A, Okuyama E, Takagi Y, Ando Y, Kato I, Nakamura Y, Murate T, Matsushita T, Saito H, Kojima T. Development of a new laboratory test to evaluate antithrombin resistance in plasma. *Thromb Res* 2014;133: 293-298.
14. Djordjevic V, Kovac M, Miljic P, Murata M, Takagi A, Pruner I, Francuski D, Kojima T, Radojkovic D. A novel prothrombin mutation in two families with prominent thrombophilia-the first case of antithrombin resistance in a Caucasian population. *J Thromb Haemost* 2013;11:1936-1939.
15. Poort SR, Rosendal FR, Reitsma PH, Bertina RM. A common genetic variation in the 3'-unrelated region of the prothrombin gene is associated with elevated plasma prothrombin levels and an increase in venous thrombosis. *Blood* 1996; 88: 3698-3703.
16. Kapur RK, Mills LA, Spitzer SG, Hultin MB. A prothrombin gene mutation is significantly associated with venous thrombosis. *Arterioskler Thromb Vasc Biol* 1997; 17:2875-2879.
17. Robertson L, Wu O, Langhorne P, Twaddle S, Clark P, Lowe GD, Walker ID, Greaves M, Brenkel I, Regan L, Greer IA. Thrombophilia in pregnancy: systematic review. *Br J Haematol* 2006; 132: 171-196.
18. Kovac M, Mitic G, Mikovic Z, Djordjevic V, Savic O, Mandic V, Rakicevic Lj, Antonijevic N, Radojkovic D. Thrombophilia in women with pregnancy-associated complications: fetal loss and pregnancy related venous thromboembolism. *Gynecol Obst Invest* 2010; 69: 233-238.
19. Kovac M, Elezovic I, Mikovic Z, Mandic V, Djordjevic V, Radojkovic D, Lalic-Cosic S, Murata M, Takagi A, Kojima T. High prophylactic LMWH dose successfully suppressed hemostatic activation in pregnant woman with a new prothrombin c.1787G>A mutation. *Thromb Res* 2015;135:420-22.
20. Lewis DA, et al. Whole blood gene expression profiles distinguish clinical phenotypes of venous thromboembolism. *Thromb Res* 2015; 135: 659–665.
21. ISTH Steering Committee for World Thrombosis Day. Thrombosis: a major contributor to global disease burden. *Thromb Haemost* 2014; 112: 843–852.
22. Bounameaux H, Rosendaal FR. Venous thromboembolism: why does ethnicity matter? *Circulation* 2011; 123: 2189–2191.
23. Rosendaal FR. Once and only once. *Circulation* 2010; 121: 1688–1690.
24. de Haan HG, et al. Multiple SNP testing improves risk prediction of first venous thrombosis. *Blood* 2012; 120: 656–663.
25. Morange PE et al.. Genetic of venous thrombosis:update in 2015. *Thromb Haemost* 2015;114:1-10.

HEMOVIGILANCA KOD DAVALACA KRV I KOMPONENATA KRV I

Nataša Vavić

Institut za transfuziju krvi Srbije, Beograd

Sažetak

Hemovigilanca označava niz uređenih procedura koje su u vezi sa komplikacijama koje se odnose na davaoce i primaoce krvi/komponentata krvi, prema Direktivama 2002/98/EC Evropskog Parlamenta i Saveta Evrope. Upoznavanje sa najnovijim Standardima za prikupljanje i prikazivanje podataka o komplikacijama vezanim za davanje krvi/komponentata, koje su postavile Radna grupa Evropske hemovidžilans mreže-EHN i Međunarodno udruženje transfuziologa-ISBT, je osnova za formiranje Nacionalnog hemovigilance programa u kom bi se sistematski vršila analiza uobičajenih komplikacija vremenski povezanih sa davanjem krvi/komponentata krvi. Ovim bi se eliminisala dilema kao što je: šta se prijavljuje od neželjenih reakcija, ko prijavljuje, kome i kako. Nadzor nad neželjenim reakcijama kod davalaca krvi/komponentata znači: učiniti sve da do njih ne dođe, što brže pružiti adekvatnu medicinsku pomoć, utvrditi uzrok i sprovesti korektivnu i preventivnu meru, a sve ovakve situacije, zajedno sa korektivnim i preventivnim merama, zabeležiti u davaočev dosije kao neželjenu reakciju, dok ozbiljne neželjene reakcije treba prijaviti hemovigilanca sistemu na nacionalnom nivou.

Analizom neželjenih reakcija davalaca krvi dobija se uvid u to šta i u kojoj meri utiče na njihovu pojavu, te je moguće sprovesti aktivnosti da se one preduprede, ublaže i adekvatno zbrinu. Brigom za davaoce krvi/komponentata krvi se postiže njihova bezbednost, zadovoljstvo i želja da ponovo dođu, što istovremeno znači veći broj prikupljenih jedinica krvi/komponentata. Za realizaciju programa hemovigilance potrebno je podizanje svesti o ovoj problematici, iznošenje problema, poboljšanje prakse i formulisanje standarda u vezi sa kategorizacijom komplikacija, zbrinjavanjem i prijavljivanjem. Preduslovi za implementaciju hemovigilance su: razumevanje potrebe da se prate neželjene reakcije i neželjeni događaji u okruženju koje podstiče njihovo prijavljivanje, a pri tome ima kulturu neokrivljavanja.

Ključne reči: hemovigilanca, davaoci krvi i komponentata krvi, neželjene reakcije

Abstract

Haemovigilance denotes a series of organized procedures referring to blood/blood component donors and recipients, in accordance with 2002/98/EC Directives of the European Parliament and the Council of Europe. Becoming familiar with the latest Standards for blood/blood component donation defined by the Working Group of the European Haemovigilance Network (EHN) and the International Society of Blood Transfusion (ISBT) is the basis for creating national haemovigilance program that would enable systematic analysis of common complications related with blood/blood component donations in real time. It would rid us of dilemma such as what to report as unfavourable reactions, who is to report them, to whom and in what way. Surveillance over unfavourable reactions in blood/blood component donors includes: taking all measures to prevent them, providing immediate adequate medical assistance, detection of the cause, taking corrective and preventive measures, and finally

recording all such situations, including taken corrective and preventive measures into donors' files as unfavourable reactions, while serious unfavourable reactions should be reported to the nationally coordinated haemovigilance system.

Analysis of unfavourable blood donors' reactions enables insight into what and to what extent causes their occurrence, thus making it possible to carry activities to prevent them, to lessen them and to take care of them adequately. Blood/blood component donor care ensures donors' safety, satisfaction and willingness to return, which at the same time results in a higher number of collected blood/blood component units.

Implementation of the haemovigilance program requires raising awareness of this issue, presentation of the problem, improvement of practice and definition of standards in regard with the categorisation, taking care and reporting of those complications.

Prerequisites needed for the implementation of haemovigilance system are: understanding of the need to follow up unfavourable reactions and untoward events in surroundings which stimulate their occurrence, at the same time implying the culture of non incrimination.

Key words: haemovigilance, blood/blood component donors, unfavourable reactions

Hemovigilanca kod davalaca krvi i komponenata krvi

Hemovigilanca (HV) je deo sistema obezbeđenja kontrole kvaliteta u transfuziologiji. Ona označava niz uređenih procedura koje su u vezi sa komplikacijama koje se odnose na davaoca i primaoca krvi, a cilj joj je sistematski nadzor i poboljšanje svih karika u trans-fuziološkom lancu od davaoca krvi (DK) ili komponenata krvi (DKK) do bolesnika kome je krv/komponenta namenjena. Sledljivost, kao preduslov hemovigilance, daje mogućnost da se prati svaka jedinica krvi/komponente od davaoca do bolesnika i obrnuto.

Hemovigilanca predstavlja više organizovanih postupaka nadzora u vezi sa ozbiljnim neželjenim događajem ili reakcijom kod davalaca krvi/komponentata ili primalaca istih, kao i epidemiološko praćenje davalaca (DK/DKK) sa osnovnim ciljem da se prevenira ponovno javljanje neželjenih događaja (ND) i neželjenih reakcija (NR). Ozbiljan neželjeni događaj je svaki neželjeni događaj koji je u vezi sa: prikupljanjem,

testiranjem, preradom, čuvanjem, distribucijom i izdavanjem krvi/komponentata krvi, koji može da dovede do smrti ili životne ugroženosti, stanja nesposobnosti, nemoći, hospitalizacije ili njenog produžetka kod primaoca krvi/komponentata. Ozbiljna neželjena reakcija je neočekivana reakcija kod davaoca (DK/DKK) ili primaoca krvi/komponentata krvi, koja je u vezi sa davanjem krvi ili transfuzijom krvi/komponentata krvi, a koja je opasna po život, ugrožava život, onesposobljava ili dovodi do hospitalizacije ili njenog produžetka (1). Osnovna ideja HV je da se registruje kvantitativno i kvalitativno: šta se desilo i pod kojim uslovima, zašto se desilo, šta mora da se promeni kako bi se popravio kvalitet rada u svakodnevnoj praksi. Pri tome, u vezi sa notiranjem i prijavljivanjem ND ili NR neophodno je da se zna: šta se prijavljuje, ko, kome i kako se prijavljuje. Da bi se ovo realizovalo potrebno je podizanje svesti o ovoj problematici, iznošenje problema, poboljšanje prakse i formulisanje standarda u vezi sa kategorizacijom komplikacija, zbrinjavanjem i prijavljivanjem.

Nadzor nad neželjenim reakcijama kod davalaca krvi/komponentata

Definicija NR je vrlo široka te događaji koji treba da se notiraju nisu jasno definisani tj. nisu standardizovani, pa se u praksi različiti podaci o NR prikupljaju od strane različitih ustanova, institucija i zemalja te ih je teško porediti. Da bi se ovo prevazišlo, Radna grupa za Komplikacije u vezi sa davanjem krvi, Međunarodno udruženje transfuziologa (International Society of Blood Transfusion -ISBT) i Radna grupa za Evropsku/Internacionalnu hemovigilance mrežu (EHN/IHN), 2007. godine su dali: listu sa kategorijama NR grupisanih prema šiframa, listu sa opisom kategorija i definisanim stepenom njihove ozbiljnosti (težine), obrazac koji je pogodan za prikupljanje podataka preporučenih datim standardom kao i preporuke za njihovo prijavljivanje. Pri tome su za klasifikaciju NR i ND koristili termin „komplikacije u vezi sa davanjem krvi“(2). Komplikacije su klasifikovane u dve glavne kategorije: one sa predominantno lokalnim simptomima i one koje pripadaju opštim reakcijama (neposredne i odložene vazovagalne reakcije). Predviđena je mogućnost notiranja i ostalih komplikacija. Težina NR je gradirana na “teške” i one koje “nisu teške” na osnovu zahteva za tretmanom i ishoda, a na način koji korespondira sa ostalim sistemima koji imaju međunarodnu primenu (na primer, ISBT za stepenovanje neželjenih reakcija na transfuziju krvi, Evropska komisija za stepenovanje transfuzijskih reakcija, FDA za stepenovanje neželjenih reakcija na lekove). Povremeno se vrše određene izmene tako da do sada postoje sledeće verzije: EHN i ISBT Verzija 2007, 2008, 2014.

Verzija 2014. EHN i ISBT predviđa posebno prijavljivanje komplikacija kod davanja cele krvi i afereznog davanja komponenata krvi. U lokalne komplikacije ubrajaju: krv van krvnog suda (hematom, punkcija arterije, odloženo

krvarenje), bol u ruci (povreda/iritacija nerva, ostali bolovi u ruci), lokalizovana infekcija vene ili mekih tkiva (površinski tromboflebitis, celulitis), ostale velike povrede krvnih sudova (duboka venska tromboza, arteriovenska fistula, kompartment sindrom, pseudoaneurizma brahijalne arterije). U opšte komplikacije navode vazovagalna reakcija (VVR) sa povredom na mestu gde je obavljena venepunkcija i van tog mesta tj. po napuštanju ustanove. Potrebno je naznačiti da li je VVR sa gubitkom svesti ili bez gubitka svesti. Alergijske reakcije mogu biti lokalne i generalizovane. Komplikacije kod afereznog davanja su uz prethodne: reakcija na citrat, hemoliza, vazдушna embolija, infiltracija. Predviđeno je da se opisno navedu ostale ozbiljne komplikacije i ostalo što nije obuhvaćeno ovom klasifikacijom. U Institutu za transfuziju krvi Srbije (ITKS) se NR prate, evidentiraju i prikazuju u vidu izveštaja od 2007. godine, a od 1. 01. 2010. godine sve se izvodi prema preporučenoj klasifikaciji Radne grupe za Komplikacije u vezi sa davanjem krvi (EHN/IHN) Verzija 2008.

Preporuke Saveta Evrope i Evropskog parlamenta, u izdanju iz 2015. godine daju sledeću preporuku za klasifikaciju NR (3). U lokalne komplikacije se ubrajaju one koje se tiču krvnog suda, nerva i ostalih lokalnih komplikacija: krvni sud (hematom, punkcija arterije, tromboflebitis), nerv (direktna povreda nerva, povreda nerva hematomom), ostale komplikacije (povreda tetive, lokalna alergijska reakcija i infekcija). U opšte komplikacije spada VVR, neposredna i odložena. Retke značajne komplikacije čine: komplikacije u vezi sa krvnim sudom (pseudoaneurizma brahijalne arterije, arteriovenska fistula, kompartment sindrom), zadesne komplikacije (akcident ili povreda u vezi sa VVR i drugi oblici akcidenta), kardiovaskularne reakcije (angina pectoris, infarkt miokarda, cerebralna ishemija). Komplikacije u vezi sa afereznim davanjem komponenata

krvi su: citratna toksičnost, sistemska alergijska reakcija, anafilaksa, hemoliza, vazдушna embolija.

Neželjeni događaji se mogu ispoljiti i kod neadekvatne selekcije davalaca, npr. ako se dozvoli da daruje krv osoba koja ima nižu vrednost hemoglobina ili telesnu masu od dozvoljene. Kao ND se smatra i ako se u procesu davanja krvi uzme veća količina krvi od dozvoljene.

Sprovođenje programa HV za DK/DKK podrazumeva: postojanje jedinstvene liste NR u vezi sa davanjem krvi, analizu da li se poboljšava bezbednost davanja krvi uvođenjem mera za prevenciju ponovnog javljanja tih komplikacija, analizu da li se poboljšava bezbednost primene transfuzije u zavisnosti od selekcije DK (učestalosti i razloga odbijanja DK) i epidemiološko praćenje davalaca (sa potvrđenim pozitivnim testovima na markere TTI), dostupnost DK u slučaju pojave nove bolesti (npr. nova endemija „svinjskog gripa“) uz očuvanje bezbednosti kako DK tako i komponenata krvi, što brže pružiti adekvatnu stručnu medicinsku pomoć, utvrditi uzrok i sprovesti korektivnu i preventivnu meru, sve situacije, zajedno sa korektivnim i preventivnim merama zabeležiti u davaočev dosije kao NR, a ozbiljne NR prijaviti hemovigilance sistemu na nacionalnom nivou.

Prema osamnaestom izdanju Preporuka Saveta Evrope iz 2015. godine (3), nadzor nad neželjenim reakcijama kod DK podrazumeva: prevenciju NR, njihovo zbrinjavanje, informisanje davaoca o ponašanju posle NR i vođenje dokumentacije.

Prevencija NR

Za prevenciju NR je neophodno da DK budu informisani kroz edukativni materijal o svim važnim detaljima vezanim za proces davanja krvi: optimalnoj pripremi pre davanja krvi (naročito ako se krv daje prvi put), kriterijumima za selek-

ciju davalaca, mogućim komplikacijama vezanim za davanje krvi sa preporukama o ponašanju u tim situacijama i njihovom zbrinjavanju, kao i o značaju davanja postdonacijskih informacija koje mogu biti važne kako za samog DK, tako i za bezbednost donirane jedinice krvi.

Kao vrlo efikasnu meru za prevenciju najčešće NR - vazovagalne reakcije, posebno kod mladih, više autora preporučuje primenu metode predonacijske hidracije davalaca sa oko pola litre vode pre davanja krvi (4, 5). Iskustva u ITKS sa ovom metodom su u saglasnosti sa drugim autorima, jer je uočena manja učestalost VVR kod hidrirane grupe srednjoškolaca u odnosu na kontrolnu grupu kod oba pola. Nije uočena korelacija između VVR i količine date krvi (350ml ili 450ml), kao ni vrednosti krvnog pritiska (6).

Druga preporuka za prevenciju VVR je primena ponavljanih mišićnih kontrakcija ruku, jer doprinose boljem protoku krvi ka mozgu, čime se prevenira osećaj slabosti (7,8). Skretanje pažnje davaocu od same procedure davanja krvi razgovorom, gledanjem televizije ili slušanjem muzike, smanjuje stres i prevenira nelagodu. Pored pomenutih metoda, svakako je izuzetno važno da se kontinuirano sprovede sve mere koje treba da dovedu do zadovoljstva davalaca. To se postiže prvenstveno ljubaznim dočekom, što kraćim čekanjem na davanje krvi, zadovoljstvom zbog provere zdravstvenog stanja i objašnjenjem razloga za odbijanje (ako postoji), izrečenom zahvalnošću za darovanu krv i uvažavanjem davaoca čineći da se oseća što lepše i prijatnije, podstičući mu želju da ponovo dođe. Njihov ponovni dolazak znači regrutovanje i zadržavanje redovnih, višestrukih davalaca, što ima veliki uticaj na pravovremeno obezbeđivanje dovoljnih jedinica bezbedne krvi kao prioritarnog zadatka službe za transfuziju svake zemlje (9,10,11). Posebno je važno pružiti emotivnu podršku

naročito onima kojima je to prvo davanje krvi/komponentata (12).

Neprijatnost vezana za davanje krvi je često razlog za odustajanje od narednog dolaska (13,14). France i saradnici su uočili da su se za 20% ređe vraćali davaoci posle doživljene VVR ako se ona javila pri prvom davanju krvi, a za 33% ako se javila pri kasnijim davanjima krvi, tj. kod višestrukih davalaca (15). Istraživanja u našoj ustanovi su pokazala da je duži vremenski period bio potreban da bi se vratili davaoci mlađe životne dobi i ženskog pola koji su VVR imali pri prvom davanju, u odnosu na višestruke davaoce (16).

Analiza komplikacija vezanih za davanje krvi je neophodna da bi se utvrdilo šta i u kojoj meri utiče na njihovu pojavu, kao i da bi se preduzele mere kako bi se one prevenirale, ublažile i adekvatno zbrinule (17). Više autora se slaže sa činjenicom da su DK mlađe životne dobi najosetljivija kategorija davalaca, kod kojih se NR-e javljaju češće nego kod drugih. Eder je pokazao da je učestalost NR kod 18 i 19-godišnjaka 8,3%, dok je u grupi DK sa više od 20 godina bila 2,8% (18). Wiltbank i Kamel su uočili da se VVR češće javljala kod mladih sa ukupnim cirkulatornim volumenom krvi manjim od 3500ml (19,20). Naša istraživanja su pokazala da je za pojavu NR najosetljivija grupa DK od 18 do 20 godina koji daju krv prvi put, sa telesnom masom do 55 kg (17). Newman, takođe, nalazi da srednjoškolci pri prvom davanju krvi imaju visoku učestalost VVR, čak i do 10%, dok se u opštoj populaciji ona javlja od 2-5% (21). Podaci o učestalosti komplikacija vezanih za davanje krvi se dosta razlikuju: od 1% (22), 2-5% (21), 3,5% (u grupi od šest miliona ispitivanih donacija u toku 2006 godine) (23,24). U našoj ustanovi je u toku 2008. godine od 59126 donacija bilo ukupno 1125 (1,9%) NR (17).

Više godina unazad u ITKS se sprovodi anketa zadovoljstva davalaca, kako bi se na osnovu dobijenih pokazatel-

ja vršile korekcije i postizali što bolji rezultati na tom polju (25,26). Zadovoljstvo davalaca uz adekvatnu informisanost je neophodan preduslov da postanu redovni davaoci (27,28).

Zbrinjavanje NR

Adekvatno zbrinjavanje komplikacija vezanih za davanje krvi je neophodan postupak u očuvanju zdravlja davalaca i treba da ga vrši osoblje koje je osposobljeno da prepozna rane znake NR, i koje je obučeno da reaguje brzo i stručno, prema detaljno pripremljenim standardnim operativnim procedurama (SOP) koristeći adekvatnu opremu. SOP-e, osim opisa prepoznavanja i zbrinjavanja NR, treba da sadrže i definisane odgovornosti zaposlenih. U ITKS, SOP-e se primenjuju od 2007. godine. Preporučuje se češće obnavljanje i osvežavanje znanja i veština zaposlenih obavljanjem edukacija i instrukcija kroz vidove kontinuirane edukacije.

Osoblje mora da opservira DK do njegovog potpunog oporavka u posebno obezbeđenom prostoru za zbrinjavanje NR, a u slučaju ozbiljnog neželjenog događaja i da ostane u kontaktu sa davao-cem dok se ne oporavi.

Informisanje DK sa neželjenim reakcijama

Kada se desi NR, obavezno je da se DK informiše o prirodi te komplikacije, načinu lečenja i očekivanom ishodu. Pored usmene informacije, idealno je da postoji i pisani materijal, u obliku flajera-brošura, koji DK mogu da ponesu sa sobom. U ITKS postoji edukativni materijal „Vodič za davaoce“, koji sadrži pisane informacije o proceduri davanja krvi, sa opisom najčešćih mogućih komplikacija vezanih za davanje krvi i ishodom i načinom njihovog zbrinjavanja.

Neophodno je da osoblje informiše DK o postdonacijskom ponašanju, pose-

бно, u slučaju pojave VVR, da skrene pažnju davaocu da ne upravlja vozilom i da se ne izlaže opasnim aktivnostima (hobi, zanimanje) zbog mogućeg rizika od pojave odložene nesvestice. Tim davaocima treba staviti do znanja da mogu da kontaktiraju lekara u bilo koje doba. Preporučuje se i da lekar pozove DK tokom narednih 24 časa, zbog interesovanja za njegovo zdravstveno stanje i zbog lepog gesta koji doprinosi da davalac stekne dodatno poverenje u transfuziošku službu (3).

Dokumentacija

Direktive Evropskog Parlamenta 2005/61/EC obavezuju na prijavljivanje svih teških (ozbiljnih) neželjenih reakcija i događaja (29).

Prema Zakonu o transfuziološkoj delatnosti koji je stupio na snagu 1. januara 2010. godine, u članu 30, stoji da će Registar o neželjenim događajima i neželjenim reakcijama iz člana 29. voditi Zavod, odnosno Institut za transfuziju krvi, osnovan za teritoriju Republike Srbije (30). Suština formiranja Registra o ND i NR kroz sprovođenje HV programa je podizanje svesti o ovoj problematici, iznošenje problema, poboljšanje prakse, formulisane standarde od kategorizacije NR, zbrinjavanja do prijavljivanja, kroz kontinuiranu edukaciju. Da bi se formirao pomenuti registar, potrebno je da se prijava ND i NR, pre svega na nacionalnom nivou, obavlja na istovetan način. To podrazumeva da lekar koji pregleda DK evidentira sve NR, a prijavljuje na predviđenom obrascu samo teške NR, pri čemu se služi prihvaćenim standardom za kategorizaciju NR. Svaka transfuziološka služba šalje zbirni izveštaj o NR i prijave teških NR u elektronskoj formi, ili poštom, u ITKS gde se one objedinuju. Ovo podrazumeva da se koriste isti, jednobrazni, formulari, ista obuka među svim učesnicima opredeljenim za ove aktivnosti, isti način interpretacije za dati incident,

kao i zajedničke definicije za različite tipove NR i ND. Tek kada se postigne standardizacija izveštavanja i sakupljanje tih podataka na jednom mestu, može se postići formiranje nacionalne hemovigilans mreže, tj. realizacija formiranja hemovigilanca programa.

Ukratko, nadzor nad neželjenim reakcijama kod DK i DKK znači: učiniti sve da do njih ne dođe, što brže pružiti adekvatnu medicinsku pomoć, utvrditi uzrok i sprovesti korektivnu i preventivnu meru, a sve ovakve situacije, zajedno sa korektivnim i preventivnim merama, zabeležiti u davaočev dosije kao neželjenu reakciju, dok ozbiljne neželjene reakcije treba prijaviti hemovigilanca sistemu na nacionalnom nivou.

