

ČASOPIS UDRUŽENJA ANESTEZISTA
REANIMATORA I TRANSFUZISTA SRBIJE



ANESTEZIJA
REANIMACIJA
TRANSFUZIJA

BEOGRAD
2015



Časopis Udruženja anesteziologa, reanimatora i transfuzista Srbije

Glavni i odgovorni urednik: Dragoslav Itov

Uređivački odbor: Draga Udovica
Radivoje Milovanović
Ninoslav Stojković

Recenzenti: Prof. dr sc med. Bela Balint
Prof. dr sc med. Snežana Jovanović Srzentić
Prof. dr sc med. Maja Šurbatović
Prof. dr sc med. Gradimir Bogdanović
Doc. dr sc med. Dušan Vučetić
Doc. dr sc med. dr Milić Veljović
N. sarad. prim. dr sc med. Slađana Anđelić
N. sarad. dr sc med. Mirjana Kovač
N. sarad. prim. dr sc med. Zoran Stanojković
Mr sc med. dr Branko Čalija
Dr Aleksandar Vranjanac
Dr Ana Popadić
Spec. strukovni MT Dragoslav Itov

Časopis izlazi kao dvobroj: Tiraž : 300

Štampa: Fmagazin, Beograd

Predsednik Udruženja: Draga Udovica

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



S A D R Ź A J

**HEMOBIOLOGIJA I TERAPIJSKA PRIMENA
KRVNE PLAZME I NJENIH KOMPONENTI /
DERIVATA**

Bela Balint, Miodrag Jocić, Milena Todorović-
Balint, Dušan Vučetić, Gordana Ostojić,
Mirjana Pavlović 9

**CANCER STEM CELL MARKERS:
CLASSIFICATION AND THEIR SIGNIFI-
CANCE IN CANCER STEM CELL**

Jennifer Tarakmi, Shimon Knutsen,
John Mayfield, Small Susaye, Bela Balint,
Waseem Ashgar and Mirjana Pavlovic 21

**DIFFERENT APPROACHES FOR
ANTICANCER THERAPY**

Karl Schreiber, Bela Balint and Mirjana Pavlovic 31

**SAVREMENI KRITERIJUMI ZA IZBOR
DAVALACA KRV I / HEMOPRODUKATA**

Dušan Vučetić, Bela Balint, Gordana Ostojić,
Marika Ljubenov, Dragana Jovičić-Gojkov 49

**TERAPIJSKE IZMENE PLAZME U LEČENJU
IMUNONEUROLOŠKIH BOLESNIKA**

Gordana Ostojić, Marika Ljubenov, Milena
Todorović-Balint, Dragana Obradović, Dragana
Jovičić-Gojkov, Bela Balint 57

**INAKTIVACIJA / REDUKCIJA PATOGENA U
KRV I / HEMOPRODUKTIMA**

Dragana Jovičić-Gojkov, Gordana Ostojić, Milena
Todorović-Balint, Dušan Vučetić, Nataša Rafajlovski,
Bela Balint 63

**PRIMENA D-DIMERA U DIJAGNOZI VENSKOG
TROMBOEMBOLIZMA U TRUDNOĆI**

Mirjana Kovač 71

**PERIOPERATIVNO TRANSFUZIOLOŠKO
ZBRINJAVANJE BOLESNIKA SA HEMA-
TOLOŠKIM POREMEĆAJIMA**

Ana Antić, Zoran Stanojković79

**LIMFOMI U TRUDNOĆI – DIJAGNOSTIČKO
TERAPIJSKI PRINCIPI**

Milena Todorović-Balint, Katarina Jeremić,
Bela Balint, Vesna Kesić, Darko Antić, Jelena Bila,
Boško Anđelić, Aleksandra Sretenović, Vladislava
Đurašinović, Jelena Jeličić, Vojin Vuković,
Biljana Mihaljević83

**TROMBOZNE MIKROANGIOPATIJE I INDIKA-
CIJE ZA TERAPIJSKU IZMENU PLAZME**

Ivana Urošević, Bela Balint, Borivoj Sekulić, Ivana
Milošević, Nebojša Rajić, Ivanka Savić, Aleksandar
Savić, Nada Vlasisavljević, Marina Dokić 87

**INOVATIVNO ZBRINJAVANJE TRUDNICE SA
HIPERLIPIDEMIJOM UPOTREBOM
APARATURE ZA SPAŠAVANJE KRV I –
PRIKAZ SLUČAJA**

Marija Vraneš, Gordana Ostojić, Zvezdana Lojpur,
Bela Balint 93

INTRAOSEALNA INFUZIJA KOD ODRASLIH

Milić Veljović, Ivo Udovičić, Ana Popadić, Ivana
Krstić Lečić, Miodrag Stevović 97

PERKUTANA TRAHEOTOMIJA

Uroš Petrović, Milić Veljović, Igor Vasković,
Nevena Radović, Goran Rondović 103

SEROTONINSKI SINDROM I ANESTEZIJA

Goran Rondović, Ana Popadić, Milić Veljović, Uroš
Petrović, Igor Vasković, Nevena Radović 107

**ULOGA ANESTEZIOLOŠKOG TIMA U
SPREČAVANJU BOLNIČKIH INFEKCIJA**

Igor Vasković, Milić Veljović, Nevena Radović,
Uroš Petrović111

**ZNAČAJ INICIJALNE ANTIBIOTSKJE TERAPIJE
U JEDINICI INTENZIVNOG LEČENJA**

Nevena Radović, Milić Veljović, Igor Vasković,
Uroš Petrović115

UPUSTVO 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 Uredivački odbor šalje recenzentima radi stručne procene. Ukoliko recenzenti predložu 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. Fina nisanje, 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 boldovanom reči "Uvod", "Cilj rada", "Metod rada", "Rezultati" i "Zaključak". Navesti najvažnije rezultate (numeričke vrednosti) statističke analize i nivo značajnosti.

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

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

Na sledećoj stranici priložiti kratak sadržaj na engleskom jeziku (Abstract) sa ključnim rečima (Key words), i to za radove u kojima je obavezan kratak sadržaj na srpskom jeziku, koji treba da ima

200-300 reči. Apstrakt na engleskom treba da ima istu strukturu kao i kratak sadržaj na srpskom.

Prevesti nazive tabela, grafikona, slika, shema, celokupni srpski tekst u njima i legendu.

Struktura rada: Svi podnaslovi se pišu velikim slovima i boldovano.

Originalni rad treba da ima sledeće podnaslove: uvod, cilj rada, metod rada, rezultati, diskusija, zaključak, literatura.

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

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

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

Za nazive lekova koristiti isključivo generička imena. Uređaji (aparati) se označavaju trgovačkim nazivima, a ime i mesto proizvođača treba navesti u obliku zagradama. 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 biokemijskih merenja navoditi u metričkom sistemu prema Internacionalnom sistemu jedinica (SI).

Obim rukopisa: Celokupni rukopis rada – koji čine naslovna strana, kratak sadržaj, tekst rada,

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

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

Tabele: Tabele se označavaju arapskim brojevima po redosledu navođenja u tekstu, sa nazivom na srpskom i engleskom jeziku. Tabele raditi isključivo u programu Word, kroz meni Table – Insert – Table, uz definisanje tačnog broja kolona i redova koji će činiti mrežu tabele. Desnim klikom na mišu – pomoću opcija Merge Cells i Split Cells – spajati, odnosno deliti ćelije. U jednu tabelu, u okviru iste ćelije, uneti i tekst na srpskom i tekst na engleskom jeziku – nikako ne praviti dve tabele sa dva jezika! Koristiti font Times New Roman, veličina slova 12 pt, sa jednostrukim proredom i bez uvlačenja teksta.

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

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

Fotografije: Fotografije se označavaju arapskim brojevima po redosledu navođenja u tekstu, sa nazivom na srpskom i engleskom jeziku. Za svaku fotografiju dostaviti tri primerka ili tri seta u odvojenim 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 zapisa. 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. Guidelines 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 tri primerka, zajedno sa CD - om na kome je snimljen identičan tekst koji je i na papiru. 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.

Adresa:

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

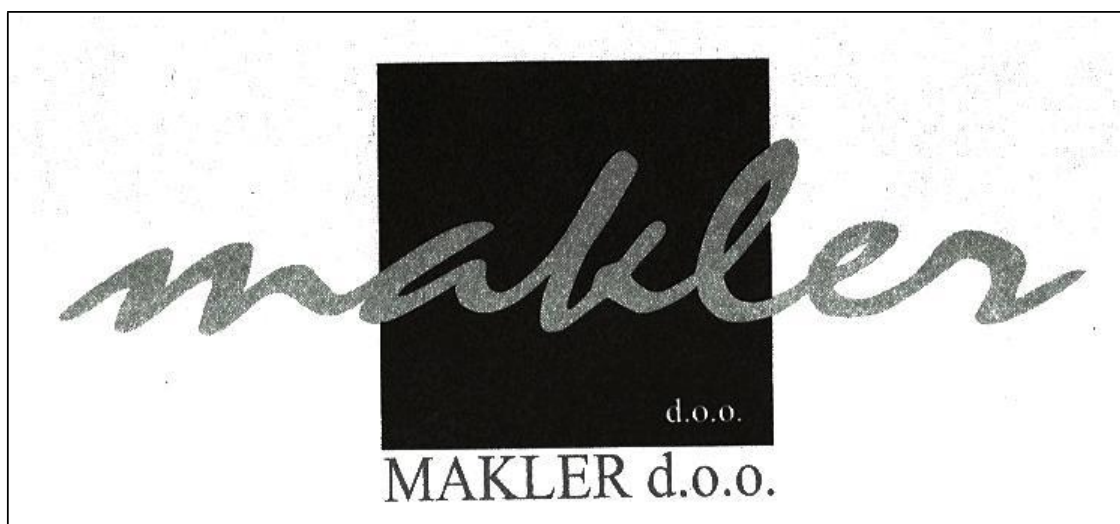
E-mail: udruzenjeart@gmail.com

Telefon glavnog urednika: 011 3615-015

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.







HEMOBIOLOGIJA I TERAPIJSKA PRIMENA KRVNE PLAZME I NJENIH KOMPONENTI / DERIVATA

Bela Balint^{1,2,3}, Miodrag Jocić¹, Milena Todorović-Balint⁴, Dušan Vučetić^{1,2}, Gordana Ostojić^{1,2},
Mirjana Pavlović⁵

¹Vojnomedicinska akademija, Beograd; ²Medicinski fakultet VMA, Univerzitet odbrane, Beograd;
³Institut za medicinska istraživanja, Univerzitet u Beogradu; ⁴Klinika za hematologiju, Klinički Centar
Srbije, Beograd; ⁵Department of Computer and Electrical Engineering and Computer Science, Florida
Atlantic University, Boca Raton, FL, USA.

SAŽETAK

Suština hemoterapije jeste rekonstitucija i održavanje homeostaze u krvotoku primenom krvi i/ili specifičnih hemoprodukata. Njenim izvođenjem, utiče se na volumen cirkulišuće krvi i kapacitet za vezivanje i transport kiseonika, hemostazne funkcije krvi i aktivnost medijatora imunskog odgovora. Hemoterapija u širem smislu reči – pored nadoknade transfuzijama – podrazumeva primenu aferez-nih procedura kojima se postiže otklanjanje i/ili zamena ekscesnih količina i/ili patološki izmenjenih krvnih sastojaka. Ovi terapijski postupci – transfuzije i afereze – omogućavaju izmene strukture cir-kulišuće krvi. Primena hemobiološki aktivnih materija (npr. faktori rasta hematopoeze, prečišćeni ili rekombinantni činioci koagulacije) i pasivno unošenje medijatora/modulatora (npr. citokini) u krvotok primaoca dovode do promena funkcija krvi. Pravovremeno izvođenje hemoterapije omogu-ću-je značajno smanjenje morbiditeta i mortaliteta bolesnika. Međutim, treba naglasiti da ovi terapijski postupci ne predstavljaju etiološki, već suportivni metod lečenja. Cilj ovog rada je sažeto prikazivanje saznanja vezanih za hemoterapiju poremećaja hemostaze.

Ključne reči: hemoterapija, plazma, krioprecipitat, fibrinski lepak, hemoragijski sindrom.

U normalnim uslovima, a donekle i u stanjima narušene fiziološke ravnoteže, zahvaljujući post-ojanju i delovanju različitih plazmatskih sistema – koagulacija, fibrinoliza, komplement i ka-likrein-kinin – uključenih u procese i/ili regu-laciju hemostaze omogućeno je sprečavanje gubitka krvi iz "intaknih" krvnih sudova, odnos-no zaustavljanje krvarenja iz povređenog krvnog suda. Njeno funkcionisanje se ostvaruje posredstvom ekstravaskulnih, vaskulnih i in-travaskulnih (trombociti i činioci, odnosno in-hibitori koagulacije) faktora. Tokom procesa koagulacije se pod dejstvom enzima i kofaktora odigravaju karakteristične reakcije, čiji je krajnji rezultat pretvaranje rastvorljivog fibrinogena u nerastvorljive i stabilne polimere fibrina.

Funkcionisanje hemostaze ostvaruje se posredstvom ekstravaskulnih, vaskulnih i in-travaskulnih (trombociti i činioci/stimulatori, od-nosno inhibitori koagulacije) činilaca. Tokom procesa koagulacije se pod dejstvom enzima i kofaktora odigravaju karakteristične reakcije, čiji je krajnji rezultat pretvaranje rastvorljivog fibri-

nogena u nerastvorljive i stabilne polimere fibri-na. Neki procesi hemostaze mogu uticati na regu-laciju i drugih hemobioloških sistema/aktivnosti – doprinos proliferaciji ćelija, brže zarastanje rana i drugo. U fiziološkoj ravnoteži (homeosta-zi) hemostaze, po pravilu, istovremeno su ak-tivisani spomenuti plazmatski sistemi. Tako, čin-ioci ili faktori koagulacije deluju u sadejstvu sa plazmatskim inhibitorima – kao što su, antitrom-bin III (AT-III), heparinski kofaktor II, inhibitor tkivnog puta aktivacije (Tissue Factor Pathway Inhibitor [TFPI]), proteini S i C – ali i sa trom-bocitima. Najzad, hemostaza učestvuje i u nekim nehemostatskim reakcijama i procesima, kao što je regulacija ćelijske proliferacije i zarastanja rana (1–12).

Generalno, hemoterapija bolesnika sa sklonošću ka krvarenjima (hemoragijska diateza) i/ili trom-bozama (trombofilija) podrazumeva primenu: a) hemoprodukata koji sadrže hemostatski aktivne sastojke – plazmu ili plazmatske kompen-ten-derivate (fibrinogen, faktore koagulacije [FVIII, FIX, FXI i FXIII]) u koncentrovanom

obliku (12–55), krioprecipitat (56–60), ili AT–III (1–4, 61); b) koncentrovanih trombocita (KT) (5, 13, 17, 31, 35, 59) i c) rekombinantnih analoga činilaca koagulacije (62–72). Cilj ovog pregleda inostrane i domaće literature, sa kratkim osvrtom na sopstvene rezultate, je prikaz osnovnih saznanja o etiopatogenezi nekih poremećaja hemostaze, uz opis i fizikohemijskih karakteristika i terapijske primene pojedinih hemoprodukata sa hemostatskim delovanjem.

Osnovni poremećaji hemostaze – transfuziološki pristup

Od poremećaja hemostaze biće spomenuti samo oni najznačajniji iz aspekta suportivne hemoterapije. Uopšteno posmatrano, oni se mogu manifestovati kao dijateza ka krvarenjima (hemoragije) ili sklonost ka trombozama (trombofilija). Krajnje pojednostavljeno, hemoragijski sindromi su spontana, patološki duga ili obilna krvarenja. Oni mogu biti latentni ili manifestuju se tek u sadejstvu pridruženih činilaca, ako što su povreda, hirurška intervencija, uzimanje lekova koji utiču na hemostazu. Koagulopatije se dele na nasledne (po pravilu deficit jednog činioca) i stečene poremećaje (obično snižena aktivnost više činilaca). Najčešći uzroci ovih poremećaja su smanjena sinteza (insuficijencija hepatocita, nedostatak vitamina K, predoziranje dikumarola) i utrošak činilaca (diseminovana intravaskulna koagulacija – DIK) (3–7, 22).

Urođeni deficit prokoagulantne aktivnosti VIII činioca (FVIII:C) rezultuje hemofilijom A – incidenca = 5/100 000 osoba (3). Osnovna uloga aktivisanog FVIII (molekulska masa = 300 kD) je da deluje kao kofaktor FIXa tokom konverzije F X u F Xa – ubrzavajući tu kataliznu reakciju čak za oko 300 000 puta (2–64). Na osnovu težine deficita (aktivnost je izražena u internacionalnim jedinicama – IJ), poremećaj se razvrstava u: teški oblik hemofilije A sa aktivnošću FVIII:C do 0,01 IJ/mL; srednje teški oblik u kome je aktivnost FVIII:C između 0,02 i 0,04 IJ/mL i blagi oblik sa aktivnošću FVIII:C 0,05–0,25 IJ/mL (1–8, 65, 66).