Zaključak

Primena jedinstvenih, istovetnih, Standarda za klasifikaciju komplikacija u vezi sa davanjem krvi/komponenta krvi, praćenje i prijavljivanje u svim transfuziološkim službama koje se bave prikupljanjem krvi/komponenta krvi, je uvod u formiranje Nacionalnog hemovigilance programa za davaoce, u kom bi se sistematski vršila analiza uobičajenih komplikacija vremenski povezanih sa davanjem krvi/komponenta. Ovom analizom dobija se uvid u to šta i u kojoj meri utiče na pojavu pomenutih komplikacija i iznalaze se mogućnosti da se one preduprede, ublaže i adekvatno zbrinu. Brigom za davaoce krvi/komponenta krvi povećava se njihova bezbednost, zadovoljstvo i želja da ponovo dođu, što znači i veći broj prikupljenih jedinica krvi.

Preduslovi za hemovigilancu su: razumevanje potrebe da se prate NR i ND u okruženju koje podstiče njihovo prijavljivanje, a pri tome ima kulturu neokrivljavanja.

Literatura

1. Directive 2002/98/EC of the European Parliament and of the Council of 27 January 2003 setting standards of quality and safety for the collection, testing, processing, storage and distribution of human blood and blood components and amending Directive 2001/83/EC. Official Journal of the European Union, L33, 8/02/2003, p.30
2. Working Group on Complications related to Blood Donation, International Society of Blood Transfusion Working Party on Haemovigilance and European Haemovigilance Network (2008). Standard for Surveillance of Complications Related to Blood Donation. Retrieved March 18 2010 from <http://www.isbt-web.org/documentation/default.asp>
3. Guide to the preparation, use and quality assurance of blood components, 18th edition, Recommendation No.R(95)15, Published by European Directorate for the Quality of Medicine HealthCare of the Council of Europe (EDQM), European Committee (Partial Agreement) on Blood Transfusion (CD-P-TS)Ed:Council of Europe, 67075 Strasbourg cedex, France-2015
4. Hanson SA & France CR Predonation water ingestion attenuates negative reactions to blood donation. Transfusion, 2004: 44(6), 924-928
5. Newman B, Tommolino E, Andreozzi C, Joychan S, Pocedic J & Heringhausen J The effect of a 473 ml (16 oz) water drink on vasovagal donor reaction rates in high-school students. Transfusion, 2007: 47(8), 1524-1533
6. Dinić R, Vavić N, Drašković S, Negovanović M, Bulajić M, Miletić G, Radović I, Saračević M, Dmitrović J, Pelević I. Predonation fluid ingestion reduce side effects in high school blood donors. III Congres of Macedonian society of transfusion medicine, Ohrid 10-14 jun, 2009, Books of Abstracts Maked.Med.Pregled 63(supl.75):str 65
7. Ditto B, France CR, Lavoie P et al. Reducing reactions to blood donation with applied muscle tension: a randomized controlled trial. Transfusion, 2003: 43, 1269-1275
8. Ditto B, France CR, Albert M & Byrne N. Dismantling applied tension, mechanisms of a treatment to reduce blood donation-related symptoms. Transfusion, 2007: 47(12), 2217-2222
9. Benjamin R.J. Donor hemovigilance:safety as the first priority of blood donor management, ISBT Science Series, 2010: 5(1), 206-211
10. Vavić N: Stalni zadatak službe za transfuziju- dovoljno jedinica bezbedne krvi koje čekaju bolesnike. (Plenarno predavanje),Treći kongres transfuziologa Srbije i Crne Gore sa međunarodnim učešćem, Beograd 8-11.11.2006., Bilten za transfuziologiju, 2006:52 (2-3), 27-31
11. Vavić N, Milutinović MS, Mirčetić MD, Čosović CV, Istatkov IJ, Jeremić JI, Dinić DR, Drašković DS. Losses of the supply of donated blood due to donor deferral, miscollection and lapsed donors. XVIIth Regional Congress of the ISBT, Europe, June 23-27, 2007, Madrid, Spain. Vox Sanguinis, The International Journal of Transfusion Medicine, 2007:93(1),Abstr. 071, str 78
12. Pagliariccio A, Vavić N, Bulajić M, Marinozzi M. Emotional support to apheresis donors: Effect and implication. Transfus Apher Sci. 2013;48(3):365-70
13. France CR, France JL, Roussos M & Ditto B. Mild reactions to blood donations predict a decreased likelihood of donor return. Transfusion and Apheresis Science, 2004: 30(1), 17-22
14. Newman BH, Newman DT, Ahmad R & Roth AJ. The effect of whole-blood donor adverse events on donor return rates. Transfusion, 2006: 46(8), 1374-1379

15. France CR, Rader A & Carlson B. Donors who react may not come back: analysis of repeat donation as a function of phlebotomist ratings of vasovagal reactions. *Transfusion and Apheresis Science*, 2005: 33(2), 99-106
16. Milutinović S, Vavić N, Mirčetić D, Mladenović N, Mitrović S, Dinić R. Uticaj vazovagalne reakcije na motivaciju i ponovni odziv dobrovoljnih davalaca krvi. *Bilten za transfuziologiju* 2006:52(2-3):Abstr.112, str 146
17. Vavić N, Drašković S, Bulajić M, Milutinović S, Dinić R, Dmitrović J. Factors affecting adverse reactions in blood donors and their effect on decision to donate blood again. XXXIst International Congress of the ISBT, Berlin, Germany, 26 June -1 July 2010. *Vox Sanguinis, The International Journal of Transfusion Medicine*, 2010: 99(1):Abstr. P-0247, str 182
18. Eder AH, Hillyer CD, By BA, Notari EP & Benjamin RJ. Adverse reactions to allogeneic whole blood donation by 16- and 17-year-olds. *JAMA*, 2008: 299(19), 2279-2286
19. Wiltbank TB, Giordano GF, Kamel H, Tomasulo P & Custer B. Faint and prefaint reactions in whole-blood donors: an analysis of predonation measurements and their predictive value. *Transfusion*, 2008: 48(9), 1799-1808
20. Kamel H, Tomasulo P, Bravo M, Wiltbank T, Cusick R, James RC & Custer B Delayed adverse reactions to blood donation. *Transfusion*, 2010: 50(3), 556-565
21. Newman BH. Vasovagal reactions in high school students: findings relative to race, risk factor synergism, female sex, and non-high school participants. *Transfusion*, 2002: 42, 1557-1566.
22. Jorgensen J & Sorensen BS. Donor vigilance. *ISBT Science Series*, 2008: 3(1), 48-52
23. Eder AF, Dy BA, Kennedy JM et al. The American Red Cross donor hemovigilance program: complications of blood donation reported in 2006. *Transfusion*, 2008: 48(9), 1809-1819
24. Christopher R. France, Jay E. Menitove. Mitigating adverse reactions in youthful donors. *Transfusion*, 2008: 48(9), 1774-1776
25. Vidanović D, Stefanović L, Vavić N, Milošević D. Merenje zadovoljstva davalaca krvi Instituta za transfuziju krvi Srbije. *Bilten za transfuziologiju*, 2006:52(2-3):Abstr.117, str 149
26. Đukić Novaković M, Vavić N, Vidanović D, Drašković S, Stefanović L, Govedarica P. Investigation of the first time voluntary blood donors satisfaction-experience of the Blood transfusion Institute of Serbia. XIXth Regional Congress of the International Society of Blood Transfusion-Eastern Mediterranean and Europe, Cairo, Egypt, 21-25 March 2009, *Vox Sanguinis, The International Journal of Transfusion Medicine*, 2009; Vol 96, Supplement 1: Abstr. 163, str 131
27. Vavić N, Pagliariccio A, Bulajić M, Marinozzi M, Miletić G, Vlatković A. Blood donor satisfaction and the weak link in the chain of donation process. *Transfus Apher Sci.* 2012;47(2):171-77
28. Nguyen DD, Devita DA, Hirschler NV, Murphy EI. Blood donor satisfaction and intention of future donation. *Transfusion* 2008;48(4):742-8.
29. Commission Directive 2005/61/EC of 30 September 2005 implementing Directive 2002/98/EC of the European Parliament and of the Council as regards traceability requirements and notification of serious adverse reactions and events. *Official Journal of the European Union*, L256, 1/10/2005, p.32
30. Zakon o transfuziološkoj delatnosti. Službeni glasnik RS br 72/2009

MOTO NAPISANOG I OBJAVLJENOG RADA: ISTINA, ISTINA I SAMO ISTINA**Sladana Andelić, Goran Čolaković**

Gradski zavod za hitnu medicinsku pomoć Beograd

Sažetak

Masovnija pojava javnog iznošenja slučajeva kršenja standardnih normi u nauci je novijeg datuma. Težina etičkog, moralnog i zakonskog prekršaja raste od ne namerne greške, preko sive zone (zone nepoštenja) pa sve do najtežeg oblika tj. do namerne greške. Pojava ma i jednog takvog slučaja dovoljna je da izazove moralno zgražavanje i osudu, pre svega naučne javnosti. Zakonske i etičke sankcije usled intelektualnog nepoštenja definisane su: Krivičnim zakonom Republike Srbije, Zakonom o autorskim pravima ili intelektualnoj svojini, i Zakonom o komorama zdravstvenih radnika. Cilj ovog rada je da skrene pažnju i još jednom podseti autore koji se bave naučno-istraživačkim radom da je osnovni moto svakog napisanog i objavljenog rada: istina, istina i samo istina.

Ključne reči: intelektualno nepoštemje, naučno delo, moto napisanog rada**Abstract**

Mass occurrence of publically revealed cases on breaking standard norms and standards in science is of a newer date. Heaviness of ethical, moral and legal transgression is rising from a non-deliberate mistake, over a grey zone (zone of dishonesty) up to the heaviest form, i.e. a deliberate mistake. The occurrence of even one such case is enough to provoke moral revulsion and condemnation, above all of the scientific public. Legal and ethical sanctions due to intellectual dishonesty are defined: Judiciary Law of the Republic of Serbia, Law on the author's rights or intellectual property and the Law on Medical Chambers. The aim of this article is to draw attention and once again to remind authors involved in scientific research and investigation that the basic motto of each written and published paper is: truth, truth and only truth.

Keywords: intellectual dishonesty, scientific research, written article motto**Uvod**

Kršenje prihvaćenih normi ponašanja u istraživanju bez obzira na vrstu, frekvenciju i težinu ispoljavanja, nerazdvojni je deo i pratilac samog istraživanja (1). Akademik prof. dr Ljiljana Vučković Dekić navodi da su prevare u publikovanju, razorni karcinom koji preti da uništi zdravu kariku između nauke i javnosti (2). Ohrabrujući podatak je da uprkos enor-mnom povećanju broja naučnih radova, nema podataka da je danas veći broj gre-šaka. Međutim, pojava ma i jednog takvog slučaja dovoljna je da

izazove moralno zgražanje i osudu naučne javnosti (3).

U savremenoj literaturi se sreću brojne definicije intelektualnog nepoštenja u nauci, sa varijacijama koje se uglavnom odnose na detalje vezane za fazu naučno-istraživačkog postupka u kojoj se javljaju. Danski komitet za nauku u svoju definiciju intelektualnog nepoštenja u nauci uključuje: "sve namerne nepoštene radnje u bilo kojoj fazi naučno-istraživačkog procesa (aplikacija-istraživanje-publikovanje), kao i sve ekstremne

slučajeve nemara koji dovode u pitanje profesionalno poštenje“ (2). Osnovni napisi o tome javljaju se 1984. te se ta godina smatra istraživačkim frontom o toj temi. U revijalnom radu o prevarama i drugim oblicima intelektualnog nepoštenja u nauci objavljenom 1987. god., Eugene Garfield, koristi izraze “greške u nauci“, “etički problemi u nauci“, “intelektualno nepoštenje“, “devijantno ponašanje u nauci“ i “podvale u nauci“ (4).

Kršenje etičkih standarda u nauci

U odnosu na prihvaćene naučne standarde i kanone etike, Stewart i Feder (5) prave razliku između nenamernih omaški (**greške**), i namernih, mnogo ozbiljnijih devijacija (**podvale i prevare**). Kršenje etičkih standarda u nauci (3) prikazano je u **figuri 1**. Težina prekršaja raste s leva na desno.

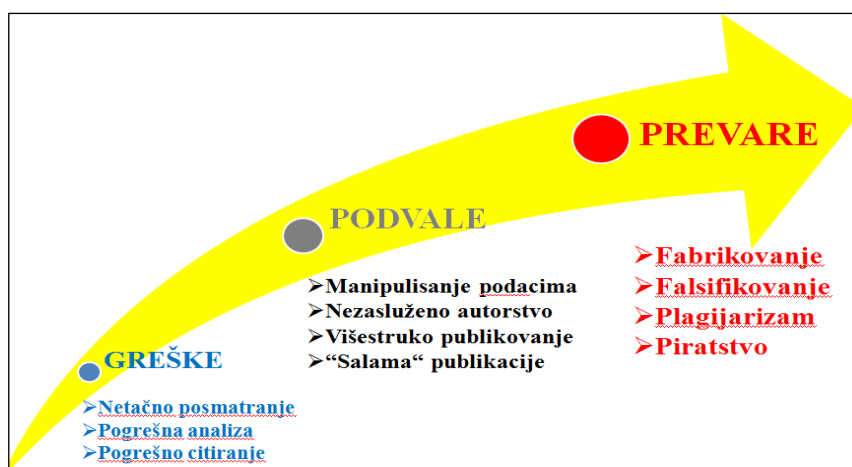


Figura 1. Kršenje etičkih standarda u nauci

Ono što značajno razlikuje greške od podvale i prevare je postojanje namere.

GREŠKE

Obične ili poštene greške (honest errors) ili greške u najboljoj nameri, najčešće nastaju usled nepažnje ili žurbe. Greške su nenamerne, nesvesne, poštene. Sastavni su deo naučnog istraživanja i ni jedan naučnik, uz najveće napore, ne može biti siguran da ih neće napraviti (3). U vezi su sa pisanjem brojeva i njihovim neslaganjem, greškama u izvođenju istraživanja, nereprezentativnom uzorku, interpretaciji i zaključivanju. Čak i najeminentniji naučnici mogu da pogreše. Naučnik koji nakon što uoči grešku, otvoreno je prizna i objavi ispravku prethodno objavljenog članka u istom časopisu u kojem je članak publikovan, neće biti ismejan od kolega. U tom slučaju

reč je o slučajnim ili "poštenim" greškama, odnosno o greškama koje nisu plod namere da se one naprave. Greške koje nastaju ciljano ili zbog nemara su znatno ozbiljnije. Nepažnja i nemarnost proizvode članak koji ne zadovoljava naučne standard (6).

PODVALE

Spadaju u tzv. „grey“ zonu i odnose se na manipulisanje podacima, nazasluženo (lažno) autorstvo, višestruke publikacije i salama publikacija.

Manipulisanje podacima. Spada u ozbiljnije greške u nauci i odnosi se na: uklanjanje podataka koji ne odgovaraju autori (neobjavljivanje negativnih rezultata), podešavanje (friziranje) podataka, selektivno prikazivanje rezultata, nenaovođenje izvora iz kog je preuzet material,

nekorektno citiranje i nepravilno navođenje literature.

Nezasluženo (lažno) autorstvo. Nepropisno pripisivanje autorstva osobi koja nije kreativno doprinela nastanku naučnog dela je danas veoma učestala pojava (7,8). Uzrok ove vrste kršenja etičkih normi nauke leži u činjenici da je autorstvo glavna valuta (2) za napredovanje u karijeri, pri čemu je od najvećeg značaja broj naučnih publikacija. Ova činjenica se može smatrati razlogom da ponekad i časne i poštene osobe u borbi za sticanjem ili obnavljanjem postojećeg naučnog zvanja, ponekad podlegnu iskušenju da autorstvo steknu neopravdano (8).

Nekoliko je oblika lažnog autorstva (9):

- *počasno autorstvo* - pojava da se u listu autora uvrste rukovodioci (šefovi, načelnici, direktori) ili naučni autoriteti (tzv. halo-efekat) koji su malo, ali uglavnom nimalo doprineli nastanku naučne publikacije. Ne retko, počasni autor sasvim slučajno, tek po objavljivanju članka, saznaje da je koautor;
- *poklonjeno autorstvo* - pripisivanje autorstva osobi od koje se očekuje recipročna usluga iste ili neke druge vrste (princip *ja tebi – ti meni*) (10);
- *oteto autorstvo* - brisanje sa liste autora osobe koja je bitno doprinela radu;
- *fantomsko autorstvo* - osoba koja ima pravo na autorstvo ne želi da ga koristi, ali predlaže drugu osobu kao koautora umesto njega;
- *odrečeno autorstvo* - osoba koja ima pravo na autorstvo neće da prihvati dužnosti autora, a istovremeno ne dozvoljava ostalim koautorima da samostalno publikuju članak.
- *ghost author* – farmaceutska kompanija angažuje renomiranog naučnika da napiše rad zasnovan na rezultatima koje su dobili istraživači kompanije.

U slučajevima dokazanih prevara, iskrslu su mnogobrojni problemi za koautore koji su prihvatili poklonjeno autorstvo. Pre

poruka je da se naučnici uzdrže i od poklanjanja i od primanja nezasluženog autorstva jer se *ne može prihvatiti priznanje, a odricati odgovornost za ukupni sadržaj naučnog dela* (10). Broj koautora je drastično povećan u odnosu na nekoliko decenija ranije, što je rezultat, s jedne strane tinskog rada, a s druge strane, istraživanja danas uključuju korišćenje niza metoda, pri čemu se kao koautori pojavljuju svi oni koji te metode sprovode.

U okviru međunarodnih predloga za samoregulativu u nauci [9], formulisale su dve preporuke koje se odnose na autorstvo: "Autori naučnih publikacija su uvek zajednički odgovorni za njihov sadržaj. Tzv. "počasno autorstvo" je neprihvatljivo" (Preporuka br. 11). Glavna preventivna mera intelektualnog nepoštenja je samoobuzdavanje. U jednom istraživanju, autori su pripisivali autorstvo samo osobama koje ispunjavaju uslove za to (12), time pokazujući svoju visoku etičnost.

Višestruko publikovanje. Označava objavljivanje istog naučnog rada ili istih podataka, dva ili više puta. Ove publikacije se dele na **paralelne** (dvojezične) i **ponovljene** kada se pojavljuju na istom jeziku. Prema International Committee of Medical Journal Editors (ICMJE) (11), paralelne publikacije su dozvoljene ako su ispunjeni sledeći uslovi: da su urednici oba časopisa potpuno obavešteni, da interval između primarne i sekundarne publikacije iznosi bar dve nedelje, da se to naznači u sekundarnoj publikaciji i sl. Ponorljeno objavljivanje istog ili sličnog sadržaja istraživanja u različitim časopisima na istom jeziku (**samoplagiranje**) nije dopušteno. Originalno naučno delo je originalno samo kada **prvi put postane** dostupno naučnoj javnosti.

U višestruko publikovanje spada i "**salamapublikacije**" koja nastaje rasparčavanjem jednog naučnog dela (magistarske ili doktorske teze) u seriju minornih napisa. Posledica su težnje za prestižom u broju publikovanih naslova („publish or

perish“ – objavi ili nestani), pri čemu se značajno gubi na kvalitetu rada. Zbog toga fakulteti kao i institucije koje odobravaju stipendije ili angažovanje istraživača su promenile svoju politiku i sada od kandidata traže odabranu listu publikacija koje će dalje biti razmatrane. Time se od autora insistira da izdvoje članke u kojima su problemi kompletno proučavani ili objavljeni u indeksiranim inostranim časopisima koji imaju rigorozne uslove za objavljivanje radova.

PREVARE

Najozbiljnije su greške u nauci i predstavljaju namerno i lažno prikazivanje podataka u koje će drugi verovati da su istiniti. Može se reći da se radi o najekstremnijem obliku intelektualnog nepoštenja i kršenja kako metodoloških tako i moralnih normi u nauci. U ovu grupu spadaju:

- ▣ **Fabrikovanje** (izmišljanje podataka ili rezultata)
- ▣ **Falsifikovanje** (manipulacija materijalom, opremom ili procesom istraživanja, ili izmena ili izbacivanje podataka ili rezultata tako da istraživanje nije tačno prikazano u dokumentaciji)
- ▣ **Piratstvo** – najobičnija krađa podataka, celih tabela, delova teksta i drugih intelektualnih dobara. Suptilniji oblik piratstva je krađa ideja, hipoteza i zaključaka, pri čemu se ne dira ni u tekst niti u tabele (3).
- ▣ **Plagijarizam** - nedopustivo prisvajanje tuđe intelektualne svojine (Vujaklija), korišćenje tuđeg rada bez odgovarajućeg priznanja (3) ili pozajmica ma koje vrste i obima iz nekog izvora prelazeći preko njega ćutke (13).
- ▣ **tzv. mozaički plagijat** - kada se uzimaju segmenti iz više tuđih dela (i parafraziraju) i formiraju u jednu novu celinu, ali bez navođenja izvornih autora.

U nauci je plagiranje opravdano jedino u slučaju kada naučnik uspe da, umesto prošlih, "plagira" (auticipira) buduća otkrića i saznanja (3).

Trijada FFP (fabrikovanje, falsifikovanje, plagijatorstvo) se smatra smrtnim grehom (2).

UZROCI INTELEKTUALNOG NEPOŠTENJA

Uzroci intelektualnog nepoštenja u nauci su sledeći:

- lični motiv - prvenstvo otkrića, što može navesti autora na prerano objavljivanje još neproverenih rezultata a samim tim i povrede načela dobre kliničke prakse;
- "publish or perish" sindrom (publikuj ili nestani) – posledica „pritiska“ na istraživače ka
- objavljivanju što većeg broja radova (zadržavanje radnog mesta, naučnog zvanja);
- odbojnost prema negativnim rezultatima;
- nekritičnost, neznanje i nekompetentnost;
- lična korist (karijera, bolja pozicija, novac).

POZNATE AFERE

Schön story predstavlja jednu od najvećih afera u fizici materijala, koja je pobudila veliko interesovanje ne samo među fizičarima. Jan Hendrik Schön sa saradnicima je u poslednje tri godine (1998.-2001.) pre otkrivanja afere (jun 2002.) publikovao preko 90 članaka u vrlo renomiranim časopisima od kojih čak 17 u Science i Nature za samo dve ipo godine. Na bazi tih rezultata aktivirano je preko 100 projekata u svetu na kojima je radilo više od 300 doktoranata i postdoktoranata. Zbog "spektakularnog" otkrića hladne fuzije, Schön je smatran najozbiljnijim kandidatom za Nobelovu nagradu za

fiziku. U Max-Planck Institutu za čvrsto stanje u Štuttgartu su mu obezbedili mesto direktora odeljenja i obezbedili sredstva za razvoj laboratorije.

Međutim, ni jedna laboratorija u svetu nije mogla da ponovi rezultate Schön-ove grupe. A onda su L. Sohn sa Univerziteta u Prinstonu i P. McEuen sa Cornell univerziteta vrlo detaljno analizirali rezultate publikovane u časopisima Nature i Science i ustanovili da se, u tri rada koji nisu međusobno u vezi (14-16), potpuno poklapaju. Formirana je petočlana komisija koja je krajem septembra 2002. godine podnela izveštaj na 127 strana. Analizirana su 24 rada Schön-a i saradnika i nedvosmisleno je utvrđeno da se radi o manipulaciji eksperimentalnim podacima u 16 od njih. Za preostalih 8 nisu bili potpuno sigurni. Komisija je manipulacije eksperimentalnim podacima razvrstala u tri kategorije (6):

1. Dodavanje i zamena rezultata (zamenjena celih slika, pojedinačnih krivih i delova spektara, itd.).
2. Nerealna preciznost (preciznost iznad očekivane u realnom eksperimentu).
3. Rezultati u suprotnosti sa postojećom fizikom (osobine koje nisu u saglasnosti sa parametrima koji su važeći za određene naprave ili pojave, što sugerise na netačnu prezentaciju podataka.).

Ishod ove afere: Schön je otpušten i oduzeto mu je naučno zvanje.

Osim navedenog, mnogo je drugih primera prevare i podvale, najtežih ogrešenja naučnika o osnovne etičke principe nauke, široko publikovanih i diskutovanih slučajeva koji su naneli velike štete nauci. Međutim, da sve nije uvek tako crno u nauci, prikazujemo aferu **Frances Collins-a**, šefa Nacionalnog centra za izučavanje humanog genoma, kao primer ispravnog reagovanja naučnika koji je bez svoje krivice upleten u pokušaj naučne prevare. On je sa svojim studentom, podneo rukopis rada o leukemiji jednom časopisu. Re

centent je osporio nalaze i sugerisao da je reč o prevari. Dr Kolins je lično proverio protokol i histološke preparate i utvrdio falsifikate i u ovom i u drugim, ranije publikovanim radovima u kojima je isti student bio koautor. Student je priznao prevaru a dr Kolins povukao ovaj rukopis i još šest ranijih publikacija. Poslao je više od stotinu pisama naučnicima iz iste oblasti u kojima je objasnio slučaj i preduzete mere, što mu je donelo priznanje kolega i naučne javnosti (17). Njegov postupak ilustruje kako se prevara može najlakše sprečiti, otkriti i otkloniti u neposrednoj okolini istraživača.