Poznat je još jedan blagi oblik bolesti sa aktivnošću FVIII:C između 0,25 i 0,40 IJ/mL – poremećaj se obično otkriva samo pri većim hirurškim procedurama ili težim povredama (1–8, 66). Jedna IJ odgovara aktivnosti nekog činioca koagulacije (tako i FVIII:C) koja je prisutna u jednom mL normalne plazme (12). Podrazumeva se da su učestalost, lokalizacija i težina krvarenja

kod bolesnika sa hemofilijom A – bez primetnih povreda ili posle njih, odnosno u toku hirurških procedura – u direktnoj proporciji sa preostalom aktivnošću FVIII:C (1–3, 7). Oko 50% bolesnika ispoljava teški, oko 10% umereni, dok oko 40% blagi oblik bolesti (64). Tokom lečenja bolesnika sa hemofilijom A osnovni ciljevi nadoknadne (suportivne) terapije su sprečavanje ili lečenje krvarenja i svođenje na minimum njenih komplikacija radi obezbeđenja maksimalne socijalne integracije obolelog. To je moguće postići adekvatnom nadoknadom FVIII:C, uz izvođenje odgovarajuće fizikalne terapije (3–7). Generalno, za uspešnu nadoknadu FVIII:C i prevenciju sekvela, od posebnog su značaja što raniji početak, optimalno doziranje i dovoljno dugo trajanje hemoterapije (22).

U von Willebrandovoj bolesti postoji kvalitativni deficit ili poremećaj aktivnosti vWF, često uz smanjenju aktivnost i FVIII:C. Kod ovih bolesnika postoji smanjena adhezivnost trombocita na subendotelsko tkivo (produženo vreme krvarenja), uz moguće prisustvo i poremećaja koagualcije zbog poremećaja "transporta" FVIII posredstvom vWF (produženo aktivisano parcijalno tromboplastinsko vreme – aPTT) (12). Težina kliničke slike ove bolesti, pored smanjene koncentracije, zavisi i od stepena polimerizacije vWF. Ukoliko ne dolazi do stvaranja polimera vWF željene molekulske mase, nastupiće deficit adhezivnosti trombocita, sa sledstvenim poremećajima primarne hemostaze. Iako težina i lokalizacija krvarenja zavise, uglavnom, od tipa bolesti (kojih inače ima tri), oboljenje se najčešće odlikuje krvarenjima iz sluznica – menoragijama, gastrointestinalnim krvarenjima, epistaksom (3–7, 19, 42, 67).

Poznat je i poseban kombinovani poremećaj koagulacije sa istovremenim deficitom FVIII i F V. Reč je o autosomnom poremećaju, tj. mutaciji gena označenog kao ERGIC–53 na hromozomu 18q. Zahvaćene osobe ispoljavaju umerenu sklonost ka krvarenjima usled deficita (oko 5 – 30%) koncentracije antigena i funkcionalne aktivnosti FVIII i F V. Inače domen B proteina FVIII i F V pokazuju veliki stepen homologije u pogledu sastava aminokiselina (5–8, 64).

O prisustvu inhibitora faktora koagulacije (na primer, FVIII:C) u krvi bolesnika je takođe saopštavano (42, 65, 69–75). Radi se o aloantitelima IgG, a specifičnosti anti–FVIII:C, čija incidenca iznosi 10% do 20%. Stvaranje inhibitora, među ostalima, zavisi od vrste defekta FVIII. Tako, teži genski defekti (na primer, velike dele-

cije i inverzija) rezultuju kompletnim odsustvom proteina FVIII, sa sledećim velikim rizikom (oko 35 – 40%) formiranja inhibitora. Manji defekti (manja delecija) izazivaju, uglavnom, samo funkcionalne poremećaje, a ne i odsustvo proteina FVIII – te je i rizik od stvaranja inhibitora manji, iznosi 5 – 10% (64). Pojava inhibitora je udružena s težim hemoragijama koje slabo ili uopšte ne reaguju na nadoknadnu terapiju FVIII:C. Inhibitori se stvaraju uglavnom kod bolesnika sa teškim oblikom hemofilije, lečenih alogenim hemoproduktima. Izuzetno retko mogu nastati autoantitela (kod osoba bez deficita proteina FVIII) u sklopu autoimunskih (na primer, sistemski eritemski lupus i reumatoidni artritis) i limfoproliferativnih poremećaja (69–73, 75).

Deficit IX činioca (FIX) može biti nasledni (hemofilija B) ili stečeni poremećaj. Bolesnici sa teškom hemofilijom B ispoljavaju spontana krvarenja (hemartroze). Oni sa blažim oblikom bolesti obično imaju krvarenja samo nakon povreda ili u toku hirurških procedura. Stečeni deficit aktivnosti FIX je najčešće u sklopu deficita protrombinskog kompleksa (poremećaj funkcije hepatocita, nedostatka vitamina K, predoziranja preparata oralnih antikoagulanasa ili utrošak FIX. Prisustvo inhibitora – aloantitela anti-FIX – je retka (incidenca = 1 – 2%) pojava (1–7, 22, 66, 70, 71).

Snižena plazmatska koncentracija fibrinogena i afibrinogenemija takođe može biti nasledni ili stečeni poremećaj (1–3, 13, 16, 17). Prvi je veoma redak i ispoljava se krvarenjima, uglavnom, već u peripartalnom periodu. Stečeni deficit posledica je smanjene sinteze ili utroška (primarna fibrinogenoliza i DIK). U primarnoj fibrinogenolizi zbog pretvaranja plazminogena u plazmin (uz udruženi deficit antiplazmina) postoji pojačana razgradnja fibrinogena i fibrina – dok je broj trombocita u cirkulaciji, uglavnom, normalan (1–7, 22). Nasuprot tome, DIK je poremećaj hemostaze sa multiplim trombozama u mikrocirkulaciji usled sinteze ekscenih količina fibrina pod dejstvom trombina i pratećim krvarenjima zbog utroška činilaca koagulacije, odnosno "potrošne" trombocitopenije. Uz to, fibrinska vlakna mehanički oštećuju eritrocite (mikroangiopatska hemoliza i deformisani eritrociti ili šizociti) (1–7, 12).

Suprotno već spomenutim poremećajima (hemoragijske diateze), deficit aktivnosti AT-III, zatim proteina C ili S i drugih inhibitora udružen je sa pojavom recidivirajućih tromboza (9–11, 76–79).

AT-III se sintetizuje isto u jetri i – kao glavni prirodni antikoagulans – veoma je značajan za održavanje ravnoteže u procesima hemostaze. Inhibira funkciju trombina i nekih drugih činilaca koagulacije, ali i kalikreina, odnosno plazmina (22).

Svoje inhibišuće delovanje, AT-III osvaruje vezivanjem svog argininskog mesta za aktivni serinski ostatak trombina. Sledstveno vezivanje heparina za lizinski ostatak AT-III izaziva konfiguracione promene u molekulu i poboljšava ekspresiju njegovog argin-reaktivnog mesta. Na taj način, heparin treba smatrati kao poseban, veoma snažan akcelerator (za oko 1 000 puta) dejstva AT-III (77, 78). Opisani su poremećaji (urođeni i stečeni) sa deficitom koncentracije ili aktivnosti AT-III. Kod bolesnika sa urođenim deficitom AT-III prve tromboze se javljaju, po pravilu, u drugoj ili trećoj deceniji života. Funkcionalna aktivnost AT-III kod ovih bolesnika je oko 0,6 IU/mL plazme ili manje, obično uz istovremeno sniženje i koncentracije antigena AT-III. Stečeni deficit AT-III može biti posledica hipoprodukcije, gubitka iz cirkulacije ili potrošnje AT-III. Odlika ovih patoloških stanja je tendencija ka trombozama (trombofilija). Tromboze se najčešće javljaju u dubokim venama donjih ekstremiteta i male karlice i mogu izazvati tromboembolijske komplikacije (4–7, 77, 78).

Hemostatski aktivni plazmatski produkti

Plazmatski produkti koji sadrže FVIII i FIX u koncentrovanom obliku se dobijaju prečišćavanjem već nekoliko decenija. Međutim, u eri rekombinantnih plazmatskih proteina, sem u retkim situacijama, oni su više od istorijskog, nego praktičnog značaja u terapiji. Najbitne karakteristike najčešće korišćenih hemoprodukata – koncentrovanih činilaca i inhibitora koagulacije i glavne indikacije njihove upotrebe su prikazani u tabeli 1 (1–4).

Osnovni zahtevi kod hemostatski aktivnih hemoprodukta su: a) postizanje što većeg prinosa aktivne supstance; b) optimalan terapijski učinak, uz svodenje na minimum sporednih efekata i c) maksimalna redukcija rizika transmisije hematogenih bolesti. Produkti FVIII (kao i FIX) niske čistoće imaju specifičnu aktivnost oko 1 IU/mg proteina; produkti FVIII srednje čistoće 1–5 IU/mg; produkti FVIII visoke čistoće 100 – 150 IU ili više po mg proteina (1–3, 79–82).

Tabela 1.

Hemostatski aktivni hemoprodukti – osnovne karakteristike

činioci	efikasnost*	osnovna terapijska upotreba
fibrinogen	1 g/L	deficit fibrinogena
F II (u PK)	40 – 50%	stečeni deficit F II
F VII (sam ili u PK)	10 – 20%	nasledni/stečeni deficit F VII
FVIII:C	30 – 100%	hemofilija A
vWF	20 – 50%	von Willebrandova bolest
FIX	20 – 60%	hemofilija B, stečeni deficit FIX
F X	10 – 40%	nasledni/stečeni deficit F X
F XI	20 – 30%	nasledni deficit F XI
F XIII	oko 10%	nasledni deficit F XIII
AT-III	oko 60%	nasledni/stečeni deficit AT-III
fibrinski lepak (FL)	/	hemostatsko–adhezivni efekat
trombin	/	lokalni hemostatski efekat

*efikasnost = minimalna aktivnost koja je hemostatski zadovoljava.

Lečenje hemostatskih poremećaja zahteva da se najpre utvrdi deficitarni činilac, a potom kvantifikuje stepen smanjenja aktivnosti. Od toga zavisi izbor i doziranje hemostatskih hemoprodukta i trajanje lečenja. Terapiju treba započeti što ranije radi svođenja neželjenih sekvela na minimum. Inače, od hemoprodukata sa hemostatskom aktivnošću, najčešće se primjenjuju oni, koji sadrže FVIII:C, FVIII:C/vWF, FIX i fibrinogen.

Zamrznuta sveža plazma

ZSP je plazma izdvojena iz jedinice krvi ili prikupljena plazmaferozom i zamrznuta u roku od najkasnije 6 sati od uzimanja krvi na -90 ± 5 °C. Ona je uskladištena do terapijske upotrebe na temperaturi od -40 ± 5 °C najviše do godinu dana (1–3, 12). Volumen prosečne jedinice ZSP

iznosi 200 do 250 mL. Tako pripremljena ZSP sadrži sve labilne i stabilne činioce sistema koagulacije, ali i fibrinolize i komplementa, uz onkotski efikasne proteine i imunoglobuline (12–14, 47–55, 83).

Danas ZSP se relativno retko upotrebljava u terapiji, sem u posebnim situacijama (na primer, transplantacija jetre, globalnim deficitom činilaca hemostaze druge etiologije, itd). Ona može da služi kao izvor prilikom pripremanja plazmatskih derivata. Iako mišljenja u vezi opravdanosti terapijske primene ZSP nisu u potpunosti ujednačena i veoma su limitirane specifične indikacije njene upotrebe – poslednjih decenija nisu konstatovane bitne promene u zastupljenosti ovog krvnog produkta u hemoterapiji (4). Potvrđene i uslovno važeće indikacije za primenu ZSP date su u tabeli 2 (12, 17)

Tabela 2.

Indikacije za terapijsku primenu ZSP

potvrđene indikacije	uslovne indikacije
nadoknada činilaca koagulacije	masivna transfuzija
reverzibilan efekat varfarina	insuficijencija jetre
deficit vitamina K sa krvarenjem	kardiopulmonalna hirurgija
akutni DIK	
trombotska trombocitopenijska purpura	
deficiti inhibitora koagulacije	

Infuzija ZSP može biti od terapijske koristi kod bolesnika sa oštećenom funkcijom jetre ili deficitom vitamina K, odnosno predoziranja njegovih antagonista. Primena ZSP posle masivnih transfuzija skladištene krvi ili učestalih i intenzivnih izmena plazma opravdana je ukoliko su vrednosti protrombinskog vremena (PT) i aPTT

najmanje 1,5 puta produžene (12, 83). Uobičajena doza za terapiju bolesnika sa deficitom F V iznosi oko 10 mL/kg svakih 12 sati, a sa deficitom F XI 5–10 mL/kg svakih 24 sata (1–3, 14, 79, 83). Ostali pojedinačni deficiti činilaca koagulacije efikasnije se koriguju ubrizgavanjem koncentrovanih preparata. U tretmanu trom-

botsko-trombocitopenijske purpure (TTP) ili hemolizno-uremijskog sindroma (HUS) izmenom plazme, nadoknadne tečnosti izbora su ZSP i plazma siromašna u krioprecipitatu sl (1–4). Naprotiv, primena ZSP, kao "ekspandera" volumena cirkulišuće krvi nakon krvarenja, zatim kao izvora hranljivih supstanci ili "stimulatora" zarastanja rana nije opravdana (12, 47–55, 83).

Na kraju, ukoliko vrsta deficitarnog činioca kod bolesnika koji masivno krvari nije mogla biti utvrđena, dozvoljena je infuzija ZSP radi brzog postizanja hemostatskog efekta, ali treba voditi računa o zapremini ZSP – da ne bi došlo do preopterećenja cirkulacije i trovanja citratom (1–4).

Krioprecipitat

Krioprecipitat sadrži plazmatske proteine u koncentrovanom obliku koji su izdvojeni taloženjem u toku odmrzavanja ZSP na temperaturi od 4 ± 2 °C. U krioprecipitu je prisutno približno 50% početne (plazmatske) količine FVIII:C, 70% vWF, 35 – 50% fibrinogena i 30% F XIII, a zavisno od vrste, 1 – 5% ostalih činilaca koagulacije (V, VII, IX, X, XI i XII), uz terapijski efikasnu količinu fibronektina. Pripremljeni krioprecipitat može biti čuvan na temperaturi -40 ± 5 °C do terapijske upotrebe, najviše do godinu dana (12– 17, 56–60).

Prema važećim standardima AABB, aktivnost FVIII:C po jedinici krioprecipitata treba da iznosi 80 IU ili više (2). Iako nije više terapijsko sredstvo izbora, krioprecipitat se primenjuje ponekad u lečenju bolesnika sa hemofilijom A – ukoliko nam ne stoji na raspolaganju inaktivisani komercijalni (rekombinantni ili prečišćeni) preparat FVIII:C. Inače, broj potrebnih jedinica krioprecipitata za terapiju bolesnika moguće je izračunati na osnovu stepena deficita, sadržaja aktivne supstance (fibrinogena i/ili FVIII:C) po jedinici krioprecipitata i koristeći sledeće jednačine (1–4):

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

Zbog visokog sadržaja fibronektina, krioprecipitat se uspešno primenjuje i u lečenju bolesnika sa sepsom, teškom traumom ili opekotinom (12, 79). Izvođenjem krioprecipitacije plazme (posebno reciklažne modifikacije osnovnog metoda), moguće je pripremati kvalitetni FL za lokalnu terapijsku primenu. Tako, moguće je tvrditi da je primena krioprecipitata danas opravdana za nadoknadu fibrinogena i prilikom pripremanja FL (1–3, 56–60).

Predoziranje krioprecipitata može 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 (1). Inače, slično kao kod upotrebe ZSP, ni u korišćenju krioprecipitata nisu uočene veće razlike poslednjih nekoliko godina u zemljama sa razvijenom zdravstvenom službom – iako danas stoje na raspolaganju komercijalni produkti pojedinih činilaca koagulacije, kao i njihovi rekombinantni analozi (4).

Rekombinantni činioci koagulacije

Uvođenjem biotehnologije u medicinu, stvoreni su uslovi za bolje dijagnostikovanje, etiopatogenetsko tumačenje i uspešnije zbrinjavanje mnogih patoloških stanja, među kojima su i neki poremećaji hemostaze. Biotehnologija se danas široko primenjuje i u produkciji korisnih proteina u visokoprečišćenom stanju i u dovoljnim količinama – kako za laboratorijske potrebe, tako i za terapijsku upotrebu.