OGREŠENJA NAUČNE JAVNOSTI PREMA NAUČNICIMA

Međutim, ne ogrešuju se samo naučnici o nauku, već i naučna javnost o pojedinim naučnicima (18). Jedan od primera je i slučaj **Lawrence Craven-a**, porodičnog lekara iz SAD, koji je 1950.-e zapazio da su deca koja dobijaju aspirin posle tonzilektomije sklona produženim krvavljenjima. Sa pretpostavkom da aspirin sprečava koagulaciju krvi, on je svojim bolesnicima koji su preležali infarkt miokarda, davao aspirin, čime je rizik od ponovnog infarkta sveden, praktično na nulu. Rukopis koji je podnosio renomiranim medicinskim časopisima je redovno odbijan, te je objavljen u lokalnom časopisu. Sledi tridesetogodišnje ignorisanje njegovog rezultata. Godine 1971. godine Sir John Wane dobija Nobelovu nagradu za otkriće da aspirin blokira dejstvo faktora koagulacije. Naučna zajednica se setila tada već davno umrlog dr Krejvena (19).

KAZNE NE MERE

Princip *publish or perish* je etički problem koji podleže **Zakonu o komorama zdravstvenih radnika** (20). Ovaj Zakon predviđa disciplinsku odgovornost članova komore, regulisanu članovima 39. i 40.

po kojima član komore disciplinski odgovara pred Sudom časti ako činjenjem ili nečinjenjem izvrši povredu profesionalne dužnosti ili ugleda člana komore; ili povredi etički kodeks. Takođe podleže i članu 43. istog Zakona koji predviđa disciplinske mere u vidu: 1) javne opomene, 2) novčane kazne ili 3. privremene zabrane samostalnog rada – **oduzimanja licence**.

S druge strane falsifikovanje je laž a plagijatorstvo krađa i podležu zakonskim sankcijama. Zakonsku regulativu za ove vrste intelektualnog nepoštenja čine **Zakon o autorskim i srodnim pravima** (21) i **Krivični zakon RS** (22), sa svojim članovima 198. (Povreda moralnih prava autora. Sankcije: novčana kazna ili kazna zatvorom od šest meseca do tri godine.) i 199. (Neovlašćeno iskorišćavanje autorskog dela. Sankcije: novčana kazna ili kazna zatvorom od tri meseca do pet godina.).

Zakon o naučnoistraživačkoj delatnosti RS (23) daje instrukcije da naučnoistraživački rad treba da vodi otkrivanju novih znanja. Za kršenje ovog zakona predviđena sankcija je oduzimanje naučnog zvanja, isključenje iz naučne ustanove...

Krivična odgovornost za krivično delo prevare (čl. 208. KZ) ukoliko se dokaže da je lice putem plagijata ostvarilo protivpravnu imovinsku korist (npr. napredovanje na poslu, povećanje plate sticanjem višeg akademskog zvanja i sl.), predviđa novčanu kaznu ili kaznu zatvora do 3 godine

Najdugotrajnije i sve masovnije su **građansko-pravne sankcije** (privatna tužba).

Zaključak

U zaključku navodimo citat Joshua Lederberg-a: "Iznad svega, čin publikovanja je izjava pod zakletvom, svedočenje" (24). Na savesti svakog istraživača je da li će da pripremi i objavi naučno delo u skladu sa

etičkim, moralnim i zakonskim principima. Najbolji moto svakog napisanog i objavljenog rada je istina, samo istina i ništa drugo osim istine.

LITERATURA

1. Lock S. Scientific misconduct. British medical journal. 1988; 297:1531-35.
2. Vučković-Dekić Lj, Milenković P, Šobić V. Etika naučnoistraživačkog rada u biomedicini. Srpsko lekarsko društvo: Akademija medicinskih nauka: Medicinski fakultet Univerziteta u Beogradu; 2002.
3. Savić J. Kako napisati i objaviti naučno delo u biomedicini. Beograd: Kultura, 1996.
4. Garfield E. What do we know about fraud and other forms of intellectual dishonesty in science? Part I: The spectrum of deviant behavior in science. Current comments. 1987; 14: 3-7.
5. Stewart WW, Feder N. The integrity of the scientific literature. Nature. 1987; 325: 207-14.
6. Popović Z. Kako napisati i objaviti naučno delo. Beograd: Akademska misao : Institut za fiziku, 2004.
7. Anderson PA. Boden SD. Ethical considerations of authorship. SAS Journal 2008;2:155–58.
8. Horner J, Minifie F. Research ethics III: Publication practices and authorship, conflict of interest, and research misconduct. J Speech Lang Hear Res 2011;54:S346–62.
9. http://www.dfg.de/download/pdf/dfg_im_profil/reden_stellungnahmen/download/self_regulation_98.pdf
10. Vučković-Dekić Lj. Autorstvo/koautorstvo/lažno autorstvo. Biomedicinska istraživanja. 2012; 3(1):68-72.
11. International Committee of Medical Journals Editors. Uniform Requirements for Manuscript Submitted to Biomedical Journals: Writing and Ed

- iting for Biomedical Publication. (Updated October 2008). Available: <http://www.icmje.org/>
12. Hoen WP, Walvoort HC, Overbeke JPM. What are factors determining authorship and the order of the authors' names? A study among authors of the Netherlands' Tijdschrift voor Geneeskunde (Dutch Journal of Medicine). J Am Med Assoc. 1998;280:217-18.
 13. Šamić M. Kako nastaje naučno djelo. Uvodjenje u metodologiju i tehniku naučnoistraživačkog rada – opšti pristup. 8.izd. Sarajevo: Svjetlost; 1990. p. 170.
 14. Schön JH, Meng H, Bao Z. Nature. 2001; 413: 713.
 15. Schön JH, Meng H, Bao Z. Science. 2001; 294: 2138.
 16. Schön JH, Berg S, Kloc Ch., Batlogg B. Science. 2000; 287: 1022.
 17. Ryan KJ. Research misconduct in clinical research – the American experience and response. Acta Oncol. 1999; 38:93-97.
 18. Vučković-Dekić Lj. Prevare I podvale u biomedicinskim publikacijama. Srpski arhiv celokupnog lek. 2006; 134(Suppl 1): 50-56.
 19. Le Fanu. Life-saving medicine can be hard to swallow at first. The Sunday Telegraph (London) 1999 November 14.
 20. Zakon o komorama zdravstvenih radnika. "Sl. glasnik RS", br. 107/2005 i 99/2010.
 21. Zakon o autorskim i srodnim pravima. Sl. glasnik RS", br. 104/2009, 99/2011, 119/2012 i 29/2016 - odluka US.
 22. Krivični zakonik. "Sl. glasnik RS", br.82/2005, 88/2005-ispr., 107/2005 – ispr., 72/2009, 121/2012, 104/2013, 108/2014.
 23. Zakon o naučnoistraživačkoj delatnosti RS. "Sl. glasnik RS", br. 110/2005, 50/2006 - ispr., 18/2010 i 112/2015)
 24. Lederberg J. "Communication as the Root of Scientific Progress." The Scientist. 1993:10-4.



SISTEMSKI EFEKTI INHALACIONIH ANESTETIKA

Goran Rondović, Dragan Đorđević

Klinika za anesteziologiju i intenzivnu terapiju, Vojnomedicinska akademija, Beograd

Inhalacioni anestetici kada se koriste za uvod i održavanje opšte anestezije dovode do izmenjenog fiziološkog stanja organizma što se karakteriše reverzibilnim gubitkom svesti, analgezijom, amnezijom i mišićnom relaksacijom određenog stepena. Izmenjena aktivnost neurona javlja se u određenim regijama CNS-a. Retikularna formacija (retikularni aktivacioni sistem – RAS) u moždanom stablu odgovorna je za izmenjeno stanje svesti i motorne aktivnosti. Efekat anestetika na neuronsku aktivnost retikularne formacije je varijabilan i zavisi od vrste primenjenog leka. Druga mesta dejstva su cerebralni korteks, nukleus kuneatus, olfaktorni korteks i hipokampus, takođe i dorzalni rogovki kičmene moždine (transmisija bola). Dakle, inhibicija RAS-a, talamusa i korteksa dovodi do reverzibilnog gubitka svesti. Za amneziju je odgovorno dejstvo anestetika na hipokampus, amigdalnu, prefrontalni korteks i delove senzornog i motornog korteksa. Analgezija se postiže inhibicijom nociceptivnih impulsa na nivou kičmene moždine.

Po unitarnoj hipotezi svi inhalacioni anestetici imaju zajednički mehanizam dejstva na molekularnom nivou. U skladu sa tim je i činjenica da jačina inhalacionih anestetika (MAC) direktno korelira sa njihovom rastvorljivošću u lipidima (Meyer-Overton-ovo pravilo), pa se pretpostavljalo da anestezija nastaje kada se dovoljan broj molekula anestetičkog gasa rastvori u hidrofobnoj lipidnoj membrani. Dakle, po ovoj teoriji, što je veća solubilnost anestetika u lipidima to je jače njihovo dejstvo (teorija bazirana na lipidima).

Strukturna raznolikost inhalacionih anestetika sugerise da ne postoji interakci-

ja sa pojedinačnim specifičnim receptorom. *Makroskopski* gledano polja delovanja anestetika su mozak i kičmena moždina gde anestetici prekidaju neuronsku transmisiju signala. *Mikroskopski*, u pitanju su aksoni i sinapse pri čemu su veće koncentracije inhalacionih anestetika potrebne da se prekine aksonalna u odnosu na sinaptičku transmisiju. Ako se posmatraju ekscitatorne i inhibitorne sinapse, anestetici mogu blokirati ekscitatornu a pojačati inhibitornu transmisiju. *Na molekularnom nivou* posmatraju se presinaptička i postsinaptička membrana. Anestetici mogu izmeniti oslobađanje presinaptičkih neurotransmitera (preko promena intracelularnog kalcijuma) i modifikovati protok jona kroz postsinaptičke kanale.

Meyer-Overton-ovo pravilo podrazumeva da je polje molekularnog dejstva anestetika na hidrofobni deo ćelijske membrane. Hipoteza kritičnog volumena polazi od toga da anestetik deluje putem ekspanzije membrane

Ako se posmatra odnos lipida i proteina sa aspekta delovanja anestetika, prema novim saznanjima, teorija lipidne fluidizacije ne može da objasni nastanak anestezije a postoje i izuzeci od Meyer-Overtonovog pravila. Jedan od izuzetaka je „cut-off“ efekat koji pokazuje da jačina (potentnost) homologne serije anestetika raste sa rastom dužine lanca u hemijskoj formuli ali samo dok se ne dostigne kritična tačka. Posle toga anestetička aktivnost prestaje. Dalje, postoje visoko liposolubilni molekuli koji nemaju anestetička svojstva a mogu proizvesti druge fiziološke efekte kao na primer konvulzije. Takođe, postoje molekuli koji su slabo rastvorljivi u li

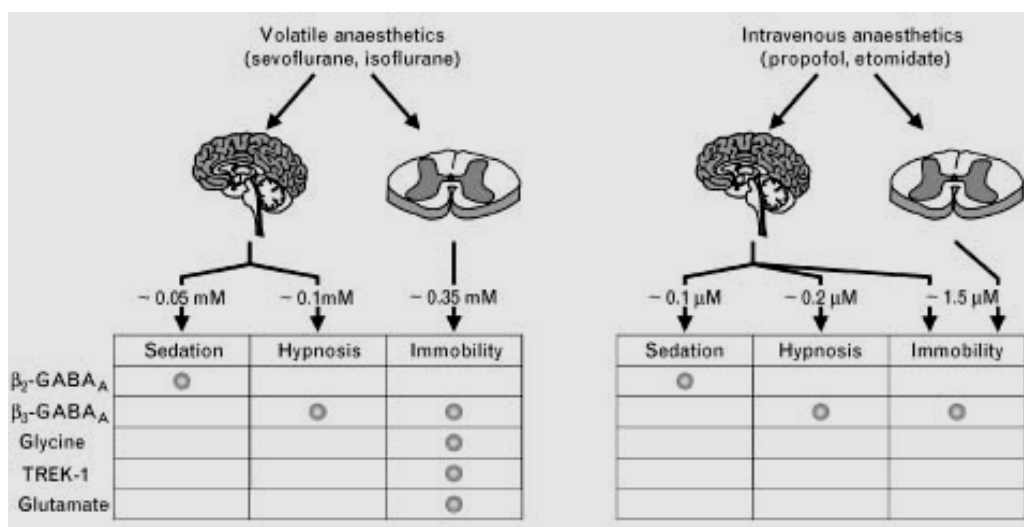
pidima ali su potentni anestetici kao što je hloral-hidrat.

Po novim teorijama važne su proteinske strukture (teorija bazirana na proteinima): neurotransmiteri, receptori i jonski kanali kao mesta dejstva opštih anestetika. Nagomalavaju se dokazi direktnog vezivanja anestetika za ekscitabilne membranske proteine. Sposobnost inhalacionih anestetika da moduliraju protok jona preko neurotransmiterskih receptor-kanal kompleksa može biti značajno izmenjena selektivnom pojedinačnom (singl) mutacijom u aminokiselinskom lancu proteina kanala. Te aminokiseline mogu formirati specifično polje vezivanja za inhalacione anestetike.

Novija istraživanja pokazuju da volatilni anestetici (izofluran, sevofluran) prouzrokuju mišićnu paralizu modulacijom više molekularnih meta predominantno u kičmenoj moždini. Ovaj mehanizam obuhvata dejstvo preko receptora γ -aminobuterne kiseline_A (GABA_A), glicinskih receptora, glutamatnih receptora i TREK-1 kalijumskih kanala. GABA_A i glicinski receptori imaju inhibitorni efekat. GABA stimuliše GABA_A receptore koji povećavaju permeabilnost hloridnih kanala i prouzrokuju hiperpolarizaciju ćelijske membrane što dovodi do smanjenja ekscitabilnosti. Do sada je identifikovano i klonirano 19 GABA_A receptorskih subjedinica u CNS-u sisara. Za dejstvo anestetika su najvažnije β_2 i β_3 subjedinice. Više od 25 tipova jonskih kanala se danas proučavaju kao potencijalno relevantna polja dejstva anestetika. Dakle, unitarna teorija dejstva anestetika je danas napuštena.

Amnezija, sedacija/hipnoza i mišićna paraliza su esencijalne komponente kiln

ičke anestezije. Malo se zna o molekularnim mehanizmima koji proizvode amneziju. Kod primene volatilnih anestetika, sedacija/hipnoza se proizvodi u mozgu, dok je mišićna paraliza (imobilnost) predominantno rezultat depresije spinalnih motornih neurona (1, 2). Kod intravenskih anestetika spinalna i supraspinalna dejstva su neophodna da bi se postigla mišićna paraliza. Intravenski i volatilni anestetici značajno se razlikuju i u efektivnim koncentracijama koje dovode do anestezije. Kod volatilnih anestetika koncentracije su u rasponu milimola (mM), dok su kod intravenskih anestetika one približno 1000 puta manje (raspon u mikromolima - μ M). Dalje, koncentracije u krvi koje dovode do sedacije/hipnoze su manje od onih koje dovode do paralize. Jonski kanali koji su uključeni u sedaciju/hipnozu pripadaju GABA_A receptorskoj familiji. Sedacija je predominantno posredovana preko β_2 subjedinice, dok hipnoza u najvećoj meri uključuje β_3 subjedinicu. Ovo važi i za intravenske i za volatilne anestetike. Važna razlika između ove dve grupe anestetika odnosi se na molekularne mehanizme koji dovode do mišićne paralize. Volatilni anestetici smanjuju spinalnu ekscitabilnost putem multiplih molekularnih mehanizama. Na suprot tome, intravenski anestetici deluju na kičmenu moždinu skoro isključivo putem GABA_A receptora. Ova razlika može objaviti veći kapacitet volatilnih anestetika redukuju pokrete na bolne stimuluse, kao i veći uticaj supraspinalnih molekularnih meta za dejstvo intravenskih anestetika kada dovode do paralize mišića (Slika 1).



Slika 1. Koncept dejstva anestetika: višestruka mesta i višestruki mehanizmi dejstva

Azot-oksikul i ksenon proizvode svoja anestetička dejstva tako što deluju kao antagonisti NMDA (N-metil-D-aspartat) receptora. NMDA receptori inače povećavaju provodljivost za kalcijum i magnezijum a pripadaju klasi glutamatnih receptora koji olakšavaju brzu ekscitatornu neurotransmisiju.

Neurološki efekti

Brzina cerebralnog metabolizma i potrošnje kiseonika (Cerebral Metabolic Rate and Oxygen consumption – CMRO₂) se smanjuje pod dejstvom svih potentnih, volatilnih inhalacionih anestetika. Ove promene dešavaju se istovremeno sa usporavanjem koje se uočava na elektroencefalogramu. Za sve volatilne anestetike, osim za halotan, kada se dostigne izoelektrični EEG (EEG bez aktivnosti), smatra se da je brzina cerebralnog metabolizma i potrošnje kiseonika dostigla svoj najniži nivo. Koncentracije halotana iznad onih kojima se dostiže izoelektrični EEG su obično toksične. Klinički, izofluran prouzrokuje najizrazitije smanjenje cerebralnog metabolizma i potrošnje kiseonika i dovodi do izoelektričnog EEG-a pri vrednosti od 2 MAC-a u poređenju sa desfluranom ili sevofluranom kojima treba

vrednost veća od 2 MAC-a da bi prouzrokovali izoelektrični EEG.

Cerebralni protok krvi (cerebral blood flow – CBF) se povećava pod dejstvom volatilnih anestetika, pri čemu je povećanje najizraženije kod primene halotana pa ga treba izbegavati kod većine neurohirurških intrakranijalnih procedura. Povećanje cerebralnog protoka krvi dovodi do povećanja intrakranijalnog pritiska i to je najizraženije kod primene halotana. Ovaj efekat se može ublažiti hiperventilacijom pre uvida u anesteziju ili pre intubacije. Izofluran povećava cerebralni protok krvi i intrakranijalni pritisak u koncentraciji iznad 1 MAC-a (3).

Volatilni anestetici malo utiču na količinu cerebrospinalne tečnosti. Halotan smanjuje stvaranje likvora, ali istovremeno inhibira reapsorbciju pa je konačni efekat na volumen likvora pozitivan. Izofluran ne utiče na količinu likvora, sevofluran smanjuje njegovo stvaranje dok desfluran može prouzrokovati blago povećanje produkcije likvora. Rezultujući efekti na intrakranijalni pritisak su minimalni.

Azot-oksikul povećava cerebralni protok krvi, intrakranijalni pritisak, cerebralni metabolizam i potrošnju kiseonika, ali svi ovi efekti su blagi u poređenju sa volatilnim anestheticima. Azot-oksikul ima

blagi anti-neuroprotektivni efekat pa treba biti oprezan u slučajevima gde postoji sumnja na povećani intrakranijalni pritisak ili cerebralnu ishemiju. Jedini inhalacioni anestetici koji imaju analgetski efekat su azot-

oksidul i ksenon. Ostali inhalacioni anestetici, pri visokim koncentracijama, mogu prevenirati pokrete na bolne stimuluse i blokirati adrenergički odgovor na različite stimuluse (Tabela 1).

Tabela 1.

Efekti inhalacionih anestetika na centralni nervni sistem

Efekat	Azot-oksidul	Desfluran	Sevofluran	Izofluran	Halotan
Cerebralni protok krvi	↑	↑	↑	↑	↑
Intrakranijalni pritisak	↑	↔ ↑	↔ ↑	↔ ↑	↔ ↑
Metaboličke potrebe	↑	↓	↓	↓	↓

Kardiovaskularni efekti

Volatilni anestetici prouzrokuju dozno-zavisno smanjenje krvnog pritiska. Halotan deluje direktno depresivno na miokard i prouzrokuje smanjenje srčane kontraktilnosti i minutnog volumena srca. Dozno-zavisnu hipotenziju prouzrokuju i drugi volatilni anestetici i po jačini tog efekta prvi u nizu je izofluran, efekat je slabiji kod sevoflurana a još slabiji kod desflurana. Ali, za razliku od halotana, kod ova tri volatilna anestetika minutni volumen srca se najčešće održava kompenzatornom tahikardijom. Osim toga, za ova tri volatilna anestetika je zajedničko da do smanjenja krvnog pritiska dovode smanjenjem sistemske vaskularne rezistencije (SVR) opet za razliku od halotana koji ne menja SVR.

Na srčanu frekvencu najviše utiče desfluran, naročito kada se brzo povećava njegova koncentracija. Izofluran takođe ima sličan efekat ali manje izražen. Sevofluran i halotan malo ili nimalo ne utiču na brzinu srčane frekvence.

Svi volatilni anestetici su koronarni vazodilatatori. Izofluran može biti povezan sa koronarnim “steal” sindromom, kada se regionalna miokardna ishemija pogoršava zbog toga što se krv preusmerava dalje od fiksnih lezija nastalih zbog stenoze

koronarnih arterija. Kada postoji suženje koronarnih arterija, a koristi se vazodilatator, on “krade” krv iz tih ishemičnih zona zbog toga što su sužene koronarne arterije uvek maksimalno dilatirane a vazodilatator će delovati na druge koronarne krvne sudove pa se preusmeravanjem krvi u druge regione miokarda ishemija još više pogoršava. Halotan ne prouzrokuje ovaj sindrom jer hipotenzija do koje dovodi smanjuje koronarni protok krvi. Smatra se da sevofluran može da zaštiti srce od ishemično-reperfuzionog oštećenja. Sevofluran i desfluran ne dovode do “steal” sindroma.

QT interval povećavaju svi volatilni anestetici. Halotan je, osim ovoga, i aritmogen. Sinoatrijalna aktivnost i sprovođenje impulsa je usporeno pa je srce osetljivo na efekte aritmogenih agenasa. Zato se primena adrenalina izbegava kada se koristi halotan.

Azot-oksidul dovodi do stimulacije simpatikusa iako depresivno deluje na miokard. Ova simpatička stimulacija održava arterijski krvni pritisak i minutni volumen srca. Sa oprezom ga treba koristiti kod pacijenata sa oboljenjem koronarnih arterija ili sa hipovolemijom. Azot-oksidul može dovesti do povećanja pulmonalne vaskularne rezistencije (PVR) (Tabela 2).

Tabela 2.
Efekti inhalacionih anestetika na kardiovaskularni sistem

Efekat	Azot-oksikul	Desfluran	Sevofluran	Izofluran	Halotan
Srednji arterijski pritisak	↔ ↑	↓	↓	↓	↓
SVR	↔ ↑	↓	↔	↓	↔
Srčana frekvenca	↔ ↑	↑	↑	↑	↔
Funkcija miokarda	↓	↓	↓	↓	↓
Adrenalinom indukovana aritmija	↑	↔	↔	↔	↑

Respiratorni efekti

Desfluran i u manjoj meri izofluran prilikom udisanja iritiraju gornje disajne puteve. Tokom uvida može se javiti kašljanje, laringospazam i bronhospazam. Zbog toga ova dva anestetika treba izbegavati kod inhalacionog uvida u anesteziju. U poređenju sa njima sevofluran, azot-oksikul i halotan se mnogo bolje podnose pa se koriste za inhalacioni uvod. Svi volatilni anestetici su bronhodilatatori. Oni smanjuju respiratorni volumen i prouzrokuju kompenzatornu tahipneuu. Kada su koncentracije volatilnih anestetika visoke respiratorni volumen se značajno smanjuje pa kompenzatorno povećanje respiratorne frekvence nije dovoljno da bi se održala minutna ventilacija. Tada dolazi do porasta PaCO₂. Ovo povećanje PaCO₂ će biti manje ukoliko se umesto jednog volatilnog anestetika koristi mešavina volatilnog anestetika i azot-oksikula. Odgovor organizma na hiperkarbiju je oslabljen pri visokim koncentracijama anestetika, dok je odgovor na hipoksiju oslabljen pri nižim koncentracijama. Ovo postaje značajno u postoperativnom periodu kada dugotrajne niske koncentracije volatilnog anestetika mogu dovesti do toga da pacijent ne reaguje na

hipoksemiju čak i kada izgleda potpuno budan u sobi za postoperativni nadzor. Zato posebnu pažnju treba obratiti na gojazne pacijente, pušaće ili one koji pate od apnee u snu. Dakle, volatilni anestetici dovode do slabljenja respiratornog odgovora i na hipoksiju i na hiperkarbiju. Inhalacioni anestetici inhibiraju hipoksičnu pulmonalnu vazokonstrikciju (HPV). Normalno u plućima dolazi do preusmeravanja protoka krvi ka delovima koji se ventiliraju. U toku anestezije ovaj fiziološki odgovor je oslabljen. To dovodi do ventilaciono-perfuzionog disbalansa što rezultuje povećanjem PaCO₂ u krvi. Azot-oksikul takođe dovodi do smanjenja respiratornog volumena i tahipnee. Čak i male količine azot-oksikula dovode do depresije respiratornog centra odnosno adekvatnog ventilatornog odgovora na hipoksemiju. Ne treba zaboraviti efekte ovog gasa na džepove vazduha u organizmu (pneumotoraks, srednje uvo, creva). Azota ima 79% u vazduhu koji ispunjava ove džepove a on je slabo rastvorljiv u krvi i teško se reapsorbuje. Ako pacijent udiše azot-oksikul, on difunduje kroz membrane i dovodi do ekspanzije ovih džepova što može imati katastrofalne posledice (Tabela 3).