Biotehnološku proizvodnju različitih biološki aktivnih supstanci – na primer, rekombinantni hormoni, citokini, činioci koagulacije i drugo – karakterišu: a) veća efikasnost proizvodnje; b) bolji kvalitet i c) praktično nemogućnost transmisije virusa. Zahvaljujući značajnom napretku na polju molekulske medicine tokom poslednje decenije, danas stoje na raspolaganju visokoprečišćeni rekombinantni činioci koagulacije za kliničku upotrebu, kao što su rHu VIIa, rHuFVIII i rHuFIX. Utvrđeno je da su biološka svojstva (prokoagulantna aktivnost, imunske karakteristike poludoba boravka u cirkulaciji ili t_{50} i druga svojstva) rekombinantnih i prirodnih činilaca koagulacije identična. Čistoća rekombinantnih produkata (u odnosu na preparate prečišćene iz humane plazme) mnogostruko je veća (62–66, 84–88).

Biotehnologija, osim što omogućava produkciju biološki aktivnih proteina koji se normalno nalaze u prirodi, omogućava još izmenom na nivou gena i produkciju modifikovanih biološki aktivnih peptida (promena tkivne specifičnosti, smanjenje štetnih efekata, bolja apsorpcija, duži poluživot, povećanje neke od funkcija i za više desetina puta) (1–4). Takođe je moguće konstruisati potpuno nove peptide koji kao takvi nigde u prirodi ne postoje. Godine 1986. je prvi put uspešno primenjen preparat rHuFVIIa kod bolesnika sa hemofilijom i visokim titrom inhibitora tokom hirurške intervencije. Prilikom teških krvarenja ili izvođenja složenih hirurških intervencija, povoljan terapijski učinak se postiže u oko 70 – 100% bolesnika posle infuzije rHuFVIIa u dozi od 70 – 100 µg/kgtm svakih dva do tri sata, zavisno od kliničkog odgovora. Uprkos dilema oko optimalnih doza, klinička iskustva sa rHuFVIIa su pozitivna (62, 65, 69). Godine 1984. uspešno je kloniran gen za FVIII. Molekul rHuFVIII (kao novi "biološki lek") predstavlja najveći (MM oko 80 kD) i najsloženiji biotehnološki produkovan humani protein. Treba naglasiti da je proizvodnja rHuFVIII ekonomski opravdana, tim pre što su potrebe za lečenje hemofilijara velike. Za izračunavanje potrebnih doza rHuFVIII treba koristiti jednačine za proračun potrebnih jedinica FVIII. Doze rHuFVIII pri blagim krvarenjima treba da iznose oko 10 jedinica/kgtm, a tokom tretmana bolesnika sa teškim krvarenjima i do 50 jedinica/kgtm. Upotreba rHuFVIII može biti efikasna i u tretmanu bolesnika sa inhibitorom FVIII. Doze treba kalkulisati na osnovu kliničkog odgovora bolesnika. Zbog prisustva u tragu animalnih proteina u preparatu rHuFVIII (poreklom iz ćelijskog sistema za ekspresiju gena FVIII) – nakon njegove višekratne administracije, moguće su alergijske i druge (lokalne i/ili sistemske) reakcije (41–64, 86).

Uprkos tome što je gen za FIX prvi kloniran (1982. godine) – preparat rHuFIX nije u širokoj rutinskoj terapijskoj upotrebi. Takvo stanje proizlazi iz sledećih činjenica: a) snabdevanje prirodnim koncentrovanim FIX zadovoljava potrebe za tretman bolesnika sa hemofilijom B i b) prinos rHuFIX biotehnološkim metodom je relativno skroman (84–86).

Fibrinski lepak

Mehanizmi terapijske, odnosno zaceljujuće akcije FL su, uglavnom, poznati. Po aplikaciji, najpre će doći do konverzije fibrinogena u solubilne fibrinske monomere usled kataliznog delovanja trombina. Stvoreni monomeri će potom pod dejstvom FXIII i kalcijumovih jona biti pretvoreni u mrežu nesolubilnih fibrinskih polimera. S tim u vezi, prvo nastupa redukcija električnih naboja, a potom stvaranje stabilnih unakrsnih veza između molekula fibrina, sa sledstvenim ispoljavanjem adhezivnog učinka fibrina na površini na kojoj je aplikaciran. Fibronektin pospešuje polimerizaciju fibrina, ali i migraciju ćelija, akciju fibroblasta i reepitelizaciju. Uprkos postojanju nekih, nepotpuno rešenih problema vezanih za produkciju FL iz plazme pojedinačnih davalaca, i tim postupcima je moguće pripremati kvalitetan FL. Procedure pripremanja FL iz alogene plazme pojedinačnih davalaca su jednostavne, lako izvodljive, redukuju rizik od transmisije virusa i omogućuju neposredno raspolaganje sa produktom. Ipak, prednost treba dati autolognom FL, čija upotreba potpuno eliminiše rizik transmisije bolesti i obezbeđuje imunološku podnošljivost. Iskustva ukazuju da je FL potentan hirurški hemostazni i adhezivni agens, koji može biti upotrebljen ne samo za hemostazu na difuzno krvarećoj-vlažećoj rani, nego i za "zaptivanje" poroznih vaskulnih graftova. Upotreba komercijalnog FL udružena je sa rizikom transmisije virusnih infekcija. Dok ne bude rešen problem obezbeđenja sigurnih komercijalnih preparata, upotreba autolognog ili pojedinačnog alogenog FL bi trebalo da bude što je moguće šira, što neće biti moguće ukoliko se transfuziološki centri ne osposobe za proizvodnju autolognog i pojedinačnog alogenog FL. U ovom saopštenju prikazana su najvažnija saznanja o fizičko-hemijskim svojstvima i mehanizmima biološke akcije FL, alternativnim postupcima pripremanja FL, uz kratak osvrt na indikacije njegove primene (89–95).

Prema tome, FL je dvokomponentni sistem, namenjen postizanju lokalnog hemostatskog, adhezivnog, "zaptivnog" i još nekih efekata. Tako, može služiti i kao "matriks" za lokalnu aplikaciju faktora rasta fibroblasta, antibiotika i drugih materija (Tabela 3)

Tabela 3.

Klinička upotreba FL

Hemostatska svojstva

- kardiovaskulna i torakalna hirurgija; traumatologija (povrede jetre i slezine); oralna hirurgija (poremećaji koagulacije); zbrinjavanje ulkusa želuca; obrada vaskulnih kalemova

Adhezivna svojstva

- neurohirurgija; otolaringologija; plastična hirurgija (opekotine kože); urološka rekonstitutivna hirurgija

Zaptivna svojstva

- zaptivanje bronhopleuralnih fistula; matriks pri obradi defekata kostiju

Matriks

- * lokalna (dozirana) aplikacija faktora rasta, antibiotika i dr.

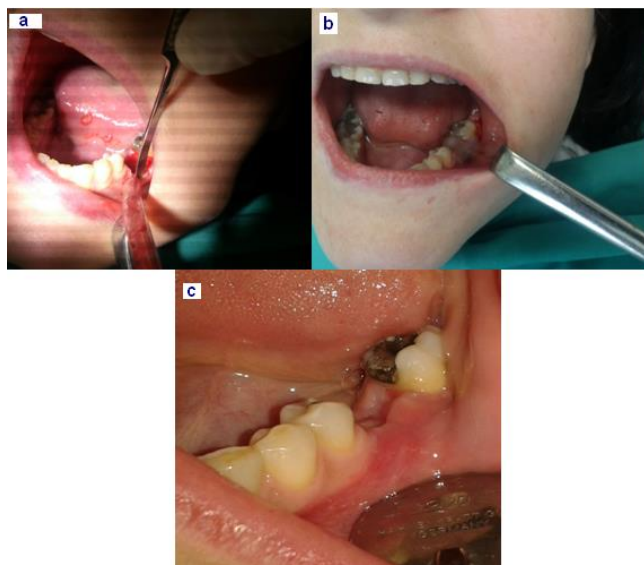
Produktu FL mogu biti dodati i egzogeni anti-fibrinolizni agensi, najčešće inhibitori plazmina, kao što su aprotinin, traneksamična kiselina i drugi (89). S obzirom na to da se radi o produktu prirodnog, a najvećim delom i humanog porekla – FL nije tkivno-toksičan, biodegradabilan je, a pojava hetero- ili aloantitela po njegovoj primeni je retka. Svojstva FL su u velikoj meri determinisana sadržajem fibrinogena, F XIII i fibronektina – ali i drugih konstituenata (4, 89–91).