Tabela 3.
Efekti inhalacionih anestetika na respiratorni sistem

Efekat	Azot-oksikul	Desfluran	Sevofluran	Izofluran	Halotan
Respiratorni volumen	↓	↓	↓	↓	↓
Respiratorna frekvenca	↑	↑	↑	↑	↑
Hipoksički ili hiperkarbički odgovori	↓	↓	↓	↓	↓
HPV (in vitro)	↓	↓	↓	↓	↓
Rezistenca u vazдушnim putevima	↔	↑	↓	↓	↓

Efekti na jetru

Jetra se krvlju snabdeva iz vene porte i hepatične arterije. Izofluran, sevo-fluran i desfluran dovode do povećanja protoka krvi kroz hepatičnu arteriju a istovremeno prouzrokuju malo ili nikakvo smanjenje protoka u portnoj veni. Ukupni protok krvi kroz jetru se održava ili malo smanjuje. Nasuprot tome, halotan smanjuje protok u veni porte i dovodi do konstrikcije hepatične arterije. Sve ovo dovodi do smanjenog snabdevanja jetre kiseonikom tokom anestezije halotanom. Azot-oksikul takođe smanjuje hepatični protok krvi ali ovaj efekat je blag.

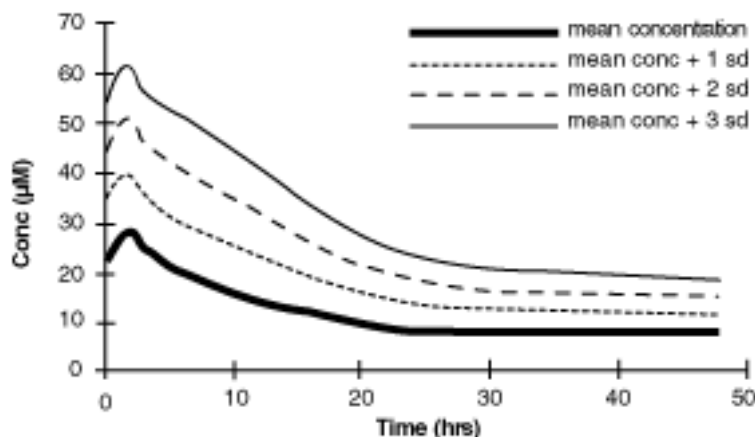
Halotan takođe može da dovede do “halotanskog hepatitisa”. Kada je jetra izložena dejstvu halotana može doći do centrilobularne nekroze. Postoje dva mehanizma ovog oštećenja. Prvi mehanizam halotanskog hepatitisa odnosi se na metabolite halotana, naročito one koji su nastali u hipoksičnim uslovima, koji prouzrokuju kratkotrajno povećanje vrednosti jetrinih enzima, umor, mučninu i retko žuticu. Ovo prolazno stanje javlja se nezavisno od toga da li je bilo prethodnog izlaganja dejstvu halotana. Drugi mehanizam halotanskog hepatitisa je imunski posredovan proces, pri kome se javljaju osip, groznica i eozinofilija nekoliko dana nakon izlaganja dejstvu halotana. Tokom oksidativnog metabolizma halotana

stvaraju se metaboliti koji deluju kao antigeni. Ovi antigeni dovode do propagacije imunskog odgovora, koji tokom drugog izlaganja halotanu, može dovesti do imunskog odgovora toliko snažnog da prouzrokuje fulminantnu nekrozu jetre (4).

Efekti na bubrege

Inhalacioni anestetici smanjuju renalni protok krvi, brzinu glomerularne filtracije i diurezu. Volatilni anestetici se metabolišu u fluoride koji mogu potencijalno biti nefrotoksični ali nije se pokazalo da je ovo klinički značajno. Briga o potencijalnoj fluoridnoj nefrotoksičnosti u kliničkoj praksi, koja je dugo bila glavna prepreka upotrebi sevoflurana van Japana je na osnovu dosadašnjih podataka ipak samo teoretska. Koncentracije fluoridnog jona veće od 50 μM dovode do subkliničke nefrotoksičnosti, a veće od 90 μM daju klinički jasnu renalnu insuficijenciju. Studije na dobrovoljcima pokazuju da samo u 7% slučajeva dolazi do povećanja koncentracije fluoridnog jona preko 50 μM u toku sevofluranske anestezije, ali nije uočena klinička nefrotoksičnost. Ipak, koncentracija fluorida zavisi od dužine anestezije, koncentracije sevoflurana koja se isporučuje pacijentu i sastava anestetičke mešavine gasova (Grafikon 1).

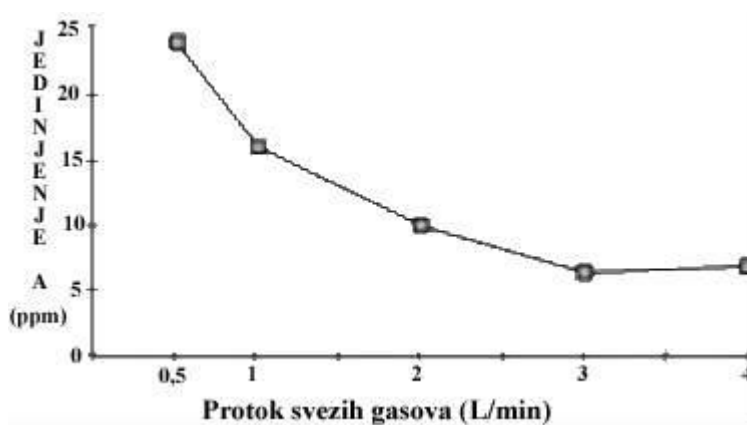
Grafikon 1. Koncentracija fluorida po izlaganju 1,27 MAC sevoflurana, u prosečnom trajanju 2,06 časova



Poređena je koncentracija fluorida posle ponavljanih anestezija sevofluranom i kod pojedinih bolesti u odnosu na zdrave osobe. Polu-život fluorida se produžava kod renalne insuficijencije, ali ne i kod starijih. Degradacioni produkti sevoflurana u kliničkim uslovima nastaju u direktnom

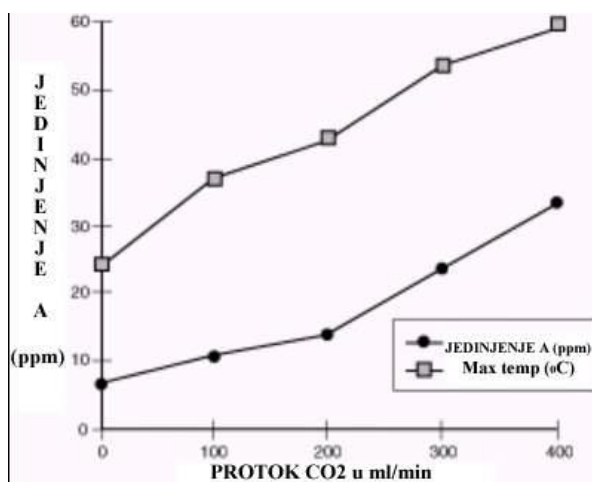
kontaktu sa CO₂ apsorberom (Sodalajmom ili Baralajmom) kada nastaju pentafluoroisopropenyl fluoromethyl ether (PIFE, C₄H₂F₆O), poznat kao JEDINJENJE A, i u tragovima pentafluoromethoxy isopropyl fluoromethyl ether (PMFE, C₅H₆F₆O), poznat kao JEDINJENJE B (Grafikon 2).

Grafikon 2. Odnos protoka svežeg gasa i nastajanja JEDINJENJA A u kružnom sistemu sa apsorberom



Degradacija sevoflurana u “sodalajmu” se povećava sa temperaturom. S obzirom da je reakcija “sodalajma” sa CO₂ egzotermna, povećanje temperature je uslovljeno povećanjem količine absorbovanog CO₂,

što opet zavisi od protoka svežeg gasa u kružnom sistemu za anesteziju, metaboličkog stanja pacijenta i ventilacije (Grafikon 3).

Grafikon 3. Odnos CO₂, JEDINJENJA A i temperature


Dokazana je nefrotoksičnost JEDINJENJA A kod miševa posle ekspozicije u trajanju od jedan do tri časa. Nisu uočene histološke promene pri koncentracijama do 270 ppm (milijonitih delova) u toku jednog časa. Sporadične nekroze pojedinačnih ćelija proksimalnih tubula su primećene pri koncentracijama od 114 ppm posle tročasovne ekspozicije miševa JEDINJENJU A. 50%-tna letalna koncentracija (LC₅₀) za jedan sat ekspozicije je 1050-1090 ppm, a za tri sata ekspozicije je 350-490 ppm.

Pri protoku svežeg gasa od 1 L/min, srednja vrednost maksimalne koncentracije JEDINJENJA A u sistemu za anesteziju u kliničkim uslovima je približno 20 ppm (0,002%) sa sodalajmom i 30 ppm (0,003%) sa baralajmom kod odraslih pacijenata. Srednja maksimalna koncentracija kod pedijatrijskih pacijenata je sa sodalajmom oko polovine količine kod odraslih. Najveća koncentracija zabeležena u kliničkoj praksi za pojedinog pacijenta sa sodalajmom je 32 ppm (0,0032%) i sa baralajmom 61 ppm (0,0061%). Za sada nisu prijavljeni podaci da se u kliničkim uslovima javljaju koncentracije JEDINJENJA A koje imaju štetne efekte po pacijenta.

U toku prolongirane anestezije sevofluranom sa malim protokom (low flow

anesthesia) (< 700 ml/min) kod ljudi izmerene su maksimalne koncentracije JEDINJENJA A oko $7,6 \pm 1,0$ ppm uz sodalajm. Ovakvi nivoi su daleko ispod toksičnih nivoa ustanovljenih pri eksperementima na miševima.

Efekti na skeletnu muskulaturu

Svi volatilni anestetici dovode do relaksacije skeletne muskulature i pojačavaju neuromišićnu blokadu. Ovaj efekat se javlja na postsinaptičkim nikotinskim acetilholinskim receptorima. U pedijatrijskoj populaciji pacijenata volatilnim anestetima mogu da se postignu uslovi za intubaciju kada se koristi tehnika inhalacionog uvida u anesteziju bez korišćenja mišićnih relaksanata. Azot-oksikul ne dovodi do relaksacije skeletne muskulature; može dovesti do rigiditeta skeletnih mišića kada se koristi u visokim koncentracijama.

Tokom carskog reza, nakon rođenja novorođenčeta i uklanjanja placente, korišćenje volatilnih anestetika u MAC vrednosti većoj od 1 može dovesti do atonije uterusa.

Svi volatilni inhalacioni anestetici mogu biti okidač za malignu hipertermiju, jedino azot-oksikul nije triger.

Hematološki efekti

Azot-oksikul može inhibirati enzime metionin sintetazu zavisnu od vitamina B12 (stvaranje mijelina) i timidilat sintetazu (sinteza DNK). Kod dugotrajnog izlaganja dejstvu azot-oksikula može doći do supresije kostne srži (megaloblastna anemija) i periferne neuropatije.

Kada volatilni anestetici prolaze kroz CO₂ apsorber dolazi do njegove degradacije i stvara se ugljen-monoksik, naročito ako je apsorber suv. Kada pacijent udiše ugljen-monoksik stvara se karboksihemoglobin, što dovodi do smanjenja isporuke kiseonika tkivima. Manje ugljen-monoksika se stvara u direktnom kontaktu sa Baralajmom u odnosu na Sodalajm. Ovo se prevenira pojačanom pažnjom kada je CO₂ apsorber u pitanju. Pri MAC koncentracijama najviše ugljen-monoksika se proizvodi pri korišćenju desflurana, zatim izoflurana, a najmanje pri upotrebi sevoflurana i halotana.

Gastrointestinalni efekti

Azot-oksikul može povećati verovatnoću postoperativne mučnine i povraćanja, mada o tome ne postoje čvrsti

dokazi. Trebalo bi ga izbegavati kod pacijenata pod visokim rizikom za postoperativnu mučninu i povraćanje naročito ako to imaju u anamnezi.

Literatura:

1. Grasshoff C, Rudolph U, Antkowiak B. Molecular and systemic mechanisms of general anaesthesia: the "multi-site and multiple mechanisms" concept. *Curr Opin Anaesthesiol.* 2005; 18:386-91
2. Šurbatović M. Farmakokinetika i farmakodinamija inhalacionih anestetika – minimalna alveolarna koncentracija. U: *Inhalaciona anestezija*. Editori: P. Stevanović, M. Jović, D. Jekić. Društvo anesteziologa Srbije (AXSIS) 2005; 33-62
3. Forman SA, Benkowitz C. Pharmacology of inhalational anesthetics. U: *Anesthesiology* Second Edition. Editors: David E. Longnecker et al. McGraw-Hill Education /Medical 2012; 596-616
4. Damian D, Herlich A. Mechanisms of anesthetic action. U: *Basic Clinical Anesthesia*. Editors: Paul K. Sikka et al. Springer 2015; 119-29



AIXMED

 **mark medical**TM
empowering healthcare.

 **VICOR**

BIOHEMIJSKI PARAMETRI SEPSE

Ivo Udovičić, Ana Popadić, Aleksandar Vranjanac

Klinika za anesteziologiju i intenzivnu terapiju, Vojnomedicinska akademija, Beograd

Sažetak:

Sepsa je jedan od najčešćih uzroka smrti u bolnicama sa stalnim porastom broja slučajeva. Savremene metode dijagnostike su nepouzidane i neblagovremene, što ima za posledicu nepravovremenu i neadekvatnu upotrebu antibiotske terapije pa samim tim i lošiju prognozu. Dostupni biomarkeri sepse nisu dovoljno senzitivni i specifični da bi ispunili sve kriterijume idealnog biomarkera sepse, te su potrebna dalja istraživanja na ovom polju.

Ključne reči: biomarkeri sepse, C-reaktivni protein, prokalcitonin, interleukin-6, presepsin

Uvod

Sepsa je jedan od najčešćih uzroka smrti u bolnicama i pored dosledne primene preventivnih mera infekcije i upotrebe savremenih antibiotika i reanimacionih postupaka. U svim zemljama u kojima su dostupni podaci o hospitalizaciji zbog sepse broj slučajeva je u stalnom porastu. Septički odgovor uključuje inflamatorne i antiinflamatorne procese, humoralne i celularne reakcije, te poremećaje cirkulacije povezane u izuzetno kompleksan lanac događaja (1). Trenutno, dijagnoza se zasniva na nespecifičnim fiziološkim kriterijumima i otkrivanju patogena kultivisanjem. Međutim, dijagnoza je nepouzdana, terapija se često odlaže, a antibiotici se neretko koriste nepravilno i preterano. Postoji potreba za novim biomarkerima sepse koji mogu pomoći u skriningu sepse, ranoj dijagnozi, proceni rizika, donošenju terapijskih odluka i prognozi, a sve u cilju poboljšanja ishoda (2).

BIOMARKERI SEPSE

Idealni biomarkeri treba da budu objektivni parametri koji se mogu meriti i koji odražavaju normalne i patološke

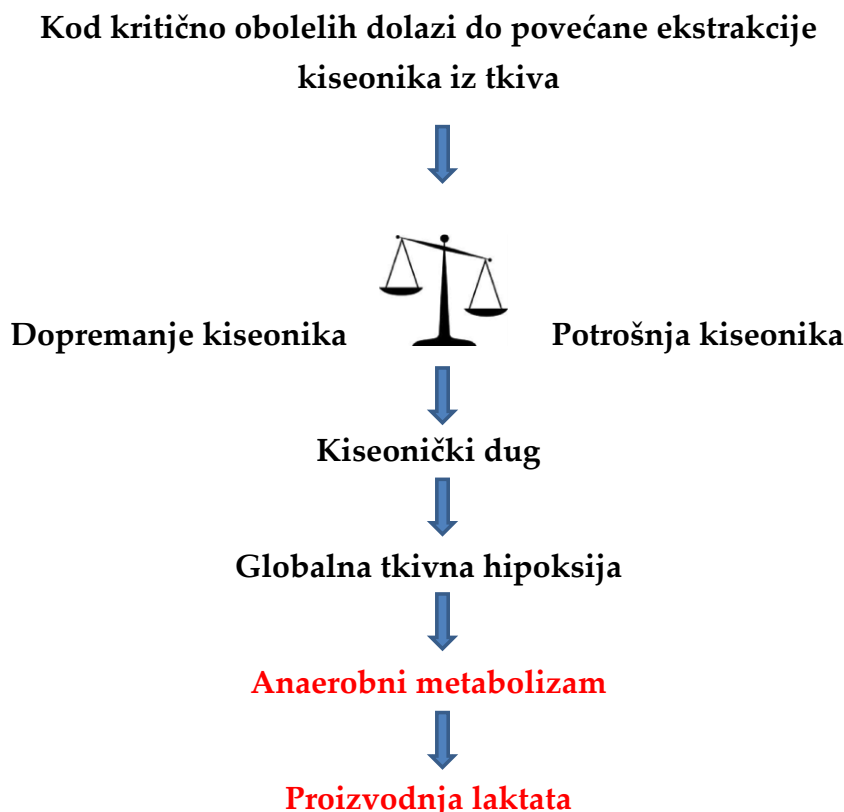
processe kao i odgovore na terapijske mere (2). Potrebno je da budu visoko senzitivni i visoko specifični, testovi treba da budu laki za izvođenje i interpretiranje i treba da koreliraju sa težinom bolesti i mortalitetom. Njihov nivo u krvi treba da se menja u skladu sa kliničkom evolucijom bolesti i primenjenom terapijom. Testovi za određivanje idealnih biomarkera treba da budu lako dostupni i jeftini.

Proučavano je više od 170 biomarkera zbog njihove moguće uloge u ranoj dijagnostici i praćenju toka sepse (2), ali zlatni standard u dijagnozi sepse i dalje ostaju klinička slika, inflamatorni i hemodinamski parametri, te pokazatelji organske disfunkcije i tkivne perfuzije (3). U kliničkoj praksi danas se najčešće prate leukociti, laktati i pojedini biomarkeri kao što su C-reaktivni protein, prokalcitonin, citokini, receptorski biomarkeri, koagulacioni biomarkeri, biomarkeri povezani sa oštećenjem vaskularnog endotela, markeri povezani sa disfunkcijom organa, proteini akutne faze i drugi dostupni biomarkeri.

LAKTATI

Nivo laktata u serumu je povišen u teškoj sepsi i septičkom šoku kao rezultat

hipoperfuzije tkiva i anaerobnog metabolizma (Slika 1), a uz istovremeni smanjen klirens laktata u jetri.



Slika 1. Nivo laktata u serumu

Nekoliko studija je pokazalo da je povišen nivo laktata u serumu povezan sa većim mortalitetom obolelih od sepe (4,5). U studiji Khosravani et al. pokazano je da je hiperlaktemija preko 2 mmol/l bila povezana sa statistički značajno većim mortalitetom u odnosu na pacijente bez hiperlaktemije (6).

C-REAKTIVNI PROTEIN

C-reaktivni protein (CRP) ubraja se u proteine akutne faze budući da su njegovi nivoi viši kod akutno obolelih pacijenata, dok se vrednosti smanjuju sa oporavkom pacijenta. Sintetiše se u jetri i adipocitima, a njegovu sintezu stimuliše interleukin-6 (IL-6). U akutnoj fazi nivo CRP se pov-

ećava za 4 do 6 sati, a vrhunac dostiže nakon 24 do 38 sati (3). CRP je senzitivni marker inflamacije i oštećenja tkiva, ali je niskospecifičan s obzirom na to da nivo CRP raste i u inflamatornim stanjima neinfektivne etiologije, npr. u autoimunim i reumatskim bolestima.

PROKALCITONIN

Prokalcitonin(PCT) je peptidni prekursor kalcitonina i u normalnim uslovima proizvode ga C-ćelije tireoidne žlezde. U upalnim procesima nivo prokalcitonina naglo raste i tada je ekstratireoidnog porekla (jetra, bubrezi, masno tkivo, slezina, pankreas i dr.)(3). Najjači direktni stimulator sinteze PCT je bakterijski

endotoksin (lipopolisaharid), dok su indirektni stimulatori sinteze PCT inflamatorni citokini, npr. TNF- α i IL-1 α i IL-6. U bakterijskim infekcijama nivo PCT počinje da raste u roku od 2 do 4 sata nakon početka sistemske infekcije, a maksimalne vrednosti dostiže između 24 i 48 sati (7). PCT je specifičniji i senzitivniji od CRP, IL-6 i laktata za

dijagnozu sepse (8), a posebno je značajan za ranu dijagnozu sepse. U virusnim infekcijama se oslobađa IFN- γ koji nishodno reguliše sintezu PCT što je značajno za razlikovanje bakterijskih od virusnih infekcija. Takođe, nivoi PCT su viši u Gram-negativnim bakterijemijama nego u Gram-pozitivnim. U tabeli 1 prikazane su vrednosti PCT u zavisnosti od različitih inflamatornih stanja (7).

Tabela 1.

Vrednosti PCT u zavisnosti od različitih inflamatornih stanja

REFERENTNE VREDNOSTI	
PCT (ng/ml)	Pacijent
< 0.05	Zdravi
<0.5	Hronični inflamatorni i autoimuni procesi, virusne infekcije, lokalizovane bakterijske infekcije
0.5 - 2	SIRS, politrauma, opekotine
> 2 (često 10 - 100)	Teške bakterijske infekcije, sepsa, septički šok, multipla organska insuficijencija

Nivo PCT korelira sa težinom kliničke slike. Sa kontrolom infekcije dolazi do pada nivoa PCT, pa je posebno značajno određivanje vrednosti PCT u vođenju antibiotske terapije, a u cilju redukovanja nepotrebne upotrebe antibiotika (9,10). Po pravilu, smanjenje nivoa PCT za više od 30% nakon prva 24 sata od početka antibiotske terapije je znak da je terapija odgovarajuća, a sistemska infekcija pod kontrolom (7).

INTERLEUKIN-6

IL-6 je citokin sa širokim spektrom bioloških aktivnosti. Sekretuju ga mnoge

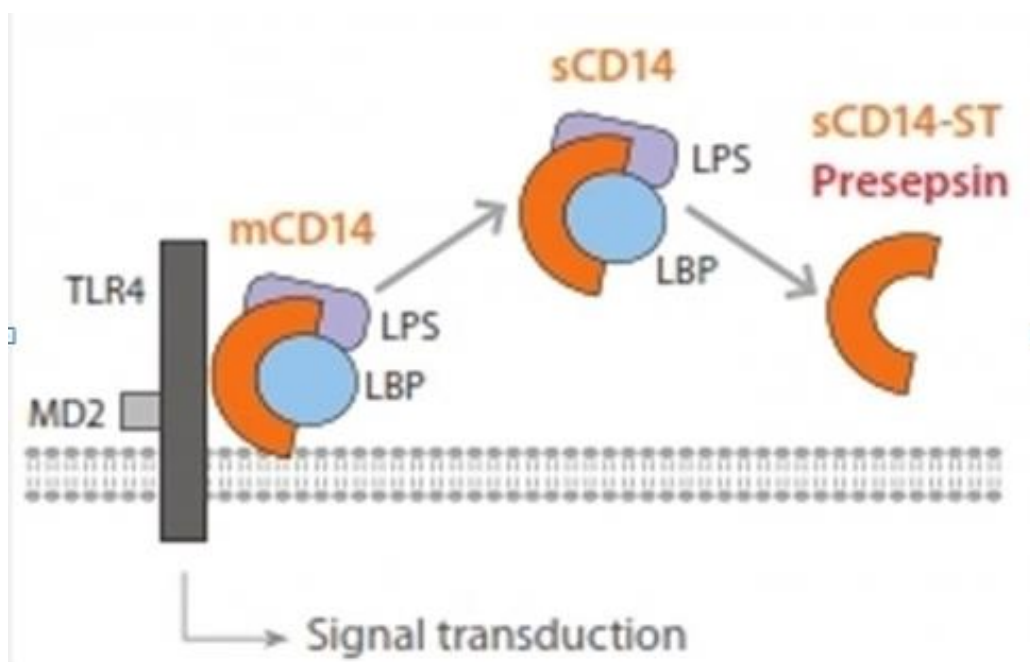
ćelije u imunskom odgovoru, a ima i proinflamatorno i antiinflamatorno dejstvo. Rani je indikator sepse i u plazmi opstaje duže od drugih citokina (pol-uvreme raspada 45 minuta). Nivo IL-6 u serumu korelira sa težinom sepse i septičkog šoka (11). IL-6 je senzitivniji ali manje specifičan biomarker.