Komercijalni preparati FL imaju svoje povoljne osobine: a) bogatstvo u fibrinogenu; b) efikasnost i standardizovanost – uniformni sadržaj sastojaka i c) uvek su na raspolaganju. Njihovi nedostaci su rizik od hematogenih virusnih bolesti (pripremaju se iz pulovane plazme) i visoki troškovi proizvodnje (5, 89). Zbog toga, treba neprekidno raditi na uvođenju i usavršavanju alternativnih postupaka (od pojedinačnih ili autoloških davalaca) pripremanja

fibrinogena za FL. U praktičnom radu, najčešće se koriste postupci bazirani na precipitaciji proteina. Precipitaciju fibrinogena (ali i drugih sastojaka FL) moguće je postići upotrebom niskih temperatura (krioprecipitacija) ili neutralnih soli, organskih rastvarača, jona metala, organskih katjona, masnih kiselina ili posebnih polimera, kao precipitišućih agenasa. FL je efikasan kod bolesnika sa urođenom ili arteficialnom koagulopatijom pri izvođenju različitih hirurških procedura (4, 89–91). U slici 1 je prikazana primena FL kod resekcije jetre. Takođe, u slici 2a-c su vidljivi rezultati primene FL kao matriksa faktora rasta poreklom iz trombocita ili Platelet-Derived Growth Factor – PDGF). Naime komponenta 1 FL je bio obogaćen trombocitima (dobijenim ultra-rapidnim centrifugovanjem standardne jedinice KT) kod bolesnice sa perzistentnim defektom zarastanja rane – tri nedelje posle vađenja zuba (95).



Slika 1. Primena FL kao hemostazno-zaptivnog sistema kod parcijalne resekcije jetre.
(Balint B, et al. 1996.)



Slika 2a-c. FL kao hemostazno-zaptivni sistem i matriks za dozirano oslobađanje PDGF.
(Balint B, et al. Transf Apher Sci 2014; 51: 221–2.)

Terapijskom upotrebom FL moguće je poboljšati kvalitet poroznih vaskulnih kalemova, što je od posebnog značaja za kardiohirurške bolesnike, tretirane heparinom (89, 90). Ispoljavajući lokalni hemostatski i adhezivni, odnosno "zaptivni" efekat, upotreba FL može doprineti smanjenju zahteva za krv i/ili hemoprodukte i znatnom skraćenju trajanja hirurških procedura (4, 93). Kod kardiorakalnih hirurških procedura, FL je uspešno upotrebljen (aplikacijom u vidu spreja pre zatvaranja grudnog koša) za sanaciju mikrovaskulnih krvarenja iz anastomoza ili sa mesta uvođenja kanila, zatim pri implantaciji sintetskih zalistaka i u redukciji volumena medijastinalne drenaže (89). Od značaja su saopštenja o korišćenju FL za "pretretman" dakronskih vaskulnih kalemova i zbrinjavanje manjih vaskulnih krvarenja, defekata nastalih ubodom igle i sitnih vaskulnih anastomoza. U grudnoj hirurgiji se saopštava o

odličnim rezultatima lečenja pomoću FL kod eksperimentalnih prodora vazduha u intrapleuralni prostor pri povredi pluća i pneumotoraksa (život injski eksperimentni model). Pored toga, prikazan je i uspeh primene FL u terapiji bronhijalnih fistula rezistentnih na uobičajenu terapiju, uključujući i zračenje. Od potencijalnih sporednih efekata primenjenog FL treba spomenuti rizik od transmisije uzročnika hematogenih infekcija (komercijalni FL). Sinteza hetero/aloantitela protiv konstituenata je retka, ali moguća komplikacija. Ona su, uglavnom, usmerena protiv trombina i rezidualnog činioca V bovinog porekla.

Tromboze, prilikom nepažljive aplikacije – intravenskog prodora FL – teoretski su moguće (posebno pri kardiopulmonalnim intervencijama). Najzad, interpozicija FL između spojenih nervnih završetaka ili kostiju može dovesti (teoretski) do smetnji oporavka nerava ili koštanog tkiva (4, 89–91).

LITERATURA

1. Balint B, Radović M, Ciko Z, Milenković Lj, Đurić D, Đuričković V. Hemoterapija hemoragijskih sindroma. Vojnosanit pregl 1985; 42: 39–43.
2. Balint B, Taseski J. Terapijska primena hemoprodukata i njihovih alternativa kod poremećaja hemostaze. Beograd: UdruženjeART Jugoslavije, 2001.
3. Balint B. Principi intenzivne hemoterapije. Beograd: GŠ–SCG i VMA; 2004.
4. Balint B, Vucetic D, Ostojic G, Ljubenov M. Osnovi transfuziologije sa hemobiologijom. Beograd: Medicinski fakultet VMA – Medija centar Odrana; 2014.



5. Klein HG, Anstee DJ. Mollison's Blood Transfusion in Clinical Medicine. 12th ed. Oxford: Wiley–Blackwell, 2014.
6. Roback JD, Grossman BJ, Harris T, Hillyer CD. Technical Manual, 17th ed. Bethesda: AABB Press; 2011.
7. Greer JP, Foerster J, Lukens JN, editors. Wintrobe's Clinical Hematology, 11th edition. Philadelphia: Lippincott Williams and Wilkins; 2004.
8. Hoffman R, Benz EJ, Shattil SJ, editors. Hematology: Basic Principles and Practice, 3rd edition. New York: Churchill Livingstone; 2000.
9. Provan D. ABC of clinical haematology, 2nd edition. London: BMJ Books; 2003.
10. 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.
11. van 't Veer C, Golden NJ, Kalafatis M, Mann KG. Inhibitory mechanism of the protein C pathway on tissue factor–induced thrombin generation. Synergistic effect in combination with tissue factor pathway inhibitor. *J Biol Chem* 1997; 272: 7983–94.
12. Hakim N, Canelo R. Haemostasis in surgery. London: Imperial College Press; 2007.
13. 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.
14. Evatt BL, Austin H, Leon G, Ruiz–Saez A, De Bosch N. Haemophilia therapy: assessing the cumulative risk of HIV exposure by cryoprecipitate. *Haemophilia* 1999; 5: 295–300.
15. Srivastava A. Factor replacement for haemophilia – should cryoprecipitate be used? *Haemophilia* 1999; 5: 301–5.
16. Thompson HW, Touris S, Giambartolomei S, Nuss R. Treatment of congenital afibrinogenemia with cryoprecipitate collected through a plasmapheresis program using dedicated donors. *J Clin Apheresis* 1998; 13: 143–5.
17. Poterjoy BS, Josephson CD. Platelets, frozen plasma, and cryoprecipitate: what is the clinical evidence for their use in the neonatal intensive care unit? *Semin Perinatol* 2009; 33: 66–74.
18. Mitra B, Mori A, Cameron PA, Fitzgerald M, Paul E, Street A. Fresh frozen plasma (FFP) use during massive blood transfusion in trauma resuscitation. *Injury* 2010; 41: 35–9.
19. Federici AB, Mannucci PM. Optimizing therapy with factor VIII/von Willebrand factor concentrates in von Willebrand disease. *Haemophilia* 1998; 4 (3 Suppl): 7–10.
20. Farrugia A, Robert P. Plasma protein therapies: current and future perspectives. *Best Pract Res Clin Haematol* 2006; 19: 243–58.
21. Gastineau DA, Moore SB. How important are ABO–related variations in coagulation factor levels? *Transfusion* 2001; 41: 4–5.
22. Hellstern P. Fresh–frozen plasma, pathogen–reduced single–donor plasma or bio–pharmaceutical plasma? *Transfus Apher Sci* 2008; 39: 69–74.
23. Agrawal YP, Dzik W. The vWF content of factor VIII concentrates. *Transfusion* 2001; 41: 153–4.
24. Hedner U, Erhardtsen E. Potential role for rF VIIa in transfusion medicine. *Transfusion* 2002; 42: 114–24.
25. Svendsen MS, Kristensen AT, Bochsén L, Salado–Jimena JA, Johansson PI. The in vitro effect of recombinant factor VIIa on coated platelet formation and clot dynamics of stored platelet concentrates. *Transfusion* 2009; 49: 2186–94.
26. Galan AM, Reverter JC, Pino M, Vinas M, Bozzo J, Hernandez MR, et al. Concentrates containing factor IX could improve haemostasis under conditions of thrombocytopenia: studies in an in vitro model. *Vox Sang* 2002; 82: 113–8.
27. Bruce D, Nokes TJ. Prothrombin complex concentrate (Beriplex P/N) in severe bleeding: experience in a large tertiary hospital. *Crit Care* 2008; 12: R105.
28. Hornsey V, Young D, Prowse C. Cryoprecipitate prepared from methylene blue–treated fresh plasma. *Transfusion* 2001; 41: 151–2.
29. Rock G, Berger R, Lange J, Tokessy M, Palmer DS, Giulivi A. A novel, automated method of temperature cycling to produce cryoprecipitate. *Transfusion* 2001; 41: 232–5.
30. 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.
31. Grellier P, Benach J, Labaied M, Charneau S, Gil H, Monsalve G, et al. Photochemical in-