PRESEPSIN

Presepsin se ubraja u novije biomarkere koji nastaje od CD14 receptora. CD14 je glikoprotein na membrani monocita/ makrofaga i služi kao receptor za stvoreni kompleks lipopolisaharida (LPS) i pro-

teina koji vezuje lipopolisaharide (engl. lipopolisaccharide binding protein, LBP). CD14 aktivira toll-like receptor 4 u prisustvu infektivnog agensa. Kompleks LPS-LBP-CD14 se oslobađa u cirkulaciju

gde se pod dejstvom plazma proteaze stvara fragment sCD14-ST (engl. subtype – podtip) odnosno presepsin (3). Na slici 2 je prikazan mehanizam nastanka presepsina.



Slika 2. Mehanizam nastanka presepsina

Indukcija nastanka presepsina je veoma brza, već 2 sata nakon jakog infektivnog prodora. Presepsin pokazuje veću osetljivost i specifičnost od PCT, CRP i IL-6 u postavljanju dijagnoze sepse (12), a pokazuje i dobru korelaciju sa težinom kliničke slike (13,14).

Zaključak

Pravovremena dijagnoza sepse značajno utiče na izbor antibiotske terapije i prognozu ishoda sepse. Pronalaženjem novih senzitivnijih i specifičnijih biomarkera sepse olakšalo bi se pravovremeno postavljanje dijagnoze, primena adekvatne antibiotske terapije i praćenje toka bolesti u cilju smanjenja mortaliteta.

Literatura

1. Pierrakos C, Vincent JL. Sepsis biomarkers: a review. Crit Care. 2010;14(1): R15.
2. Cho SY, Choi JH. Biomarkers of sepsis. Infect Chemother. 2014 Mar;46(1):1-12.
3. Prucha M, Bellingan G, Zazula R. Sepsis biomarkers. Clin Chim Acta. 2015 Feb 2;440:97-103.
4. Mikkelsen ME, Miltiades AN, Gaieski DF, et al. Serum lactate is associated with mortality in severe sepsis independent of organ failure and shock. Crit Care Med. 2009 May;37(5):1670-7.
5. Shapiro NI, Howell MD, Talmor D, et al. Serum lactate as a predictor of mortality in emergency department patients with infection. Ann Emerg Med. 2005 May;45(5):524-8.

6. Khosravani H, Shahpori R, Stelfox HT, et al. Occurrence and adverse effect on outcome of hyperlactatemia in the critically ill. *Crit Care*. 2009;13(3):R90.
7. Meisner M. Update on procalcitonin measurements. *Ann Lab Med*. 2014 Jul;34(4):263-273.
8. Muller B, Becker KL, Schachinger H, et al. Calcitonin precursors are reliable markers of sepsis in a medical intensive care unit. *Crit Care Med*. 2000 Apr;28(4):977-83.
9. Briel M, Schuetz P, Mueller B, et al. Procalcitonin-guided antibiotic use vs a standard approach for acute respiratory tract infections in primary care. *Arch Intern Med*. 2008 Oct 13;168(18):2000-7.
10. Nobre V, Harbarth S, Graf JD, et al. Use of procalcitonin to shorten antibiotic treatment duration in septic patients: a randomized trial. *Am J Respir Crit Care Med*. 2008 Mar 1;177(5):498-505.
11. Harbarth S, Holeckova K, Froidevaux C, et al. Diagnostic value of procalcitonin, interleukin-6, and interleukin-8 in critically ill patients admitted with suspected sepsis. *Am J Respir Crit Care Med*. 2001 Aug 1;164(3):396-402.
12. Zou Q, Wen W, Zhang X. Presepsin as a novel sepsis biomarker. *World J Emerg Med*. 2014;5(1):16-19.
13. Masson S, Caironi P, Spanuth E, et al. Presepsin (soluble CD14 subtype) and procalcitonin levels for mortality prediction in sepsis: data from the Albumin Italian Outcome Sepsis trial. *Crit Care*. 2014;18(1):R6.
14. Endo S, Suzuki Y, Takahashi G, et al. Presepsin as a powerful monitoring tool for the prognosis and treatment of sepsis: a multicenter prospective study. *J Infect Chemother*. 2014 Jan;20(1):30-4.





Terumo

MIŠIĆNI RELAKSANTI U ELEKTROKONVULZIVNOJ TERAPIJI

Krasimirka Grujić, Snježana Zeba

Klinika za anesteziologiju i intenzivnu terapiju, VMA Beograd

Sažetak

Elektrokonvulzivna terapija (EKT) je metod koji se koristi za lečenje težih duševnih poremećaja rezistentnih na psihofarmakološku terapiju, stimulacijom mozga električnom strujom, sa namerom da se izazove kratkotrajno konvulzivno stanje slično epileptičnim napadima. EKT je poznata i pod ranijim nazivom „ elektrošok terapija „. Ovu medicinsku proceduru sprovode psihijatri i anesteziolozi u saradnji sa anestezičarima i medicinskim tehničarima. Pre započinjanja EKT-a obavezno se sprovodi medicinska priprema pacijenta koja podrazumeva osnovne laboratorijske analize, EKG, snimak pluća i srca, nalaz kardiologa. Konačno mišljenje i saglasnost za izvođenje procedure daje anesteziolog. EKT se primenjuje ujutru pre doručka. Zbog primene opšte anestezije , pacijent 6 sati pre tretmana ne sme da jede niti uzima tečnost. Dok pacijent leži obezbedi se venski put, standardni monitoring, oksigenacija, daje se anestetik koji pacijenta uvodi u san , a potom depolarizujući mišićni relaksant koji izaziva opuštanje mišića. Benet (1940 god) je koristio kurare pri izvođenju elektrošoka u lečenju psihijatrijskih poremećaja. Theffeff je 1951 godine u Stokholmu prvi put primenio Sukcinitil-holin na čoveku. Sukcinitil-holin je depolarizujući mišićni relaksant koji dovodi do depolarizacije motorne ploče i održava je u stanju depolarizacije, čime onemogućava transmisiju nervnog impulsa. Sukcinitil-holin je kvaternarno amonijumsko jedinjenje , traje kratko- 4 do 6 minuta , daje kao acetilholin i dovodi do depolarizujućeg bloka.

Njegova hidroliza se odigrava uz pomoć prave i pseudoholin esteraze. Smanjena aktivnost i niska koncentracija holinesteraze mogu dovesti do produženog delovanja sukcinil-holina, kao i upotreba nekih lekova. U nekih pacijenata mogu postojati normalne vrednosti plazma-holin esteraze ali je njena aktivnost niska.

Ključne reči : elektrokonvulzivna terapija, mišićni relaksanti, nervna vlakna , holinesteraza

Uvod

Elektrokonvulzivna terapija (EKT) ima široku primenu u psihijatrijskoj praksi kao uspešna metoda lečenja ozbiljnih depresija i nekih drugih psihijatrijskih poremećaja poput manije i nekih tipova šizofrenije.. EKT je često brža , sigurnija i mnogo efikasnija , sa manje nuspojava nego terapija lekovima, iako ostaje i dalje kontroveržno područje psihijatrije. Električni podražaj proizveden EKT-om sadržava kratke strujne udare , prekinute daljim periodima električne neaktivnosti. Aktivacija autonomnog nervnog sistema za vreme izvođenja EKT-a odgovor na je za

izražene kardiovaskularne promene koje pritom nastaju. Aktivacija parasimpatikusa dovodi do inicijalne bradikardije. Zabeležene su ozbiljne bradikardije (<30/min), čak i prolazne asistolije u trajanju do 6 sekundi. Nakon početne faze dolazi do jake simpatičke stimulacije praćene tahikardijom i hipertenzijom u trajanju od nekoliko minuta. Povećana mišićna aktivnost tokom konvilzija povećava potrošnju kiseonika, te u predisponiranih osoba može uzrokovati ishemijsku miokarda. Protok krvi kroz mozak, intrakranijalni i intraokularni pritisci takođe se privremeno povećavaju. Apsolutne kontraindikacije za izvođenje EKT-a su:

- miokardni infarkt unutar tri meseca , kao i cerebrovaskularni poremećaji ili povećanje intrakranijalnog pritiska bilo koje etiologije.

Relativne kontraindikacije su postojanje fraktura, teška osteoporoza, srčana insuficijencija, angina pectoris, pace macer, opstruktivna bolest pluća, glaukom, ablacija retine , thrombophlebitis, visokorizična trudnoća.. Iako postoje kontraverzni stavovi EKT može biti tretman izbora za lečenje depresije u trudnoći.

IZVOĐENJE EKT-a

Izvođenje anestezije za EKT komplikuje činjenica da primenjeni anestezijski agensi mogu uticati na uspeh lečenja , menjajući prag izbijanja kao i njihovo trajanje. Posebna pažnja pri anestezijskom pregledu mora se obratiti na kardiovaskularni status, eventualno postojanje ezofagealnog **refluksa** , kao i tokove ranijih anestezija . Neki antidepresivi usporavaju pražnjenje želučastog sadržaja , te je u tom slučaju potrebno biti natašte najmanje 6 sati pre planirane procedure.

Premedikacija sedativima ili **opioidima** obično nije potrebna. Ne postoji jasno dokazana prednost za upotrebu propofola u EKT-u, jer oporavak nakon anestezije nije brži u poređenju sa barbituratima. Upotreba mišićnih relaksanata bitno umanjuje rizik nastanka fraktura. Najčešće se upotrebljava sukcinil-holin u dozi od 0,5 mg/kg. Nakon uvoda u anesteziju potrebno je pacijenta hiperventilirati preko kiseonične maske pre davanja EKT-a što smanjuje prag izbijanja i produbljuje njihovo trajanje , a takođe je u pripremi potrebno plasirati orofaringealni tubus ili gumeni blokator zagrizi između zuba. Tokom trajanja „napada“ nastavlja se sa manuelnom ventilacijom pacijenta preko kiseonične maske da bi se izbegla arterijska desaturacija do povratka spontanih respiratornih pokreta.

Neuromuskularni blok se može postići na više načina:

1. onemogućena sinteza acetil-holina (ACh) ili smanjena mobilizacija ili oslobađanje ACh ($< Ca^{++}$, $> Mg^{++}$, $< K^{+}$, toksina botulinusa ili nekih antibiotika)

2. onemogućavanje depolarizacije suparništvom sa ACh za receptore ili produženom depolarizacijom (klinički upotrebljivi blokatori deluju ovim mehanizmom).

Podela relaksanata :

1. relaksant dovodi do depolarizacije motorne ploče i održava je u stanju konstantne depolarizacije , čime onemogućava transmisiju nervnog impulsa depolarizujući blok

2. neuromuskularni blok se postiže tako što relaksant deluje kao suparnik ACh zauzimajući njegovo mesto (blokirajući mesto njegovog delovanja – “kompetitivni blok ” blok suparništva“) ili nedepolarizujući blok. **Sukcinil-holin** (leptosukcin) ScH je sintetsko **kvaternerno** amonijumsko jedinjenje, beli kristalni prah sa tačkom topljenja od 150 stepeni C, lako rastvorljiv u vodi i fiziološkom rastvoru. U organizmu deluje kao acetilholin i dovodi do depolarizujućeg bloka. Ima kratkotrajno dejstvo 4 do 6 minuta. Daje se najčešće intravenski u dozi od 1 do 1,5mg/kg TT za endotrahealnu intubaciju. Može se dati i intramuskularno u dozi od 2 mg/kg TT, kada dejstvo nastupa nešto sporije i traje duže. Može se davati i u infuziji kada je obavezan neprekidan monitoring neuromuskularne transmisije.

Komplikacije primene ScH

1. ScH poseduje **muskarinsko** delovanje pa može izazvati tešku bradikardiju (u dece već kod prvog ubrizgavanja a u odraslih kod drugog ili kod narednih

ubrizgavanja. Bradikardija se može sprečiti atropinom i stoga ga treba koristiti uvek kada se upotrebljava ScH.

2 .Bolovi u mišićima , naročito u ambulantnih pacijenata, mogu trajati do nekoliko časova ili dana. Bolovi su vrlo retki u dece do 10 godina i u starijih osoba.

3. Povećanje koncentracije K⁺ u plazmi u normalnih osoba, K⁺ u plazmi posle ubrizgavanja ScH > za 0,5 do 0,75mmol/l, a kod određenih pacijenata K⁺ može da se poveća na 12 do 14 mmol/l. Ovo je praćeno ozbiljnim poremećajem srčanog ritma i neretko akutnim zastojem srca.

4. ScH može dovesti do povećanja TA.

5. ScH može dovesti do povećanja intraokularnog i intragastričnog pritiska.

6. ScH može pokrenuti malignu hipertermiju.

7. Posle intravenskog davanja ScH dolazi do oslobađanja manje količine histamina - opisana anafilaksa (veoma retko).

Hidroliza ScH se odvija u dve faze :

I faza- - ScH pod dejstvom pseudoholin esterase se razlaže na Sc-monoholin (vrlo brzo)

II faza - Sc- monoholin pod dejstvom prave i pseudoholin esterase se razlaže na holin i sukcinilnu kiselinu (veoma sporo).

Sc-monoholin je u stanju da sam izazove depolarizujući blok , ali je njegova aktivnost 20 puta manja od aktivnosti ScH .Samo 2% ScH izlučuje se nepromenjeno urinom, ali ovaj procenat može biti veći u odsustvu enzimske hidrolize.

Smanjena aktivnost ili niska koncentracija plazma-holinesteraze nastaje kod:

- gladovanja, teških oboljenja jetre, HBI, posle hemodijalize, u kasnoj trudnoći i posle porođaja. Dugotrajna upotreba nekih lekova (Ekotiofat-kapi za oči kod glaucoma , neki citostatici, IMAO, anti-holinesterazni lekovi- neostigmin, izlaganje organofosforim jedinjenjima) dovodi do inhibicije normalnih vrednosti plazma-holinesteraze.U nekih pacijenata mogu postojati normalne vrednosti plazma-holinesteraze ali je njena aktivnost niska. Postoji nekoliko abnormalnih genotipova koji se u laboratoriji mogu razlikovati (dibukainski test idr). Najteža vari-

janta ovog defekta (homozigoti) sreće se u 1 : 3000-5000.

Uticaj starosti

Pri rođenju plazma-holinesteraza je niža za 50% nego kod odraslih, a onda raste aktivnost od 3 do 6 godine i ona je za 30% veća nego kod odraslih.Posle 5 godine opada i stabilizuje se na nivo odraslih u pubertetu. Značajno sniženje i do 30%u toku trudnoće i ranog **puerperiuma** se objašnjava hemodilucijom.

Zaključak

EKT u današnje vreme , uz odgovarajući anesteziološki postupak sigurna je i delotvorna metoda lečenja.Pacijenti se mogu žaliti na glavobolju , bolove u mišićima ili smušenost kroz 1 do 2 sata nakon EKT-a, dok poremećaji zapamćivanja mogu trajati nekoliko dana.

Literatura:

1. Naguib MN, Flood P, McArdle JJ. Advances in neurobiology of the neuromuscular junction. Anesthesiology 2002; 96:202-231.
2. Smith J. Total intravenous Anesthesia : Is it Worth the Cost?. CNS Drugs .2003; 17 (9):609-19
3. Krivoi II. Mechanisms of the non-neurotransmitter actions of acetylcholine in the neuromuscular apparatus. Neurosci Behav Physiol. 2002;32 (2): 149-56.
4. Eccles JC. The synapse: from electrical to chemical transmission. Annu Rev Neurosci, 1982;5:325-39.
5. Karz B. Quantal mechanism of neural transmitter release. Science.1971;173(992):123-6.
6. Kadoh A, Katagi H, Takazawa T, Antidepressant treatment for chronic depressed patients should not be discontinued prior to anesthesia.Can J Anesth2002; 49:132-136.
7. Conca A,Germann R, Konig P.Etomidate vs.Thiopentone in electroconvulsive therapy. Pharmacopsychiatry 2003; 36:94-97.

AIXMED

Beograd, Aleksandra Stambolickog 27, tel: 011/2667 368, fax: 011/3067 774, @: aixmed@EUnat.rs

LMA za jednokratnu upotrebu

LMA za višekratnu upotrebu



LMA Supreme™

Prva i jedina LMA za jednokratnu upotrebu sa odvojenim tubusom za drenažu sekusa.



LMA Unique™

PLUS PACK
Idealan izbor za urgentne centre i teška hitna pomoć kao sredstvo za reanimaciju kada je intubacija nemoguća.



LMA Fastrach™

Sredstvo izbora za situaciju "nemoguća intubacija - nemoguća ventilacija".



LMA Rescue™

Airway Management System
Jednostavan i ekonomični komplet za primenu u hitnim situacijama sadrži:
LMA Fastrach Single Use™,
LMA Unique™ Plus pack i
LMA Fastrach™ ET Tube Single Use.

LMA™
Better by Design



LMA Classic™

Originalna, opšta upotreba za obezbeđivanje disajnog puta za rutinske anestezije.



LMA ProSeal™

Univerzalni oblik opšteg tipa LMA za rutinske anestezije. Dizajnirana da obezbedi gasflesu drenažu sa odvojenim tubusom za respiratorni i digestivni trakt, poboljšano zaptivanje.



LMA Fastrach™

Dizajnirana za upotrebu kod predviđenog ili nepredviđenog teškog disajnog puta. Može se koristiti samostalno ili da olakša intubaciju tokom "na stopa".



LMA Flexible™

Flexibilna LMA dizajnirana za upotrebu u hiruriji glave, vrata i mase duple.



LMA CTrach™

Danas je obezbeđivanje teškog disajnog puta sigurnije, brže i uspešnije nego ikada ranije.

LEČENJE I NEGA KRITIČNO OBOLELIH GOJAZNIH PACIJENATA

Ana Popadić, Ivo Udovičić, Goran Rondović

Klinika za anesteziologiju i intenzivnu terapiju, Vojnomedicinska akademija, Beograd, Srbija

Sažetak

Gojaznost predstavlja globalni zdravstveni problem. Sa porastom prevalencije gojaznosti u opštoj populaciji, broj kritično obolelih gojaznih pacijenata se povećava, pa danas gotovo svaki treći kritično oboleli pripada populaciji gojaznih. Uticaj gojaznosti na tok kritične bolesti može varirati u zavisnosti od vrste primarnog oboljenja, stepena i tipa gojaznosti i gojaznošću uzrokovanih propratnih oboljenja. Na osnovu patofizioloških poremećaja gojaznih osoba, posebno respiratornih i kardiovaskularnih, one mogu biti u većem riziku od nastanka plućnih, kardiovaskularnih i renalnih komplikacija tokom lečenja u odeljenjima za intenzivno lečenje. Uspostavljanje disajnog puta, vaskularni pristup, hemodinamski monitoring, mehanička ventilacija, doziranje lekova i sestrinska nega takođe mogu predstavljati izazov u svakodnevnoj praksi.

Ključne reči: gojaznost, kritično oboleli, intenzivno lečenje

Abstract

Obesity is a global health problem. With increasing prevalence of obesity in the general population, the number of critically ill obese patients is also increasing, so today almost one of three critically ill patients belongs to the population of obese. The impact of obesity on the actual critical illness can vary depending on the actual disease, the degree and type of obesity and obesity caused co-morbidities. Due to the pathophysiology processes in obese people, especially respiratory and the cardiovascular, they may be at higher risk of pulmonary, cardiovascular and renal complications during treatment in the intensive care units. Airway management, vascular access, hemodynamic monitoring, mechanical ventilation, drug dosing and nursing care may also pose a challenge in everyday practice.

Key words: obesity, critically ill, intensive care

Uvod

Gojaznost (lat. *Obesitas*), jedan od vodećih zdravstvenih problema današnjice, predstavlja stanje preterane akumulacije masti u organizmu koje vodi ka povećanju telesne mase i koja može ugroziti zdravlje.ⁱ

Precizno merenje procentualnog udela masti u organizmu nije lako sprovesti.

Ono zahteva sofisticirane metode, kao što su kompjuterizovana tomografija ili magnetna rezonanca. Korisna procena se donekle može postići merenjem težine za određenu visinu, poredeći je sa idealnom telesnom masom. Koncept idealne telesne mase potiče iz studija koje su sprovele kompanije za životno osiguranje. Oni su opisivali telesnu težinu povezanu sa najmanjim mortalitetom za određenu telesnu

visinu i pol. Za opšte kliničke potrebe idealna telesna težina (Ideal Body Weight – IBW) može se izračunati sledećom formulom:

$$IBW (kg) = \text{telesna visina (cm)} - x \quad (x = 100 \text{ za muškarce, } x = 105 \text{ za žene})$$

Indeks telesne mase (Body Mass Index – BMI) je gruba metoda kojom se meri odnos između telesne mase i visine. Ova metoda je opšteprihvaćena u kliničkim i epidemiološkim studijama.

$$BMI (kg/m^2) = \text{telesna masa (kg)} / \text{telesna visina (m)}^2$$

Opšte prihvaćena klasifikacija uhranjenosti prema BMI definiše se kao:

BMI < 18,5 kg/m² - pothranjenost

BMI 18,5–24,99 kg/m² - normalna uhranjenost

BMI 25 – 29,99 kg/m² - prekomerna uhranjenost ili predgojaznost

BMI >30 –39,99 kg/m² - gojaznost

BMI > 40 - morbidna gojaznost

BMI je praktična metoda za procenu gojaznosti koja ipak ima svoja ograničenja. Izrazito mišićava osoba se, na primer, može isključivo izračunavanjem BMI svrstati u kategoriju gojaznih. Upravo zato što BMI ima svoja ograničenja, preporučuje se procena distribucije masnog tkiva, kao jedan od pokazatelja tipa gojaznosti i njegove povezanosti sa učestalom pojavom nekih oboljenja. Osnovni tipovi gojaznosti, prema distribuciji masnog tkiva, su androidni (centralni, abdominalni, visceralni) sa predominantnim nakupljanjem masnog tkiva u gornjem i centralnom delu tela ili ginoidni (periferni, ženski) kada se masno tkivo predominantno nakuplja oko kukova i butina (2). Mernje obima struka i odnosa obima struka i kukova trebalo bi koristiti, uz merenje BMI, kao pomoćne metode u određivanju stepena i tipa gojaznosti. Odnos obima struka i kukova veći od 1 kod muškaraca ili veći od 0,85 kod žena, ukazuju na centralni tip gojaznosti, kada se radi o evropskom stanovništvu. (3)

Epidemiologija

Prema podacima Svetske zdravstvene organizacije, više od 600 miliona ljudi (13%) na planeti pripada kategoriji gojaznih. Prevalenca gojaznosti, na svetskom nivou, dvostruko je uvećana u periodu od 1980 – 2014. godine. (1) Može se reći da je gojaznost poprimila karakteristike globalne pandemije. (4) U Srbiji je, prema izveštaju Instituta za javno zdravlje iz 2013. godine bilo 40,4 % normalno uhranjenog stanovništva, dok je više od polovine (56,3%) bilo prekomerno uhranjeno, odnosno predgojazno (35,1%) i gojazno (21,2%). (5)

Epidemija gojaznosti u opštoj populaciji neminovno dovodi do procentualnog povećanja gojaznih pacijenata koji bivaju primljeni i lečeni u odeljenjima za intenzivno lečenje (OIL). Američke statistike pokazuju da je gotovo svaki treći kritično oboleli pacijent gojazan. (6)

Gojaznost kritično obolelih pacijenata udružena je sa povećanim mortalitetom i morbiditetom, produženom mehaničkom ventilacijom kao i dužinom lečenja u OIL (7). Međutim, rezultati studija iz poslednje decenije ukazuju na postojanje manje smrtnosti gojaznih pacijenata u OIL, uključujući i hirurške OIL (8). Ova pojava se prepoznaje kao “paradoks gojaznosti” (9) i još uvek je predmet interesovanja istraživača.

Etiologija gojaznosti

Gojaznost je kompleksna i multifaktorijska bolest. (10) Pojednostavljeno rečeno, ona se javlja kada neto energetski unos premašuje neto energetske potrošnje tokom dužeg vremenskog perioda. Uprkos tome, nekada nije jednostavno objasniti zašto se gojaznost javlja kod nekih osoba, a kod nekih ne. Ovaj fenomen se donekle može objasniti sledećim faktorima:

– **Genetska predispozicija:** više od dve decenije istraživanja na polju genetskih uticaja na gojaznost,

donekle su uspela da objasne povezanost genoma i gojaznosti (11). Ipak, još uvek ne postoje jasni rezultati istraživanja koji bi u potpunosti objasnili egzaktnu povezanost genoma i telesne mase, kao i njenog održavanja.