- activation with amotosalen and longwavelength ultraviolet light of Plasmodium and Babesia in platelet and plasma components. *Transfusion* 2008; 48: 1676–84.
32. Atance R, Pereira A, Ramirez B. Transfusing methylene blue–photoinactivated plasma instead of FFP is associated with an increased demand for plasma and cryoprecipitate. *Transfusion* 2001; 41: 1548–52.
 33. Goodrich RP. The use of riboflavin for the inactivation of pathogens in blood products. *Vox Sang* 2000; 78 (2 Suppl): 211–15.
 34. Vamvakas EC, Blajchman MA. Transfusion–related mortality: the ongoing risks of allogeneic blood transfusion and the available strategies for their prevention. *Blood* 2009; 113: 3406–17.
 35. MacLennan S, Williamson LM. Risks of fresh frozen plasma and platelets. *J Trauma* 2006; 60(6 Suppl): S46–50.
 36. Solheim BG, Seghatchian J. Update on pathogen reduction technology for therapeutic plasma: an overview. *Transfus Apher Sci* 2006; 35: 83–90.
 37. Gentili G, Pisani G, Bisso G, Cristiano K, Wirz M, Mele C. Hepatitis C virus testing of plasma pools by nucleic acid amplification technology: external quality assessment. *Vox Sang* 2001; 81: 143–7.
 38. Pisani G, Cristiano K, Wirz M, Bisso G, Gentili G. Further evidence on the high proficiency of laboratories involved in plasma pool testing for HCV RNA by nucleic acid amplification technology. *Vox Sang* 2002; 82: 211–2.
 39. Liunbruno GM, Sodini ML, Grazzini G; Tuscan Transfusion System. Recommendations from the Tuscan Transfusion System on the appropriate use of solvent/detergent–inactivated fresh–frozen plasma. *Blood Transfus* 2008; 6: 25–36.
 40. Hoffer L, Schwinn H, Josic D. Production of highly purified clotting factor IX by a combination of different chromatographic methods. *J Chromatogr A* 1999; 844: 119–28.
 41. Smith JK. Quality of plasma for fractionation – does it matter? *Transfus Sci.* 1994; 15: 343–50.
 42. Alhumood SA, Devine DV, Lawson L, Nantel SH, Carter CJ. Idiopathic immune–mediated acquired von Willebrand's disease in a patient with angiodysplasia: demonstration of an unusual inhibitor causing a functional defect and rapid clearance of Von Willebrand factor. *Am J Hematol* 1999; 60 151–7.
 43. Szczepiorkowski ZM, Dunbar NM. Transfusion guidelines: when to transfuse. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program* 2013; 2013: 638–44.
 44. Coene J, Devreese K, Sabot B, Feys HB, Vandekerckhove P, Compennolle V. Paired analysis of plasma proteins and coagulant capacity after treatment with three methods of pathogen reduction. *Transfusion* 2013. doi:10.1111/trf.12460. [Epub ahead of print]
 45. Feys HB, Van Aelst B, Devreese K, Devloo R, Coene J, Vandekerckhove P, et al. Oxygen removal during pathogen inactivation with riboflavin and UV light preserves protein function in plasma for transfusion. *Vox Sang* 2013. doi:10.1111/vox.12106. [Epub ahead of print].
 46. Franchini M, Capuzzo E, Turdo R, Glingani C. Quality of Transfusion Products in Blood Banking. *Semin Thromb Hemost* 2014 Jan 28. [Epub ahead of print].
 47. Hardin MO, Ritchie JD, Aden JK, Blackburne LH, White CE. plasma-to-red cell ratio and mechanism of injury in massively transfused combat casualties. *Mil Med* 2014; 179: 92–8.
 48. Magee G, Peters C, Zbrozek A. Analysis of inpatient use of fresh frozen plasma and other therapies and associated outcomes in patients with major bleeds from vitamin K antagonism. *Clin Ther* 2013; 35(9): 1432–43.
 49. Wang Z, Du X, Li C, Ma L, Sun P, Cao H, et al. Coagulation factors and inhibitors in thawed plasma stored at 1 – 6 °C for 5days in China. *Transfus Apher Sci* 2014. doi: 10.1016/j.transci.2014.01.002. [Epub ahead of print].
 50. Chhibber V, Greene M, Vauthrin M, Bailey J, Weinstein R. Is group A thawed plasma suitable as the first option for emergency release transfusion? *Transfusion* 2014. doi:10.1111/trf.12537. [Epub ahead of print].
 51. Hilbert P, Hofmann GO, Teichmann J, Struck MF, Stuttmann R. The "coagulation box" and a new hemoglobin–driven algorithm for bleeding control in patients with severe multiple traumas. *Arch Trauma Res* 2013 Spring; 2: 3–10.
 52. Karam O, Tucci M, Combescure C, Lacroix J, Rimensberger PC. Plasma transfusion strategies for critically ill patients. *Cochrane Database Syst Rev* 2013; 12: CD010654.



53. Tanaka KA, Esper S, Bolliger D. Perioperative factor concentrate therapy. *Br J Anaesth* 2013; 111 Suppl 1: i35–49.
54. De Angelis V, Breda A. Plasma-derived medicinal products self-sufficiency from national plasma: to what extent? *Blood Transfus* 2013; 11 Suppl 4: s132–7.
55. Holcomb JB, Pati S. Optimal trauma resuscitation with plasma as the primary resuscitative fluid: the surgeon's perspective. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program* 2013; 2013: 656–9.
56. Elliott BM, Aledort LM. Restoring hemostasis: fibrinogen concentrate versus cryoprecipitate. *Expert Rev Hematol* 2013; 6: 277–86.
57. 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].
58. Holcomb JB, Fox EE, Zhang X, White N, Wade CE, Cotton BA, et al. Cryoprecipitate use in the prospective observational multicenter major trauma transfusion study (PROMTTT). *J Trauma Acute Care Surg* 2013; 75(1 Suppl 1): S31–S39.
59. 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.
60. 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.
61. Perry R, Stein J, Young G, Ramanathan R, Seri I, Klee L, et al. Antithrombin III administration in neonates with congenital diaphragmatic hernia during the first three days of extracorporeal membrane oxygenation. *J Pediatr Surg* 2013; 48(9): 1837–42.
62. Ramsey G. Treating coagulopathy in liver disease with plasma transfusions or recombinant factor VIIa: an evidence-based review. *Best Pract Res Clin Haematol* 2006; 19: 113–26.
63. Buechel KH. Recombinant FVIII: an introduction. *Sem Hematol* 1991;28(1 Suppl):1–4.
64. Oldenburg J, Brackmann HH, Hanfland P, Schwaab R. Molecular genetics in haemophilia A. *Vox Sang* 2000; 78 (2 Suppl): 33–8.
65. Scharrer I. Recombinant factor VIIa for patients with inhibitors to factor VIII or IX or factor VII deficiency. *Haemophilia* 1999; 5: 253–259.
66. Toole JJ, Knopf JL, Wozney JM, Sulzman LA, Buecker JL, Pittman DD, et al. Molecular cloning of a cDNA encoding human anti-hemophilic factor. *Nature* 1984; 312: 337–42.
67. McMillen JC, Lawson CM, Shaun Rowe A. Futility Assessment of recombinant factor VII activated for the treatment of hemorrhagic shock requiring massive transfusion. *Hosp Pharm* 2013; 48: 753–6.
68. Mondorf W, Ehrenforth S, Vigh Z. Screening of FVIII:C antibodies by an enzyme-linked immunosorbent assay. *Vox Sang* 1994; 66: 8–13.
69. Liebman HA, Chediak J, Fink KI, Galvez AG, Shah PC, Sham RL. Activated recombinant human coagulation factor VII (rF VIIa) therapy for abdominal bleeding in patients with inhibitory antibodies to factor VIII. *Am J Hematol* 2000; 63: 109–13.
70. Hedner U. Treatment of patients with factor VIII and factor IX inhibitors with special focus on the use of recombinant factor VIIa. *Thromb Haemost* 1999; 82: 531–9.
71. Barthels M. Clinical efficacy of prothrombin complex concentrates and recombinant factor VIIa in the treatment of bleeding episodes in patients with factor VII and IX inhibitors. *Thromb Res* 1999; 95 (1 Suppl): 31–8.
72. Key NS, Aledort LM, Beardsley D, Cooper HA, Davignon G, Ewenstein BM et al. Home treatment of mild to moderate episodes in patients with factor VII factor VIIa (Novoseven) in haemophiliacs with inhibitors. *Thromb Haemost* 1998; 80: 912–8.
73. Scharrer I, Grossmann R. Acquired inhibitory body hemophilia. *Anaesthesist* 2000; 49: 34–42.
74. Shafi T, Jeha MT, Black L, Al Douri M. Severe acquired haemophilia A treated with recombinant factor VIIa. *Br J Haematol* 1997; 98: 910–2.
75. Cohen AJ, Kessler CM. Acquired inhibitors. *Baillieres Clin Haematol* 1996; 9: 331–54.
76. Siekanska-Cholewa A, Jarosz A, Goralczyk