–**Socio- ekonomski faktori:** Nekoliko studija pokazalo je da postoji negativna veza između socioekonomskog statusa i prevalence gojaznosti u razvijenim državama, dok su podaci za zemlje u razvoju još uvek nekonzistentni (12)(13)

–**Etnička pripadnost:** U Sjedinjenim Američkim Državama postoji jasna razlika u prevalenci gojaznosti u različitim etničkim grupama. Kod afroamerikanaca i Meksikanaca postoji značajno veći rizik razvoja gojaznosti u odnosu na azijske i amerikanke bele puti. Azijski imigranti u velikoj Britaniji imaju u većem procentu centralnu distribuciju masti, što je udruženo sa povećanim rizikom od nastanka dijabetesa melitusa i koronarne arterijske bolesti.(14)(15)

–**Medicinska stanja:** Endokriološka oboljenja, kao što su Kušingova

–bolest i hipotireoidizam udružena su sa predispozicijom za nastanak gojaznosti. Na sličan način određeni lekovi, kao što su kortikosteroidi, antidepresivi i antihistami

minici, mogu dovesti do povećanja telesne mase.

Energetski balans: Ukupan broj unetih kalorija, pogotovo kalorija unetih masnom hranom, osnovni jeuslov razvoja gojaznosti. Dnevni eksces u bilansu kalorija ne mora biti veliki da bi kao rezultat nastala gojaznost. Naime, dnevni eksces od 30 – 40 kcal, što je približna energetska vrednost polovine malog sendviča, rezultiraće povećanjem telesne mase za 20 kg u roku od 10 godina.¹⁴ Konzumacija alkohola takođe ima značajnu ulogu, posebno u distribuciji masnog tkiva, doprinoseći centralnoj distribuciji masti i razvoju androidne gojaznosti.

Bolesti udružene sa gojaznošću

Gojaznost dovodi do poremećaja pojedinih fizioloških procesa, što vodi razvoju bolesti tipično udruženih sa gojaznošću.(16)(17)

Najčešća medicinska stanja koja su prisutna kod gojaznih pacijenata prikazana su u tabeli 1. Neka od ovih stanja, kao što su ishemijska bolest srca, šećerna bolest, prisutna kod androidnog tipa gojaznih osoba.(18)

Tabela 1.

Medicinska stanja koja su često udružena sa gojaznošću

Kategorija oboljenja	Oboljenje
Kardiovaskularna oboljenja	Kardiomiopatija, hipertenzija, ishemijska bolest srca, kor pulmonale, cerebrovaskularne bolesti, periferne vaskularne bolesti, varikoziteti vena, duboka venska tromboza, plućna tromboembolija
Respiratorna oboljenja	Opstruktivna sleep apnea, restriktivne bolesti pluća, hronična hipoventilacija povezana sa gojaznošću, astma
Gastrointestinalna oboljenja	Kalkuloza žučne kese i žučnih puteva, hijatus hernija, ingvinalna hernija, umbilikalna hernija
Endokrina oboljenja	Šećerna bolest tip 2, Kušingova bolest, sterilitet, hipotireoidizam
Genitourinarna oboljenja	Menstrualni poremećaji, renalna kalkuloza, urinarna inkontinencija kod žena
Maligna oboljenja	Karcinomi dojke, pankreasa, žučne kese, jednjaka, debelog creva, rektuma, prostate, jajnika, grlića materice i endometrija
Muskuloskeletna oboljenja	Osteoartritis, oboljenja lumbalne kičme

Kritično oboleli gojazni pacijenti predstavljaju izazov za tim lekara i medicinskih tehničara u OIL u gotovo svim segmentima nege i lečenja.

skih tehničara u OIL u gotovo svim segmentima nege i lečenja.

Klinički pregled

Auskultacija pluća je otežana, često se disajni šum gotovo ne čuje. Auskultatorni pregled srca donosi sličan problem jer srčani tonovi mogu biti veoma tihi. Palpacija perifernih krvnih sudova je takođe otežana i često neformativna. Duboka palpacija trbuha je nekada gotovo nemoguća.

Plasiranje intravaskularnih katetera

Zbog prisustva debljeg sloja potkožnog masnog tkiva nekada je teško pronaći anatomske tačke za orijentaciju i postaviti iglu u adekvatan položaj za punktiranje. U nekim slučajevima je neophodna asistencija druge osobe da bi se koža mogla adekvatno očistiti i pripremiti za punkciju. Sa ovim problemom se možemo suočiti bez obzira na to da li plasiramo perifernu vensku kanilu, centralni venski kateter ili arterijsku kanilu. Plasiranje vaskularnih katetera uz pomoć ultrazvuka značajno olakšava ovu proceduru.

Obezbeđenje disajnog puta

Kratak vrat, ograničena ekstenzija vrata, mala usta, ekscisivno meko tkivo u orofarinksu igrudni koš koji ometa postupak laringoskopije vrlo su često prisutni kod gojaznih pacijenata. Ostala stanja u kojima možemo očekivati otežanu trahealnu intubaciju (veliki jezik, prominentni zubi, kratka sterno mentalna distanca, anteriorni larinks, resecivna mandibula, visok Mallampatii skor itd.), takođe mogu biti prisutni kod ovih pacijenata. Važno je napraviti adekvatan pregled i procenu disajnog puta pre trahealne intubacije i obezbediti adekvatnu pomoć i opremu za otežan disajni put. Rezultati studije u kojoj je ispitivana trahealna intubacija morbidno gojaznih elektivnih hirurških pacijenata pokazali su da se kod većine gojaznih pacijenata

trahealna intubacija može izvesti primenom standardnih tehnika, direktnom larin goskopijom. BMI ili telesna masa nisu bili prediktivni pokazatelji za otežanu intubaciju. Sa druge strane, Mallampatti skor ≥ 3 i cirkumferencija vrata jesu.(19)

Preporučeno pozicioniranje gojaznog pacijenta u cilju adekvatne preoksigenacije, ventilacije maskom, laringoskopije i trahealne intubacije podrazumeva anti Trendelenburgov položaj od oko 25% u cilju pomeranja težine grudnog koša, dojki i truhagravitacijom na dole, što povećava ekskuzije dijafragme.(20) Ovaj položaj se može postići i postavljanjem nekoliko savijenih pokrivača ispod gornjeg dela tela, ramena i glave. Položaj glave kojim se u istu horizontalnu ravan postavljaju jugularna jama i spoljašnji ušni kanal dodatno olakšavaju ventilaciju i vizuelizaciju glasnih žica tokom direktne laringoskopije.

Oprema sa otežano uspostavljanje disajnog puta morala bi biti dostupna u OIL, da bi se u slučaju otežanog uspostavljanja disajnog puta moglo postupiti prema protokolima.(21)

Traheostomske procedure

Gojaznim pacijentima se mogu izvoditi kako hirurška tako i perkutana traheostomija(22). Oba postupka su ipak povezana sa izvesnim poteškoćama. Standardni traheostomski tubusi mogu biti neadekvatni, odnosno kratki za gojazne pacijente, obzirom na veću distancu između kože i traheje. Tubus je teže plasirati i istovremeno su češći dislokacija i malpozicija tubusa. Nekada su potrebne improvizacije sa opremom ili u hirurškoj tehnici (npr. hirurško uklanjanje pretrahealnog masnog tkiva pre izvođenja traheostomije).¹⁹

Respiratorna funkcija

Mehanika disanja je poremećena kod gojaznih pacijenata zbog pritiska intraabdo

minalnih struktura na dijafragmu, težine zida grudnog koša i grudi, što smanjuje ekspanziju pluća, kao i zbog deponovanja masti u dijafragmi i međurebarnim mišićima. Smanjeni su ekspiratorni rezervni volumen (ERV), funkcionalni rezidualni kapacitet (FRC), forsirani vitalni kapacitet u prvoj sekundi (FEV1) i njegov odnos sa forsiranim vitalnim kapacitetom (FVC). Ove promene su posebno izražene kod postojanja centralne gojaznosti. Posledica smanjenog ERV je zatvaranje malih disajnih puteva.(23) Zbog smanjene komplijanse grudnog koša, povećanog otpora u disajnim putevima i istovremene povećane potrebe za eliminacijom ugljen dioksida kao proizvoda ubrzanog metabolizma u masnom tkivu, disajni rad je značajno povećan. (24)(25) Posledice svih prethodno opisanih poremećaja su povećan alveolarno - arterijski gradijent, nastajanje atelektaza, posledični povećan intrapulmonalni šant, hronična hipoksija i brza desaturacija.

Klinička prezentacija hronične hipoveetilacije i hipoksije (u odsustvu plućnih ili neuromišićnih oboljenja), opisuje se kao *sindrom hipoveetilacije gojaznih* (Obesity hypoventilation syndrome – OHS). Dijagnostički kriterijumi za OHS obuhvataju: BMI > 30 kg/m², hiperkapnija (PaCO₂ > 45 mmHg) u budnom stanju, odsustvo drugih uzroka hipoveetilacije, dijagnoza noćne hipoveetilacije i hiperkapnije sa ili bez epizoda obstruktivne sleep apnee.(26) *Opstruktivna sleep apnea* (OSA) se javlja zbog kolapsa faringealnih struktura tokom spavanja. Razlog opstrukcije su najčešće ekscesivna količina mekog tkiva u samom farinksu kod gojaznih osoba i loš tonus mišića koji farinks u normalnim uslovima drže otvorenim. Tonus ovih mišića je dodatno smanjen tokom spavanja, što značajno sužava disajni puti uzrokuje zvuk hrkanja tokom spavanja. Nekadaje disajni put potuno opstruiran, što dovodi do prekida u disanju. Povećani napor pri pokušaju udisaja zbog hipoksije i hiperkapnije dovodi do buđenja, kada se

tonus mišića vraća i disajni put otvara. Ovaj ciklus se ponavlja višestruko tokom noći.(27)

Dugotrajno postojanje OHS i OSA dovode do plućne i sistemske vazokonstrikcije, sekundarne policitemije i udruženo je sa povećanom mogućnošću nastanka ishemijske koronarne bolesti, dok hipoksična plućna vazokonstrikcija vodi ka slabosti desnog srca.(28)

Mehanička ventilacija

Gojazni pacijent kome je neophodna respiratorna potpora trebao bi da bude pozicioniran u polusedeći položaj u krevetu, jer mu se tako podspešuje mehanika disanja i istovremeno smanjuje rizik od regurgitacije želudačnog sadržaja i nastanka aspiracione pneumonije.

Parametre mehaničke ventilacije bi trebalo podesiti prema idealnoj telesnoj težini, a kasnije ih podešavati shodno izmerenim vrednostima gasova u arterijskoj krvi. Predloženi početni tidal volumen je 5-7 ml/kg IBW. Ova preporuka se bazira na proceni da bi u uslovima smanjenih plućnih volumena i povećanog otpora u disajnim putevima, vrednosti tidal volumena proračunatog na osnovu aktuelne telesne mase mogli da dovedu do ekstremno velikog pritiska u disajnim putevima, preterane ekstenzije alveola i barotraume pluća. Rekrutment manevri praćeni primenom pažljivo titriranih vrednosti PEEP-a, uz praćenje njegovog uticaja na cardiac output, preporučeni su kod gojaznih pacijenata. Vrednosti PEEP- a od 7-10 cmH₂O su uobičajene, mada neki autori sugerišu primenu većih vrednosti.(29) Odvajanje gojaznih osoba od mehaničke ventilacije i ekstubacija, mogu predstavljati izazov za kliničare, zbog svih ranije navedenih respiratornih poremećaja koji postoje kod ove populacije pacijenata. Ektubaciju bi trebalo izvesti po postizanju zadovoljavajućih vrednosti gasova u arterijskoj krvi i kada je pacijent potuno budan i sarađuje. Uvek treba imati na umu

da se kod gojaznih pacijenata često može očekivati i hitna reintubacija, te je neophodno u vreme ekstubacije imati na raspolaganju neophodnu opremu i pomoć, pogotovo ako je inicijalna intubacija traheje bila otežana. Nakon ekstubacije, u najvećem broju slučajeva barem u jednom vremenskom periodu, potrebna je respiratorna potpora neinvanzivnom ventilacijom, kao i sprovođenje respiratorne fizikalne potpore incentivnom spirometrijom.

Neinvanzivna ventilacija, Bilevel Positive Airway Pressure (BIPAP) ili Continuous Positive Airway Pressure (CPAP) modusom veoma je korisna kod gojaznih pacijenata sa OHS i OSA, pogotovo tokom noći, jer pozitivan pritisak u disajnim putevima drži gornje disajne puteve otvorenim i istovremeno poboljšava oksigenaciju.

Kardiovaskularni system

Neinvanzivno merenje krvnog pritiska kod gojaznih pacijenata često predstavlja problem, zbog loše palpacije perifernih krvnih sudova i neadekvatnog obima manžetne za merenje pritiska. Upotreba auskultatorne metode kao i automatskog merenja krvnog pritiska kod gojaznih pacijenata, vrlo često će pokazati vrednosti koje su manje od aktuelnih.(30)(31) Primena manžetni za merenje arterijskog pritiska čija je širina 40 – 50 % obima nadlaktice i unutrašnjeg uloška za naduvavanje koji je dužine najmanje 80% od obima nadlaktice obezbediće adekvatno merenje.(32)

EKG elektrode se češće pomeraju, dok se u elektrokardiogramu uočava snižena voltaža, sniženje T talasa u inferiornim i lateralnim odvodima, promene u morfologiji P talasa, znaci hipertrofije leve komore i produženje QT intervala. Ove abnormalnosti udružene su najčešće sa promenama u morfologiji srca često su reverzibilne nakon gubitka telesne mase.(33)

Neadekvatan odnos dopreme i potreba za kiseonikom kod gojazne osobe, zbog povećanih potreba za kiseonikom usled postojanja velike količine masnog tkiva, održava organizam u stalnom hiperdinamskom stanju. Posle dužeg vremenskog

perioda dolazi do poremećaja funkcije srca u smislu hipertrofije leve komore, smanjene kontraktilnosti leve komore, smanjenja srčane komplijanse i ventrikularne distolne disfunkcije.(34)

Vrednosti centralnog venskog pritiska i plućnog kapilarnog wedge pritiska, u cilju optimizacije nadoknade intravaskularnog volumena, imaju malu senzitivnost i specifičnost kod gojaznih pacijenata zbog postojećih povećanih vrednosti pritiska punjenja srca, koji se u ležećem položaju dodatno povećavaju. Intravaskularna nadoknada volumena vođena funkcionalnim parametrima (varijacije udarnog volumena i pulsog pritiska) daje povoljnije rezultate po nekim autorima.(35)

Doziranje lekova

Farmakokinetika lekova kod gojaznih pacijenata je donekle izmenjena usled povećanog volumena distribucije za lipofilne agense, smanjenog hepatičnog klirensa i povećanog klirensa za hidrofilne agense.

U nedostatku zvaničnih preporuka i većeg broja studija koje su istraživale doziranje lekova kod gojaznih pacijenata, možda je najbolja preporuka svakom kliničaru da se osloni na podatke o farmakokinetskim svojstvima agensa koji primenjuje, uz kliničku procenu njegove efikasnosti ukoliko ne postoji mogućnost provere koncentracije agensa u krvi.

Tromboembolijska profilaksa

Obzirom na često postojanje policitemije, plućne hipertenzije i venske staze uz smanjenu mobilnost gojaznih pacijenata, oni su u znatno većem riziku od razvoja

tromboembolijskih komplikacija tokom lečenja u OIL(36)(37). Mehanička kompresivna profilaksa, rana mobilizacija i farmakološka profilaksa su standardne mere prevencije. Subkutana primena heparina 5000 IU tri puta dnevno ili enoksiparina 0.5 mg /kg(računato na aktuelnu telesnu težinu) jednom dnevno, uz kontrolu nivoa anti Xa faktora preporučuju Rondina i sar. (37)

Nutritivna potpora

Značaj rane nutritivne potpore kod pacijenata normalne telesne mase i gojaznih u OIL se ne razlikuje.(38) Procena nutritivnog statusa, metaboličkog statusa i uvid u aktuelno kao i propratna oboljenja neophodni su u cilju pripreme adekvatnog nutritivnog plana. Enteralnu ishranu treba favorizovati ukoliko ne postoje kontraindikacije za njenu primenu. Prema vodičima Američkog udruženja za parenteralnu i enteralnu ishranu iz 2016. godine, u cilju izračunavanja energetske potrebe(ukoliko ne postoji mogućnost merenja bazalnih energetske potrebe indirektnom kalorimetrijom)preporučuje se primena 11 - 14 kcal/kg/dan(za BMI 30 – 50 kg/m²)i proteina u dozi od 2 g/kg/dan (BMI 30 – 40 kg/m²) računato prema idealnoj telesnoj masi. Dnevni unos bi trebao da bude između 65 - 70 % izračunatih potreba. Ovakav režim bi trebalo da dovede do postepenog gubitka težine, uz istovremeno održavanje mišićne mase.(39)

Nega gojaznih pacijenata u OIL

Adekvatnu negu gojaznih kritično obolelih pacijenata nije lako sprovesti ukoliko OIL nije opremljena sredstvima koja olakšavaju postupke nege i čine ih sigurnim za pacijente i osoblje. Neophodno je poznavati limit težine koji podnosi svaki deo opreme koja se primenjuje. Antidekubitalni dušeci punjeni vazduhom ili tečnošću smanjuju mogućnost nastanka dekubitalnih rana,

obzirom da su gojazni pacijenti višestruko podložniji njihovom nastanku zbog loše prokrvljenosti perifernih tkiva i velikog pritiska koji trpe tačke oslonca. Polusedeći položaj je najpogodniji za ove pacijente. Ukoliko pacijent ne sarađuje ili je sediran, promena njegove pozicije u krevetu je eska i može dovesti do povrede osoblja. Prema američkim standardima, jedan medicinski tehničar samostalno ne bi trebao da podiže ništa teže od 16 kg (40). Ukoliko ne postoji pomoćna oprema za podizanje pacijenta, treba angažovati više članova tima, da bi se izbegle povrede. U cilju bezbednosti pacijenta i osoblja neophodna je uvežbanost tehnike promene položaja pacijenta.Obzirom na sklonost ka razvoju gljivičnih infekcija na delovima tela koji su u stalnom kontaktu, preporučuje se razdvajanje kontaktnih površina mekim tkaninama koje upijaju vlagu, kao i primena antigljivičnih krema.(41)

Zaključak

Lečenje i nega gojaznih kritično obolelih pacijenata predstavlja izazov za tim OIL. Poznavanje patofizioloških procesa u gojaznosti, najčešćih propratnih bolesti, mogućih komplikacija tokom lečenja, farmakokinetike agenasa koje primenjujemo, mogućnosti i ograničenja opreme kojom raspolažemo, uz adekvatnu obuku za sve manuelne tehnike koje se koriste tokom nege i lečenja jesu uslovi neophodni za povoljan ishod lečenja.

Literatura

1. World Health Organization. Obesity: preventing and managing the global epidemic. Report of a WHO consultation. World Health Organ Tech Rep Ser. 2000;894:1-253.
2. Ashwell M, Chinn S, Stalley S, Garrow JS. Female fat distribution—a simple classification based on two circumfer

- ence measurements. *Int J Obes* 1982; 6: 143–52
3. Björntorp P. Visceral obesity: a “civilization syndrome”. *Obes Res* 1993; 1: 206–22
4. Ng M, Fleming T, Robinson M, et al. Global, regional, and national prevalence of overweight and obesity in children and adults during 1980–2013: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2013. *Lancet*. 2014;384(9945):766–781.
5. Boričić K. i dr. Rezultati istraživanja zdravlja stanovništva Srbije: 2013. godina. Beograd : Institut za javno zdravlje Srbije "Dr Milan Jovanović Batut", 2014; 46.
6. Oliveros H, Villamor E. Obesity and mortality in critically ill adults: a systematic review and meta-analysis. *Obesity* 2008;16:515–21.
7. Akinnusi ME, Pineda LA, El Solh AA. Effect of obesity on intensive care morbidity and mortality: a meta-analysis. *Crit Care Med* 2008;36:151–8.
8. Hutagalung, Robert, et al. "The obesity paradox in surgical intensive care unit patients." *Intensive care medicine* 37.11 (2011): 1793–1799.
9. Amundson, Dennis E., Svetolik Djurkovic, and Gregory N. Matwiyoff. "The obesity paradox." *Critical care clinics* 26.4 (2010): 583–596.
10. Stunkard AJ. Current views on obesity. *Am J Med* 1996; 100: 230–5
11. Choquet H, Meyre D. Genetics of Obesity: What have we Learned? *Current Genomics*. 2011;12(3):169–179.
12. Ogden CL, Lamb MM, Carroll MD, Flegal KM. Obesity and socioeconomic status in adults: United States 1988–1994 and 2005–2008. NCHS data brief no 50. Hyattsville, MD: National Center for Health Statistics. 2010.
13. Sobal, Jeffery; Stunkard, Albert J. Socioeconomic status and obesity: A review of the literature. *Psychological Bulletin*, Vol 105(2), Mar 1989, 260–275.
14. Björntorp P. Obesity. *Lancet* 1997; 350: 423–6
15. Stevens J. Ethnic-specific cutpoints for obesity vs country-specific guidelines for action. *Int J Obes Relat Metab Disord*. 2003;27:287–8.
16. Guh, D.P., Zhang, W., Bansback, N. et al. *BMC Public Health* (2009) 9: 88.
17. J. P. Adams, P. G. Murphy; Obesity in anaesthesia and intensive care. *Br J Anaesth* 2000; 85 (1): 91–108.
18. Hsieh SD, Yoshinaga H. Abdominal fat distribution and coronary heart disease risk factors in men—waist/height ratio as a simple and useful predictor. *Int J Obes Relat Metab Disord* 1995;19: 585–9
19. Brodsky JB, Lemmens HJ, Brock-Utne JG, Vierra M, Saidman L. Morbid obesity and tracheal intubation. *Anesth Analg*. 2002;94:732–6.
20. Murphy C, Wong DT. Airway management and oxygenation in obese patients. *Can J Anaesth*. 2012;60(9):929–945.
21. Frek C. et al. Difficult Airway Society 2015 guidelines for management of unanticipated difficult intubation in adults. *Br J Anaesth* 2015; 115 (6): 827–848.
22. Mallick A, Bodenham A, Waldmann C, et al. Evaluation of a new tracheostomy technique for morbidly obese patients on an intensive care unit. *Crit Care* 2010;14(Suppl. 1):P219
23. Salome CM, King GG, Berend N. Physiology of obesity and effects on lung function. *J Appl Physiol*. 2010;108:206–11.
24. Pelosi P, Croci M, Ravagnan I, Vicardi P, Gattinoni L. Total respiratory system, lung, and chest wall mechanics in sedated-paralyzed postoperative morbidly obese patients. *Chest*. 1996;109:144–51.
25. Koenig SM. Pulmonary complications of obesity. *Am J Med Sci*. 2001;321:249–79.

26. Olson AL, Zwillich C. The obesity hypoventilation syndrome. *Am J Med.* 2005;118:948–56.
27. Douglas N, Polo O. Pathogenesis of obstructive sleep apnoea/ hypopnoea syndrome. *Lancet* 1994; 344: 653–5
28. Kessler R, Chaouat A, Weitzenblum E, et al. Pulmonary hypertension in the obstructive sleep apnea syndrome: prevalence, cause and therapeutic consequences. *Eur Respir J* 1996; 9: 787–94
29. Pirrone M. et al. Recruitment Maneuvers and Positive End-Expiratory Pressure Titration in Morbidly Obese ICU Patients. *Crit Care Med.* 2016 Feb;44(2):300-7.
30. Araghi A, et al. Arterial blood pressure monitoring in overweight critically ill patients: invasive or noninvasive? *Crit Care.* 2006; 10:R64.
31. Bur A, et al. Factors influencing the accuracy of oscillometric blood pressure measurement in critically ill patients. *Crit Care Med.* 2003; 31:793–799.
32. Jamadarkhana S, Mallick A, Bodenham AR. Intensive care management of morbidly obese patients *Contin Educ Anaesth Crit Care Pain* (2014) 14 (2): 73-78
33. Fraley MA, et al. Obesity and the electrocardiogram. *Obes Rev.* 2005; 6:275-281.
34. El-Solh A, Sikka P, Bozkanat E, Jaafar W, Davies J. Morbid obesity in the medical ICU. *Chest.* 2001;120:1989–97
35. Jain AK, Dutta A. Stroke volume variation as a guide to fluid administration in morbidly obese patients undergoing laparoscopic surgery. *Obes Surg* 2010;20:709-15
36. Clagett GP, Anderson FA, Jr, Geerts W. Prevention of venous thromboembolism. *Chest.* 1998;114:531
37. Rondina MT, Michelle Wheeler M, Rodgers GM, Draper L, Pendleton RC. Weight-based dosing of enoxaparin for VTE prophylaxis in morbidly obese, medically ill patients. *Thromb Res* 2010;125:220-3.
38. McClave SA, Heyland DK. The physiologic response and associated clinical benefits from provision of early enteral nutrition. *Nutr Clin Pract.* 2009;24(3):305-315.
39. McClave et al. Guidelines for the Provision and Assessment of Nutrition Support Therapy in the Adult Critically Ill Patient: Society of Critical Care Medicine (SCCM) and American Society for Parenteral and Enteral Nutrition (A.S.P.E.N.). *JPEN* 2016;40(2): 159–211
40. Waters T. When is it safe to manually lift a patient? *Am J Nurs.* 2007;107(8): 53-58
41. Lowe JR. Skin integrity in critically ill obese patients. *Crit Care Nurs Clin North Am* 2009;21:311-312.



BIOTEC International d.o.o.

11000 Beograd

Resavska 2

tel/fax +381 11 3341-350, 3340-148, 3231-561

e-mail: biotec@eunet.rs

Firma BIOTEC International je dugogodišnji generalni i ekskluzivni zastupnik kompanije Teleflex Medical RUSCH, koja predstavlja sinonim najvišeg kvaliteta u oblasti anestezije, urologije i hirurgije. Dugogodišnji smo partner svih većih medicinskih centara na prostoru Srbije i Crne Gore i sa timom naših saradnika prisutni na gotovo svim edukacijama stručnjaka u domenu anestezije. (kongresima i seminarima.).

Program kompanije Teleflex Medical RUSCH podrazumeva potrošni materijal najvišeg standarda, čime se obezbeđuje visok stepen zaštite pacijenata i pri najsloženijim operativnim procedurama.

Proizvodni program RUSCH-a sa originalnom produkcijom obuhvata u domenu anestezije najkvalitetnije tubuse na svetu sa malim pritiskom u kafu i velikim volumenom čime se obezbeđuje najviši komfor pacijenta i pri dužim intubacijama, tubuse za produžene intubacije (inovativnog uvećanog kafa koji se pri disanju pomera sa toraksom pacijenta), armirani tubusi različitog materijala (PVC, Silikolatex) , visoko prefinjeni 100% silikonski tubusi (jednokratni i armirani), program različitih maski, trahealnih kanila (PVC i armiranih) airweja, styleta, čitavu paletu creva za anesteziju i filtera (najvišeg HEPA Class 13 standarda) , kao i najsavremenije, inovativne proizvode, koji omogućavaju veći stepen komfora pacijenta, kao što je kapa za neinvazivnu mehaničku ventilaciju (4VENT CPAP)- proizvod sa kojim smo jedinstveni na tržištu.

Sa programom urologije koji obuhvata visoko kvalitetne različite katetere, sonde, stentove, punkcione setova, setove za percutanu nefrostomiju, takodje smo prepoznatljivi na tržištu. Program za oblast hirurgije uključuje različite vrste drenaža, sondi, ali i proizvode za vaskularne procedure.

Srdačan pozdrav,

BIOTEC International

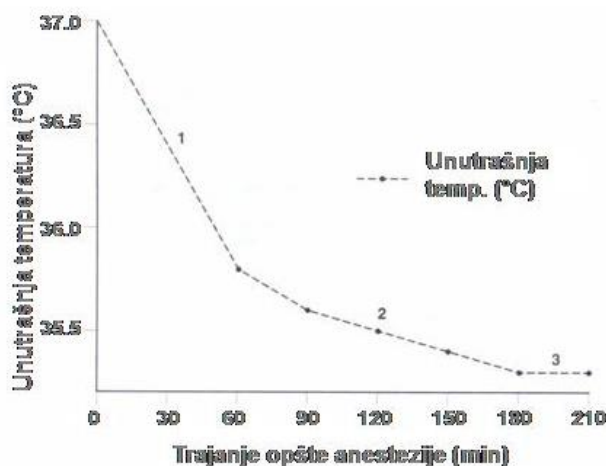
PERIOPERATIVNA HIPOTERMIJA

Snježana Zeba

Klinika za anesteziologiju i intenzivnu terapiju, Vojnomedicinska akademija, Beograd

Nenamerna intraoperativna hipotermija je ubičajni termalni poremećaj za vreme opšte anestezije. Kombinacija poremećaja termoregulacije izazvanog anesteticiima (koji oštećuju centralnu termoregulatornu kontrolu) i niske temperature u operacionoj sali dovodi do hipotermije (1). Intraoperativna hipotermija za vreme opšte anestezije razvija se po specifičnom šablonu i događa se u tri faze:

prva - početno naglo smanjenje srednje temperature za oko 1-1,5°C za vreme prvog sata;
druga - polagano linearno smanjenje do 34-35 °C;
treća - srednji temperaturni plato (ili termalni ekvilibrijum) je postignut kada je gubitak toplote na periferiji jednak stvaranju toplote metaboličkim putem (slika 1).



Slika 1. Šema perioperativne hipotermije

Gubitak toplote za vreme anestezije od pacijenta u okolinu odvija se na četiri načina: radiacijom, evaporacijom, kondukcijom i konvekcijom.

Radiacija (zračenje) energija se prenosi kroz sredine. U ljudskoj populaciji se na ovaj način izgubi oko 60% toplote. Gubitak toplote radiacijom većim delom zavisi od protoka krvi kroz kožu i površine tela izložene ambijentu. Ovo je najglavniji gubitak toplote kod hirurških pacijenata (2).

Evaporacija (isparavanje) - ovim načinom se gubi oko 20% toplote. Gubitak toplote događa se isparavanjem tečnosti iz

mukoze, seroznih površina, kože i pluća. Gubitak toplote evaporacijom zavisi od površine tela koja je izložena i relativne vlažnosti ambijentalnog gasa.

Količina toplote koja se izgubi respiratornim sistemom, za vreme hirurgije, je mala. Znojenje je najefikasniji proces gubitka toplote evaporacijom i može biti veoma velik, ali se retko dešava za vreme opšte anestezije. Suprotno tome, deca izgube veću frakciju svoje metaboličke toplote transpiracijom vode kroz tanku kožu. Problem je kod prevremeno rođene dece, koja mogu izgubiti petinu svoje

toplote proizvedene metabolizmom putem transkutane evaporacije.

Evaporacija široko otvorene hirurške rane doprinosi značajnom gubitku toplote.

Kondukcija (provođenje) - ovim načinom se gubi 5% toplote i količina izgubljene toplote je proporcionalna izloženoj površini tela, odnosu razlike temperature između media ili površine, i termalnoj provodljivosti. Gubitak toplote se događa samo onda kada su dva media u direktnom dodiru jedan sa drugim. Konduktivni gubici su neznatni za vreme hirurške intervencije zato što su pacijenti obično direktno u kontaktu sa sunderastim jastukom (odličan termalni izolator) koji pokriva operativni sto.

Konvekcija (strujanje) - ovim načinom se gubi oko 15% telesne toplote kretanjem vazduha. Proporcionalan je kvadratnom korenu brzine strujanja vazduha oko čovekovog tela. Brzina strujanja vazduha u operacionoj sali prosečno iznosi oko 20 cm/sec, a to lagano povećava gubitak u komparaciji sa nepomičnim vazduhom. To je drugi najvažniji način gubitka toplote anestetiziranih pacijenata.

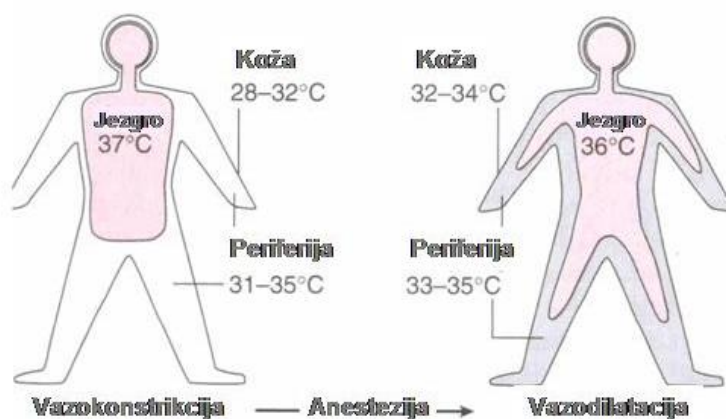
Verovatno je gubitak konvekcijom bitno veći u operacionoj sali snadbevenoj laminarnim strujanjem (3,2). Stvarno povećanje zbog povećanja brzine strujanja vazduha, manje je od očekivanog zato što hirurške komprese znatno doprinose termalnoj izolaciji.

Radijacija, kondukcija i konvekcija slede toplotni gradijent, tako da se u uslovima kada je spoljašnja temperatura niža od temperature kože, toplota odaje iz organizma, a kada je spoljašnja temperatura viša od temperature kože, organizam prima toplotu iz okoline (2).

Hipotermija koja nastaje u uslovima opšte anestezije se razvija prema karakterističnom šablonu. Početno naglo smanjenje nastupa polako, linearnim smanjenjem unutrašnje temperature.

Unutrašnja temperatura se stabilizuje i tokom trajanja hirurškog zahvata ostaje praktički nepromenjena. Svaki deo ovog tipičnog šablona ima različitu etiologiju.

Ključ razumevanja inicijalnog smanjenja unutarnje srednje telesne temperature je da telesna toplota nije jednako raspoređena. Toplota je normalno koncentrisana u unutarnjem delu tela, uglavnom glava i trup, dok je preostala periferija hladnija za 2-4°C (4). Ovaj centralno-periferni tkivni temperaturni gradijent se normalno održava toničkom termoregulatornom vazokonstrikcijom. Anesteticima izazvana vazodilatacija smanjuje unutrašnju temperaturu perifernim gubitkom. Ova toplotna redistribucija zagrejava ruke i noge, ali tako smanjuje unutrašnju temperaturu (Slika 2) (5).



Slika 2. Unutrašnja redistribucija telesne toplote posle uvida u opštu anesteziju

Nakon početne redistributivne hipotermije sledi linearno smanjenje unutrašnje temperature tokom sledeća 2-4 sata. Unutrašnja temperatura se smanjuje sporo (redistribucija iz zagrejanе periferije u okolinu) i nastaje zato što gubitak toplote nadmašuje metaboličku produkciju toplote. Nakon 3-4 sata anestezije, unutrašnja temperatura doseže plato i ostaje praktično konstantna do kraja hirurške intervencije. Plato unutrašnje temperature predstavlja termalno ustaljeno stanje (proizvodnja toplote jednaka je gubitku toplote) kod relativno zagrejanih pacijenata. U fazi platoa unutrašnja temperatura od 33-35 °C triger je za perifernu termoregulatornu vazokonstrikciju (6).

Termoregulatorna vazokonstrikcija za vreme opšte anestezije smanjuje gubitak toplote preko kože, ali samo ovo smanjenje je nedovoljno da dovede do termalno stabilnog stanja.

Međutim, ni odrasli, ni deca ne mogu intraoperativno povećati proizvodnju toplote kao odgovor na hipotermiju, zato moraju dodatni mehanizmi pridoneti platou unutrašnje toplote. Nameće se da je primarni faktor u održavanju unutrašnjeg toplotnog dela povezan sa metaboličkom toplotom. Distribucija metaboličke toplote (koja je uglavnom proizvedena centralno) ograničava unutrašnji kompartment održavajući svoju temperaturu. Temperatura perifernog tkiva, nasuprot tome nastavlja da se smanjuje zato što snabdevanje toplote iz unutrašnjosti tela nije dovoljno (3).

Srednji temperaturni plato rezultat je termoregulatorne vazokonstrikcije i nije tako stabilno termalno stanje jer količina toplote tela kontinuirano pada iako unutrašnja temperatura ostaje blizu konstantne.

Iako terapijska hipotermija ima svojih prednosti, za velik broj hirurških pacijenata duža perioperativna hipotermija udružena je sa porastom morbiditeta, mortaliteta i povećava cenu lečenja.

Infekcija hirurške rane, kao komplikacija, javlja se u više od 10% abdominalnih hirurških procedura (1).

Jedan od najvažnijih uzroka morbiditeta povezanog sa hipotermijom je infekcija hirurške rane. Hipotermija može pridoneti infekciji rane oštećenjem imunske funkcije (direktnim oštećenjem funkcije neutrofila) i pokretanjem termoregulatorne vazokonstrikcije (smanjuje protok krvi kroz kožu što za posledicu ima supkutanu tkivnu hipoksiju i odsustvo sistemskog humoralnog imunskog odgovora).

Perioperativna hipotermija tri puta povećava učestalost infekcije rane kod pacijenata kod kojih je urađena resekcija kolona.

Ako se uzmu u obzir sve komplikacije koje se odnose na anestetike, infekcija rane je najznačajniji uzrok morbiditeta, veći od svih drugih anestetičkih komplikacija zajedno. Infekcija rane produžava postoperativnu hospitalizaciju prosečno za četiri dana i povećava cenu lečenja (4). Osim toga, infekcija odgađa zarastanje rane i produžuje hospitalizaciju čak i kod pacijenata koji nisu imali infekciju rane.

Jedan od najčešćih uzroka komplikacija i smrti u perioperativnom periodu je akutna koronarna bolest. Dok intraoperativna hipotermija nema signifikantni uticaj na kardiovaskularnu efikasnost kod mladih i zdravih osoba, incidenca perioperativnih koronarnih posledica je triputa veća kod starijih pacijenata ako imamo intraoperativnu hipotermiju od 1,4°C (7). Patološki mehanizam ovih odnosa nije u potpunosti jasan ali postoje dva uzroka: nakon opšte anestezije komplikovane hipotermijom koncentracija noradrenalina u plazmi poraste čak nekoliko puta (pet puta više od bazalnog), što je udruženo sa odblokiranjem termoregulatornog centra i aktivacijom simpatičkog mehanizama, smanjuje se vazokonstrikcija. Ovo signifikantno povećava krvni pritisak, srčanu frekvencu i rizik od nastanka ventrikularne tahiaritmije.

Sa druge strane, postoperativno drhtanje koje dovodi do povećane proizvodnje toplote, povećava potrošnju kiseonika što može biti opasno kod starijih pacijenata koji imaju koronarno oboljenje (1).

Hipotermija takođe pomera krivulju disocijacije oksihemoglobina u levo, što povećava vezivanje kiseonika za hemoglobin, tako da smanjuje otpuštanje kiseonika u tkivo. Kombinacijom povećanja potreba miokarda za kiseonik (hipertenzija i tahikardija) i smanjenje snabdevanja miokarda kiseonikom (kratko vreme dijastolnog punjenja i povećanje afiniteta hemoglobina za kiseonik) može promeniti balans miokardne oksigenacije u deficit i rezultirati ishemijskom (4).

Smanjenjem metabolizma lekova hipotermija može odgoditi buđenje i produžiti boravak u jedinicama postoperativne nege (8). Hipotermija ima uticaja na mnogo klasičnih lekova, uključujući mišićne relaksante, volatilne agense i intravenske anestetike (9).

Produženo farmakološko dejstvo nastaje iz više razloga.

Hipotermija smanjuje protok krvi kroz jetru i bubrege, što smanjuje metabolizam i izlučivanje lekova, što rezultira smanjenjem klirensa plazme i povećanjem efekta leka.

Produženo trajanje aktivnosti nedepolarizirajućih mišićnih relaksanata rezultat je promena u volumenu distribucije, lokalnim menjanjem difuzije i receptorskog afiniteta, promena pH neuromuskularnog spoja, i dodatno hladnoća deluje na različite komponente neuromuskularne transmisije (4).

Npr. trajanje aktivnosti vekuronijuma je više nego duplo, ako je unutrašnja temperatura manja za 2 °C. Više abnormalnosti je zapaženo u farmakokinetici nego u farmakodinamici, zatim produženo je vreme klirensa plazme. Slično je i sa rokurijumom, ali manje nego sa atrakurijumom. Trajanje aktivnosti atrakurijuma je manje zavisno od unutrašnje temperature, pa smanjenje

za 3°C povećava dužinu dejstva za 60% (9). Zanimljivo je da se osetljivost motorne ploče ne menja.

Takođe, hipotermija smanjuje snagu mišićnih kontrakcija za 10-15% čak i bez davanja mišićnog relaksanta (10).

Efikasnost neostigmina, antagonista vekuronijuma nije izmenjena u hipotermiji, premda je početak dejstva produžen za 20% (11).

Za vreme kontinuirane infuzije propofola, plazma koncentracija propofola je veća za 30% od normalne kod pacijenata čija je temperatura niža za 3°C (9).

Opioidni analgetici takođe pokazuju produženo dejstvo u hipotermiji. To je udruženo sa povećanjem plazma koncentracije fentanila i remifentanila. Povećanje je 25% u kompraciji sa normotermijom (1).

Hipotermija takođe menja farmakodinamiku volatilnih anestetika. Smanjenjem temperature povećava se topivost u tkivima, a to povećava anestetičku količinu u telu. Tako, minimalna alveolarna koncentracija (MAC) lagano pada (1).

Za proces hemostaze, sem hirurškog rada, i hipotermija se navodi kao razlog za povećano hirurško krvarenje. U studijama koje su sprovedene kod pacijenata sa artroplastkom, smanjenje telesne temperature za 1,6°C povećava gubitak krvi za 500 mL i povećava potrebu za autolognom transfuzijom krvi (12,13). Umereno hipotermični pacijenti gube više od 25% krvi u perioperativnom periodu u poređenju sa normotermičnim (3).

Niža temperatura deluje na stvaranje ugruška posredstvom tri različita mehanizma: oštećenjem funkcije trombocita, produženo protrombinsko vreme i vreme starenja ugruška i uticajem na fibrinolizu.

Oštećenje funkcije trombocita povezano je sa lokalnom temperaturom. Ovaj defekt nastaje zbog smanjene sinteze tromboxana B₂ i trombina na mestu oštećenja tkiva (14). Hipotermija, u manjem stepenu, direktno oštećuje funkciju enzima koagulacione kaskade (15). Zanimljivo je, ovo oštećenje neće biti očigledno za vreme

rutinskog koagulacionog skrininga zato što se testovi izvode na 37°C. Kada se testovi izvode pri nižim temperaturama, defekt je očigledan (16).

Fibrinoliza se takođe povećava sa hipotermijom, destabilizira ugrušak i povećava se sklonost ka krvarenju (17).

Drhtanje se događa za vreme neuroa-ksijalne anestezije i nakon opšte anestezije. Ovom umerenom proizvodnjom toplote povećava se metabolička proizvodnja toplote sa potrošnjom kiseonika za 50-400% (4). Drhtanje koje dovodi do povećanja intenziteta metabolizma nije primarni uzrok ishemije miokarda (18).

Hipotermija se povezuje i sa pojavom razvoja ulkusa na koži (19). Takođe hipotermija produžava bolničko lečenje kod hirurških pacijenata (20).

Održavanje normotermije je važan put ka zadovoljstvu pacijenta jer pacijenti koji su osetili hladnoću manje su zadovoljni za vreme oporavka (21). Studije su pokazale da su grejani pacijenti bili zadovoljniji i manje anksiozni (22).

Hipotermiju, koja se javlja kao komplikacija kod anesteziranih pacijenata, najbolje je prevenirati. Intraoperativna hipotermija može se minimizirati tehnikama koje limitiraju gubitak toplote preko kože u okolinu evaporacijom iz hirurške rane i respiratornog trakta, konduktivnim hlađenjem prekomernog protoka gasa, hladnim intravenskim tečnostima ili rastvorima za ispiranje.

Najveći deo anesteziranih pacijenata su poikilotermi, pokazuju temperaturu tela koja se menja s temperaturom okoline zbog neadekvatnog termoregulatornog odgovora.

Održavanje unutarne temperature intraoperativno treba biti tako da je temperatura veća od 36°C. Prevencija bi trebala početi pripremom pacijenata pre ulaska u salu (23).

Nadalje, lakše je održavanje intraoperativne normotermije (kada su pacijenti najviše vazodilatirani), od ponovnog zagrevanja pacijenata postoperativno (kada su

svi hipotermični pacijenti u vazokonstrikciji. Mnogo je efikasnije intraoperativno grejanje od postoperativnog lečenja komplikacija koje nastaju zbog hipotermije (3). Pacijenti neizbežno postaju hipotermični za vreme hirurške intervencije i aktivnim grejanjem se postoperativno povećava termalni komfor, smanjuje drhtanje i pospešuje zagrevanje.

LITERATURA

1. Horosz B, Malec-Milevska M. Inadvertent intraoperative hypothermia. *Anesthesiology Intensive Therapy* 2013; 45: 38-43.
2. Plattner O, Semsroth M, Sessler DI, et al: Lack of nonshivering thermogenesis in infants anesthetized with fentanyl and propofol. *Anesthesiology* 1997; 86: 772-7.
3. Sessler DI. Temperature regulation and monitoring. In: Miller RD, Eriksson LI, Fleisher LA, Wiener-Kronish JP, eds *Miller's Anesthesia*. 7th ed. Philadelphia: Churchill Livingstone/Elsevier, 2010: 1533-56.
4. Hart SR, Bordes B, Hart J, Corsino D, Harmon D. Unintended Perioperative Hypothermia, *The Ochsner Journal* 2011; 11(3): 259-70.
5. Matusukawa T, Sessler DI, Sessler AM, et al: Heat flow and distribution during induction of general anesthesia. *Anesthesiology* 1995; 82(3): 662-73.
6. Sessler DI, Olofsson CI, Rubinstein EH. The thermoregulatory threshold in humans during nitrous oxide-fentanyl anesthesia. *Anesthesiology* 1998; 69(3): 357-64.
7. Frank SM, Fleisher LA, Breslov MJ, et al. Perioperative maintenance of normothermia reduces the incidence of morbid cardiac events. A randomized clinical trial. *JAMA* 1997; 277 (14): 1127-34.
8. Lenhardt R, Marker E, Goll V, et al. Mild intraoperative hypothermia pro-

- longs postanesthetic recovery. *Anesthesiology* 1997; 87(6): 1318-23.
9. Leslie K, Sessler DI, Bjorksten AR, Moayeri A. Mild hypothermia alters propofol pharmacokinetics and increases the duration of action of atracurium. *Anesth Analg* 1995; 80(5): 1007-14.
10. Heier T, Caldwell JE, Eriksson LI, et al. The effect of hypothermia on adductor pollicis twitch tension during continuous infusion of vecuronium in isoflurane-anesthetized humans. *Anesth Analg* 1994; 78: 312-7.
11. Heier T, Clough D, Wright PM, et al: The influence of mild hypothermia on the pharmacokinetics and time course of action of neostigmine in anesthetized volunteers. *Anesthesiology* 2002; 97: 90-5.
12. Schmied H, Kurz A, Sessler DI, Kozek S, Reiter A. Mild hypothermia increases blood loss and transfusion requirements during total hip arthroplasty. *Lancet*. 1996; 347(89): 289-92.
13. Winkler M, Akca O, Birkenberg B, et al. Aggressive warming reduces blood loss during hip arthroplasty. *Anesth Analg* 2000; 91: 978-84.
14. Valeri CR, Feingold H, Cassidy G, Ragno G, Khuri S, Altschule MD. Hypothermia-induced reversible platelet dysfunction. *Ann Surg*. 1987; 205(2): 175-81
15. MJ, Natale AM. Effect hypothermia on coagulation cascade. *Crit Care Med*. 1992; 20
16. Rajagopalan S, Mascha E, Na J, Sessler DI. The effects of mild perioperative hypothermia on blood loss and transfusion requirement. *Anesthesiology* 2008; 108(1): 71-7.
17. Yoshihara H, Yamamoto T, Mihara H. Changes in coagulation and fibrinolysis occurring in dogs during hypothermia. *Thromb Res* 1985; 37(4): 503-12.
18. Frank SM, Fleisher LA, Olson KF, et al. Multivariate determinants of early patients. Effects of shivering, body temperature, and gender. *Anesthesiology* 1995; 83(2): 241-9.
19. Scott EM, Buckland R. A systematic review of intraoperative warming to prevent postoperative complications. *AORN J* 2006; 83(5): 1090-1104, 1107-13.
20. Kurz A, Sessler DI, Lenhardt R. Perioperative normothermia to reduce the incidence of surgical-wound infection and shorten hospitalization. Study of Wound Infection and Temperature Group. *N Engl J Med* 1996; 334(19): 1209-15.
21. Kurz A, Sessler DI, Narzt E, Lenhardt R, Lackner F. Morphometric influences on intraoperative core temperature changes. *Anesth Analg* 1995; 80(3): 562-7.
22. Wagner D, Byrne M, Kolcaba K. Effects of comfort warming on preoperative patients. *AORN J* 2006; 84 (3): 427-48.
23. Diaz M. Hypothermia and Temperature regulation considerations during anesthesia. *Anesth Prog* 2010; 57(1): 25-33.

UTICAJ ISHRANE NA PREŽIVLJAVANJE BOLESNIKA SA TEŠKIM AKUTNIM PANKREATITISOM

Ivana Krstić Lečić

Klinika za anesteziologiju i intenzivnu terapiju, Vojnomedicinska akademija, Beograd

Sažetak

Metaboličke promene koje se dešavaju kod akutnog pankreatitisa (AP) dovode do metaboličkog stresa koji zahteva posebnu nutritivnu podršku. Kod teškog, nekrotičnog AP, javlja se povećana energetska potrošnja i katabolizam proteina uz negativni bilans azota, te je enteralna ishrana (EN) indikovana ako je moguća, ali bolesnik može zahtevati i suplementarnu parenteralnu ishranu. Ako gastrični način ishrane nije moguć, trebalo bi pokušati jejunalnim putem. Rana EN poboljšava tok teškog AP i zato se preporučuje kontinuirana EN kod svih pacijenata koji je mogu podneti. U slučaju operativnog zahvata preporučuje se intraoperativna jejunostomija za postoperativnu EN. „Da li nutritivni status utiče na ishod AP?“ Mada u ovom kontekstu nije proučavana, izgleda da teška pothranjenost negativno utiče na ishod. S obzirom da još ne postoje studije koje proučavaju ovaj problem, na ovo pitanje, baš kod AP, teško je odgovoriti. Poznato je da je pothranjenost faktor rizika za razvoj komplikacija i veći letalitet drugih oboljenja. Međutim, prekomerna telesna težina takode je povezana sa lošijom prognozom.

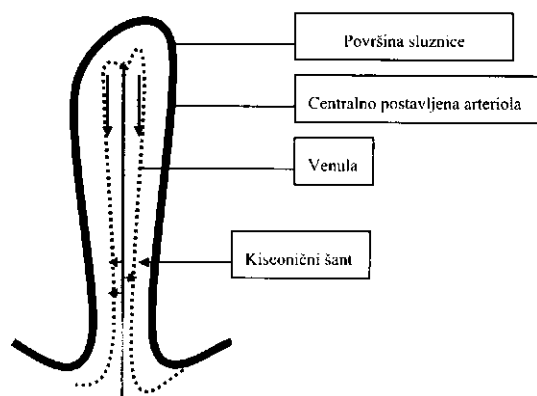
Abstract

Metabolic changes in acute pancreatitis (AP) are leading to metabolic stress which includes special nutritive support. In severe AP there is increasing energy expenditure and protein catabolism with negative nitrogen balance - in this situation, enteral nutrition (EN) is indicated if it is possible. If it's not, parenteral supplemental nutrition is indicated. If gastric route is not possible we should try jejunal tube. Early EN improves survival in severe AP. We can now answer the question "Has nutritive status direct influence on survival of patients with AP?" Malnutrition is risk factor for complications and lethality. On the other side, increased Body Mass Index (BMI) is correlated with poorer prognosis.

Uvod

Akutni pankreatitis se razvija u različitim oblicima, a shodno težini bolesti raste letalitet ove kategorije bolesnika. Metaboličke promene koje se dešavaju kod akutnog pankreatitisa dovode, kao i kod ostalih kritično obolelih pacijenata, do metaboličkog stresa koji zahteva posebnu nutritivnu podršku. To je veoma važno kod

rizičnih pacijenata (definisani kao pacijenti sa Ransonovim indeksom = 3 i/ili APACHE II=10). Težak akutni pankreatitis udružen sa sistemskim inflamatornim odgovorom (SIRS - Systemic Inflammatory Response) uzrokuje porast metaboličkih potreba i dovodi do multiorganskog oboljenja (MODS - Multi-Organ Disease).



Slika 1. Na osnovu patofizioloških ispitivanja može se zaključiti da je vrh crevnog vilusa umereno hipoksičan čak i u fiziološkim uslovima, a da se ta hipoksija rapidno pogoršava u stanjima hipovolemije.

Teški AP, uz hipovolemiju, izaziva i sistemski inflamatorni odgovor organizma, što zajedno povećava metaboličke potrebe organizma i utiče na pogoršanje ishemije u intestinalnoj cirkulaciji. Ishemija u intestinalnoj cirkulaciji, ako egzistira dugo, izaziva oslobađanje ćelijskih medijatora (citokina), kako u ishemijskoj zoni, tako i mogućnost njihovog ulaska u sistemsku cirkulaciju i nastanak inflamatorne reakcije u udaljenim organima (prvenstveno u plućima, kao „primarnom filteru“ organizma - ARDS). Šta se dešava ako izvršimo „zakasnelu“ nadoknadu cirkulatornog volumena sa ciljem rešavanja intestinalne ishemije? Tada dolazi do reperfuzionih poremećaja sa oslobađanjem kiseoničnih slobodnih radikala koji izazivaju ista, ako ne i veća oštećenja, od citokina. Sve to zajedno nazivamo ishemijsko / reperfuzionim oštećenjima čiji krajnji rezultat jeste MODS.

Diskusija

Principijelno gledano, lečenje akutnog pankreatitisa zavisi od njegove težine. Osnovni postulati lečenja su: kontrola bola, intravenska nadoknada volumena, prepoznavanje i tretman ileusa, obavezna nazogastrična sonda, inhibicija gastrične sekrecije, prevencija i tretman komplikacija. Srednje teški akutni

pankreatitis ima mali uticaj na nutritivni status i metabolizam. Kod teškog, nekrotičnog pankreatitisa, javlja se povećana energetska potrošnja i katabolizam proteina, uz negativni bilans azota - i do 40 g dnevno. Metaboličke promene i katabolizam proteina zahtevaju povećan energetski unos, kako iz masti, tako i iz ugljenih hidrata. Hiperlipidemija, kao i teška hiperglikemija, moguće su posledice, ali i uzroci akutnog pankreatitisa. U srednje teškom akutnom pankreatitisu EN nije neophodna ukoliko pacijent može posle 5 - 7 dana konzumirati hranu. Kod teškog, nekrotizirajućeg pankreatitisa, EN je indikovana ako je moguća, ali može zahtevati suplementarnu parenteralnu ishranu. Ako gastrična ishrana nije moguća, treba pokušati sa jejunalnim putem.

U akutnom pankreatitisu mogu se bezbedno koristiti formule bazirane na peptidima. Standardne formule primenjivati ako se dobro podnose. Da li imuno-modulatorne, glutaminom bogate formule, imaju dodatni uticaj na tok bolesti, ostaje tema novijih ispitivanja? Rana EN poboljšava tok teškog pankreatitisa. Zato se preporučuje kontinuirana EN kod svih pacijenata koji je mogu podneti. U slučaju operativnog zahvata, preporučuje se intraoperativna jejunostomija za postoperativnu TE. Kod teškog akutnog pankreatitisa sa komplikacijama (fistule, ascit, pseudo-

cis-te) TF se može uspešno primenjivati. Vrh sonde treba plasirati distalno od opstrukcije. Dati i PN kada je moguće. Ne postoje poznate, specifične kontraindikacije za primenu EN.

Nutritivna podrška se primenjuje shodno kliničkoj proceni. Oralnu ishranu progresivno pokušavati po prekidu gastrične opstrukcije, što se uočava kada nema bolova niti komplikacija. TF postepeno smanjivati kako se oralni unos povećava.

Zaključak

Kod teškog pankreatitisa, pogotovu onog izazvanog alkoholizmom i pothranjenošću, trebalo bi što pre započeti sa EN. Nadoknadu vode, elektrolita i mikronutritijenata postići intravenskim putem i smanjivati je sa postepenim povećanjem enteralne ishrane. Preporuka je EN, tokom svih 24 časa, i to preko pumpe povezane sa jejunalom sondom. Takode se preporučuje da se EN suplementira sa PN ukoliko enteralni unosi nisu dovoljni ili kada postoji kontraindikacija za EN (prolongirani ileus). U studiji u kojoj je upoređivana glutaminom bogata, multi-fiber formula, sa standardnom fibre-containing formulom, uočen je povoljan efekat glutaminom bogate formule na oporavak IgG i IgM proteina i skraćanje toka bolesti. Deficit tijamina postoji naročito kod alkoholičara, pa se njegovo dodavanje preporučuje. Slično važi i za suplementaciju selena. Prelazak sa TF na oralnu ishranu treba da bude postepen i u skladu sa tokom bolesti.

„Da li nutritivni status utiče na ishod AP?“ Mada u ovom kontekstu nije proučavana, izgleda da teška pothranjenost negativno utiče na ishod. S obzirom da još nemamo studije koje proučavaju ovaj problem, na ovo pitanje, bar kod AP, teško je odgovoriti. Poznato je da je pothranjenost faktor rizika za razvoj komplikacija i veći letalitet drugih oboljenja. Takode je poznato da pothranjenost postoji kod 50 - 80 % hroničnih alkoholičara, a

alkohol je najčešći uzrok AP (30 - 40 % pacijenata).

Međutim, prekomerna telesna težina (visok BMI - body mass index) takode je povezana sa lošijom prognozom.

Literatura

1. Abou-Assi S, Craig K, O'Keefe SJD. Hypocaloric jejunal feeding is better than total parenteral nutrition in acute pancreatitis: results of a randomized comparative study. *Am J Gastroenterol* 2002; 97: 2255 - 62.
2. Berard MP, Zazzo JF, Condat P, Vason MP, Cynober L. Total parenteral nutrition enriched with arginine and glutamine and limits protein catabolism in surgical patients hospitalized in intensive care units. *Crit Care Med* 2000; 28: 3637 - 3644.
3. Dervenis C. Assessments of Severity and Management of Acute Pancreatitis: Based on the Santorini Consensus Conference Re-pon. *JOP Journal of the Pancreas* 2000; 1(4): 178 - 182.
4. Garnacho Montero J, Garcia de Lorenzo y Mateos A, Ordonez Gonzalez EJ. Artificial nutrition in acute pancreatitis. *Nutr Hosp* 2005; 20(Suppl 2): 25-7.
5. Isenring EA, Capras S, Bauer JD. Nutrition interventions is beneficial in oncology outpatients receiving radiotherapy to the gastrointestinal or head and neck area. *Br J Cancer* 2004; 91: 447 - 452.
6. Kyle UG, Gentom L, Pichard C. Hospital length of stay and nutritional status. *Curr Opin Clin NutrMetabol Care* 2005; 8: 397 - 402.
7. Kyle UG, Genton L, Heidegger CP, et al. Hospitalized mechanically ventilated patients are at higher risk of enteral underfeeding than non-ventilated patients. *Clin Nutr* 2006; 25: 727 - 735.
8. Makola D, Krenitsky J, Parrish C, et al. Efficacy of Enteral Nutrition for the Treatment of Pancreatitis Using Standard Enteral Formula. *Am J Gastroenterol* 2006; 101: 2347 - 2355.

9. Meier R, Ockenga J, Pertkiewicz M, et al. ESPEN Guidelines on Enteral Nutrition: Pancreas. *Clinical Nutrition* 2006; 25: 275 -284.
10. Munoz A, Katerndahl DA. Diagnosis and Management of Acute Pancreatitis. *Am Fam Physician* 2000; 62: 164 - 74.
11. Romić P. Efekat dopeksamina, dopamina, dobutamina i koloid-nih rastvora na splanhničnu hipoperfuziju kod politraumatizovanih u ranom MODSu. *Doktorska teza*. Vojnomedicinska akademija, Beograd; 2000.
12. Takala J. Determinants of splanchnic blood flow. *Br J Anaesth* 1996;77:50-8
13. Villet S, Chiolero RL, Bollmann MD, et al. Negative impact of hypocaloric feeding and energy balance on clinical outcome in ICU patients. *Clin Nutr* 2005; 24: 502 - 509.
14. Windsor AC, Kanwar S, Li AG, et al. Compared with parenteral nutrition, enteral feeding attenuates the acute phase response and improves disease severity in acute pancreatitis. 1998; 42: 431.



TRANSPORT PACIJENTA SA POLITRAUMOM

Snežana Milivojević

Gradski zavod za hitnu medicinsku pomoć – Beograd

Sažetak

Uvod: Prema svetskim statistikama politrauma je jedan od vodećih uzroka smrtnosti, a razlog tome je oštećenje više organa ili sistema organa koji ugrožavaju život pacijentu. Po definiciji politrauma kao pojam podrazumeva istovremenu povredu više različitih telesnih regija, pri čemu najmanje jedna povreda ili kombinacija više povreda neposredno ugrožava život.

Cilj: Prikazati standarde, normative i specifičnosti interhospitalnog transporta pacijenta sa politraumom mobilnomjedinicom intenzivne nege.

Diskusija: U radu su prikazani standardi i normativi interhospitalnog transporta pacijenta sa politraumom, čije stanje zahteva intenzivno lečenje i negu. Posebno je istaknut značaj izbora sanitetskog vozila za ovakve procedure, optimalni standard medicinsko tehničke opremljenosti istog kao i značaj stručnog tima koji obavlja ovu proceduru.

Zaključak: Za uspešan transport i prevenciju mogućih komplikacija, imajući u vidu stanje pacijenta, okolnosti i dužinu trajanja procedure, potrebno je adekvatno sanitetsko vozilo, adekvatna oprema i vrhunska stručnost članova ekipe hitne medicinske pomoći.

Ključna reč: Politrauma; interhospitalni tretman

Uvod

Politrauma je jedan od vodećih uzroka smrtnosti u svim zemljama sveta. Politrauma se definiše kao povreda dva ili više organa ili sistema organa, od kojih bar jedan neposredno ugrožava život povređenog. Iako postoje određene specifičnosti vezane za pojedine regione, nesumljivo je najčešći uzrok nastanka politraume saobraćajni traumatizam. Svetska zdravstvena organizacija navodi podatak da 1.25 miliona ljudi umire godišnje širom sveta od posledica povreda zadobijenih u saobraćajnim udesima. Saobraćajni traumatizam najčešće je izazvan prekomernom brzinom, zloupotrebom narkotika i alkohola. To može biti jedan od razloga što je trauma bolest mladih i vodeći uzrok smrtnosti u populaciji od 15-44 godina. Povrede na radu, padovi, povrede zadobijene vatrenim oružjem su vrlo česti uzroci politraume.

Cilj rada: Cilj ovog rada je prikazati specifičnosti interkliničkog transporta pacijenta sa politraumom kolima hitne pomoći, čije stanje zahteva intenzivnu negu i lečenje. Posebno prikazati značaj i ulogu ekipe hitne pomoći, potrebu za adekvatnom opremom i odgovarajućim sanitetskim vozilom, obzirom na težinu stanja pacijenta i dužinu puta.

Diskusija

Transport kritično povređenih i obolelih je značajna procedura tokom koje je bolesnik izložen opasnosti od nastanka i razvoja veoma ozbiljnih i po život opasnih komplikacija. Pod kritično obolelim se podrazumeva bolesnik sa izraženom kardiovaskularnom i/ili respiratornom disfunkcijom koja mu ugrožava život i zahteva primenu intenzivnih mera potpore vitalnih funkcija. Transport povređenih i

obolelih može biti: prehospitalni, interhospitalni i intrahospitalni.

Transport bolesnika je klinička situacija čiji su potencijalni rizici za razvoj komplikacija i složenost problema često vrlo potcenjeni. Istraživanja u vezi sa interhospitalnim transportom ukazuju da je letalitet kod transportovanih bolesnika veći od očekivanog kod sličnih bolesnika koji nisu transportovani. Zbog toga je od najvećeg značaja da medicinski tim koji učestvuje u transportu bude uvežban. Ne treba da postoji bolesnik koji je „previše bolestan“ da bi bio transportovan pod uslovom da je obezbeđeno adekvatno zbrinjavanje tokom transporta.

Tokom transporta pristup bolesniku može biti otežan, pa se u tim uslovima medicinski tim mnogo više nego što je uobičajeno oslanja na informacije sa monitora. Zato prilikom opremanja vozila za transport treba nabavljati opremu koja je testirana za rad u vanbolničkim uslovima jer na rad opreme utiču vibracije, buka, promene pritiska i temperature na visinama. Kod kritično obolelih koji se transportuju ovi uticaji mogu biti okidač i za nastanak ozbiljnih komplikacija.

Oprema u specijalnim vozilima za transport bolesnika bi trebalo da omogućiti osnovni i viši oblik kardiopulmonalne reanimacije. Praćenje stanja bolesnika tokom transporta obuhvatalobi:

- praćenje kardiovaskularne funkcije,
- praćenje respiratorne funkcije,
- praćenje bubrežne funkcije,
- praćenje neurološke funkcije.

PRAVILO JE DA NIVO MONITORINGA TOKOM TRANSPORTA TREBA DA BUDE ISTI KAO ŠTO JE BIO U JEDINICI INTENZIVNE NEGE.

Sastav tima za transport

Težina kliničke slike, nivo potrebnog praćenja, tip ventilacije i očekivano trajanje transporta diktiraju broj i kvalifikaciju potrebnog osoblja koje ulazi u sastav tima za transport. Tim treba da

bude dobro organizovan, uvežban, tokom transporta mora imati mogućnost komunikacije sa stacionarnom ustanovom ili odeljenjem iz kojeg se ili u koje se bolesnik transportuje.

Oprema za transport

Izvođenje transporta što bezbednije za bolesnika zahteva da tim za transport raspolaže opremom za čiji je sastav i funkcionalnost odgovoran vođa tima. Još uvek ne postoje standardi za transportnu opremu ali se predlaže sledeća oprema:

- oprema za podršku kardiovaskularnoj funkciji obuhvata monitor, defibrilator, *pace-maker*, aparat za merenje krvnog pritiska,...
- oprema za podršku respiratornoj funkciji obuhvata maske za ventilaciju, orofarinksne i endotrahejne tubuse, laringoskop, kiseonik (dovoljna količina kiseonika obezbeđena u gasnim cilindrima (bocama)), reanimacijski balon sa PEEP valvulom, pulsni oksimetar, pribor za sukciju, transportni ventilator, set za intubaciju,
- medikamenti za terapiju sledećih stanja: srčani zastoj, hipo-ihiper tenzija, disritmija, edem pluća, bronhospazam, anafilaksija, hipo-ihyperglikemija, povišen intrakranijalni pritisak, psihomotorni nemir, konvulzije, trovanje (antidoti) zavisno od stanja bolesnika i drugi lekovi.
- ostala oprema obihvata: set za infuziju, igle i špriceve, kanile, infuzione tečnosti, brojače i infuzione pumpe, nazogastrične sonde, antiseptične rastvore i rukavice, termometre,...



Slika 1. Oprema sanitetskog vozila

Komplikacije i poteškoće u transportu se najlakše mogu podeliti na medicinske i paramedicinske, a važno je da obe imaju veliki uticaj na stanje bolesnika. Paramedicinske poteškoće najčešće su vezane za vremenske uslove, gužve u saobraćaju i ispravnost vozila. Zajedničko im je to da mogu znatno produžiti vreme provedeno u transportu, a svaka minuta provedena u transport duže od planiranog povećava rizik od razvoja komplikacija kod bolesnika.

Medicinske komplikacije većinom su vezane za bolest zbog koje je potreban transport, neplanirano duži transport, ispravnost i funkcionalnost opreme i ograničena količina lekova. Najčešće komplikacije vezane za bolest je kliničko pogoršanje bolesti tokom transporta koje kompromituju kardipulmonalni sistem, a od lekarskog tima zahtevaju pravovremeno prepoznavanje istih, brzu i ispravnu reakciju.

Prikaz slučaja

Pacijent star 55. godina, povređen u saobraćajnoj nesreći u kojoj su tri osobe izgubile život. Pacijentu je ukazana prva pomoć na terenu i hospitalizovan je u Urgentnom centru u Skoplju. Nakon odrađenih dijagnostičko-terapijskih procedura, koje je njegovo stanje zahtevalo, odlučeno je da se pacijent transportuje u Beograd (3. kategorija transporta-transport kojim se bolesnik premešta bliže svome domu). U trenutku primopredaje, pacijent svestan,

orijentisan u vremenu, prostoru, ka sebi i ka drugim licima. Spontano diše, na kiseoničnoj terapiji. Ima plasiran torakalni dren (aktivna sukcija-vodeni stub) i urinarni kateter. Oba donja ekstremiteta imobilisana, na desnoj nozi postavljena ekstenzija. Imobilisana je i desna ruka. Na licu, ispod levog oka prisutan hematoma. Hemodinamski stabilan. Obezbeđene dve periferne venske linije. U dogovoru sa lekarima intenzivne nege, pacijentu skinuta ekstenzija a torakalna drenaža povezana na zatvoreni sistem za drenažu.

Dijagnoza: Polytraumatismus, Contusio capitis, Commotio cerebri, Haemathosinus maxillaris l.sin., Fractura claviculae l.sin., Luxatio claviculae l.sin., Fractura costae III-IV l.dex., Pneumothorax l.dex., Contusio pulmonum l.dex., Fractura humeri l.dex., Fractura processu L3- L4 l.sin., Fractura vertebrae L5 compresiva, VLC patellae l.dex., Effusio geni l.dex., Luxatio art. coxae l.dex cum fracturae acetabuli et caput femoris l.dex.

Lična anamneza: Hipertoničar. Redovno uzima svoji terapiju. Negira ranije operacije. Negira alergije na lekove i hranu

Porodična anamneza: Bez značaja za hereditet.

Navike i faktori rizika: Nije pušač. Ne konzumira alkoholna pića.

Vitalni parametri: TA 140/80mmHg, puls 78/min, temperatura 36,5 C, disanje spontano (R-18/min).

Stanje govora: Verbalna komunikacija se normalno uspostavlja.

Stanje čula: Pacijent dobro čuje. Koristi naočare za čitanje.

Ishrana: Obustavljen peroralni unos hrane i pića zbog planirane hirurške intervencije. Pacijent se hrani parenteralno.

Defekacija: Uredna. Poslednja dan pre povređivanja.

Stanje kože: Koža izrazito bleđa. Uočljiv hematoma u predelu leve jagodične kosti.



Slika 2. Transport zbrinutog pacijenta

U toku transporta: Pacijent priključen na monitoring, hemodinamski stabilan (TA 140/70mmHg, srčana frekvenca 78/min). Spontano diše, respiratorna frekvenca 18 respiracija u minuti, na kiseoničnoj terapiji, O₂ 6L/min preko binazalnog katetera. Praćena torakalna drenaža. Vođena satna diureza. Bol kupiran analgeticima (Fentanyl- opioidni anestetik koji se koristi za neuroleptanalgeziju i neurolepanesteziju, kao analgetska komponenta za OETA i za analgeziju u JIL-u. Neželjeni efekti: depresija disanja, mučnina, povraćanje, sedacija,...PREDOZIRANJE-antagonist opijata-Naloxon).Transport protekao bez komplikacija. Pacijent predat u reanimaciju Urgentnog centra u Beogradu gde je nastavljeno njegovo lečenje.

Zaključak

Opšti principi prevoza unutar bolnice isti su kao i oni između bolnica pa bi trebali obezbediti sigurnost bolesnika i osoblja, minimalno vreme trajanja prevoza, pružanje optimalne nege i odgovornost lekara. Prevoz vitalno ugroženog bolesni-

ka mora se smatrati produžetkom intenzivne nege.Kvalitetan medicinski nadzor potrebno je sprovoditi za sve vreme transporta.Bolesnika za vreme prevoza mora pratiti iskusna ekipa.Lekar je najodgovorniji za sve što se događa tokom prevoza i mora biti spreman da reaguje na sve neželjene događaje koji mogu životno ugroziti bolesnika. Lekar-anestezilog mora biti u pratnji svih intubiranih pacijenata kojima je neophodna mehanička ventilacija, kao i svih kod kojih je nestabilan respiratorni i kardiovaskularni sistem.

Literatura

1. Baljuzović, A.,Baljuzović, N.,Hirurgija s anegom I, Zavod za udžbenike i nastavna sredstva, Beograd, 2002.
2. Banović, M. D. i saradnici, Traumatologija koštano-zglobnog sistema, Zavod za udžbenike i nastavna sredstva, Beograd,1998.
3. Janković, R., Inter i intra-hospitalni transport pacijenta, Katedra urgentne medicine, Medicinski fakultet Niš, 2011.
4. Kalezić,N., Inicijalni tretman urgentnih stanja u medicini, Medicinski fakultet, Beograd, 2013.
5. Stojiljković, J., Praktikum Urgentna medicinska pomoć sa negom, Knjiga-komerc, Beograd, 2006.
6. Filipović, N.,Šurbatović, M.,Stanković, N.,Jovanović, K.,Interhospitalni i intra-hospitalni transport kritično povređenih i obolelih, Vojnosanitetski pregled, 2004.
7. Colić,V., Praktikum iz anestezije, Rive-ra pres, Beograd, 1997
8. Dostupnona: www.wikipedia.org