- T, Iwaniec T, Wegrzyn W, Drwila R, et al. Acquired factor V inhibitor in a woman following aortic aneurysm surgery. *Blood Coagul Fibrinolysis* 2014 Jan 24. [Epub ahead of print]
77. Balint B, Radović M. Antitrombin III – dosadašnja saznanja. *Vojnosanit pregl* 1990; 47: 442–5.
78. Bucur SZ, Levy JH, Despotis GJ, Spiess BD, Hillyer CD. Uses of antithrombin III concentrate in congenital and acquired deficiency states. *Transfusion* 1998; 38: 481–98.
79. Borhany M, Kumari M, Shamsi T, Naz A, Farzana T. Frequency of factor VIII (FVIII) inhibitor in haemophilia A. *J Coll Physicians Surg Pak* 2012; 22: 289–93.
80. Brecher ME, Hom EG, Hersh JK. Optimal platelet dosing. *Transfusion* 1999; 39: 431–2.
81. Chermles EA, Gibson BES. Clinical aspects of pediatric blood transfusion: plasma products. *Vox Sang* 1994; 67 (5 Suppl): 54–8.
82. Mannucci PM. Clinical evaluation of viral safety of coagulation factor VIII and IX concentrates. *Vox Sang* 1993; 64: 197–203.
83. Liu F, Zhou FY, Hu LH. RBC alloimmunization is an important complication of FFP transfusion: A case report of immune anti-D induced by apheresis fresh frozen plasma. *Transfus Clin Biol* 2009; 16: 400–3
84. Roddie PH, Ludlam CA. Recombinant coagulation factors. *Blood Rev* 1997; 11: 169–77.
85. Magić Z, Balint B. Osnovi molekulske medicine. In: Balint B, ed. *Transfuziologija*. Beograd: Zavod za udžbenike i nastavna sredstva; 2004. p. 685–707.
86. International Forum: What is the prospective impact of the recombinant DNA technique on the production of human plasma derivatives? Which are the derivatives where donor plasma could be replaced? *Vox Sang* 1983;44:390–5.
87. White GC, Beebe A, Nielsen B. Recombinant factor IX. *Thromb Haemost* 1997; 78: 261–5.
88. Rice KM, Savidge GF. Recombinant factor VIIa (rF VIIa) in haemophilia management. *Transf Sci* 1996; 17: 339–40.
89. Gible JW, Ness PM. Fibrin glue: the perfect operative sealant? *Transfusion* 1990;30:741–7
90. Balint B, Radović M, Balint L. Fibrinski lepak – efektivni adhezivno-hemostazni sistem. *Vojnosanit Pregl* 1995; 52: 477–82.
91. Alving BM, Weinstein MJ, Finlayson JS. Fibrin sealant: summary of a conference on characteristics and clinical uses. *Transfusion* 1995; 35: 783–90.
92. 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.
93. 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.
94. Yoshida H, Yamaoka Y, Shinoyama M, Kamiya A. Novel drug delivery system using autologous fibrin glue-release properties of anticancer drugs. *Biol Pharm Bull* 2000; 23:371–4.
95. Balint B, Gazivoda D, Todorovic-Balint M, Lazic Z, Pavlovic M, Kanjuh V. "Triple-way" approach for the treatment of dry socket: surgery and drugs plus fibrin sealant – as a biomatrix for "ultra-concentrated" platelets. *Transf Apher Sci* 2014; 51: 221–2.



CANCER STEM CELL MARKERS: CLASSIFICATION AND THEIR SIGNIFICANCE IN CANCER STEM CELL

Jennifer Tarakmi¹, Shimon Knutsen¹, John Mayfield¹, Small Susaye¹, Bela Balint²,
Waseem Ashgar¹ 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.

ABSTRACT

This review is dealing with identification of cancer stem cell markers, their latest classification, function in normal and cancer stem cells (CSCs), and their use in development of novel targeted antitumor therapy. It was difficult to prove the CSC s existence, unless the in vivo and in vitro experiments have been done supporting the theory that they have common clonogenic origin and perpetuate always the same phenotypic marker(s) on their surface, being also able to induce production of original tumor in transplanted NOD/SCID mice. The cancer stem cells so far have been found in most of human tissues and checked as well, in agar, for anchorage growth.

Their tumorigenicity is high, while other cancer cells either do not express it or with a very low intensity. That is why idea of targeted antitumor therapy now has as a goal to target CSCs since in that case the cancer would have been removed forever. Re-occurrence is due to omitting the correct target (CSCs) and targeting other tumor cell and normal tissues. The research in this field is very extensive and requires more knowledge on cellular, molecular and supramolecular levels.

Key words: Cancer stem cells, cancer stem cell markers, targeted antitumor therapy

INTRODUCTION

Cancer is a widely spread disease in modern civilization or rather a spectrum of diseases with similar manifestations and outcome through the course of disease. The cause is usually unknown although in some forms of cancers it is defined: chemicals (bladder cancer), radiation (Leukemias), and viruses (Epstein-Bar Lymphoma, cervix uteri) (1-3). In 2014, there were 1,665,540 new cancer cases diagnosed and 585,720 cancer deaths in the Unites States according to the American Cancer Society (1, 2). Cancer remains the second most common cause of death in the US, accounting for nearly 1 of every 4 deaths. Although researchers have continued to improve the level of effectiveness of standard oncology treatments, such as chemotherapy, radiotherapy and surgical resection, they can only minimize the bulk tumor, which again, results in the tumor relapsing (3-9). The theory of Cancer Stem Cells (CSC's) is gaining increasing attention from scientists and has, therefore, become an important focus of cancer research (10-19).

Understanding the properties of these CSCs is fundamental to future studies in this direction.

Therapeutic strategies that focus on targeting CSCs labeled with specific/unique markers are expected to help address the ineffectiveness of traditional cancer therapies, which would otherwise result in therapy resistance and relapse of the disease. While a relatively vast amount of research has been done, there are still many controversies as well as ambiguity in regards to the cancer stem cell concept (19-25). Through analysis of both past and present reports, we attempt to assess and present the current understanding of the cancer stem cell concept. By combining the use of conventional therapies with targeted CSC therapy, the cancer as a whole might be targeted and, as a result, offer a promising approach for a long- lasting treatment.

Background and significance

Cancer stem cells (CSCs) are defined as a group of cells within a tumor that have the ability to self-renew, drive tumorigenesis, and are multipotent (12) The hypothesis states that, although CSCs only represent a rare and subtle

cell population within the tumor, their high tumorigenic capacity drives tumorigenesis (18). CSCs proliferation produces more CSCs and in addition creates the differentiated cell types that constitute the bulk of the tumor due to their fundamental stem cell-like properties. Due to CSCs increased resistance to toxic and chemical substances, this subpopulation of cells is thought to be behind the cells' resistance to chemotherapy and disease relapse (20). Cancer is a group of heterogeneous cells with respect to the level of tumorigenicity. However, unlike other cancer cells in a tumor, CSCs are capable of establishing new tumors when xenotransplanted into non-obese diabetic/severe immunodeficient animal models (NOD/SCID) (26-29). Although it has been shown that cancer cells other than CSCs are able to proliferate at a faster rate than CSCs, they have slight tumor initiating potential (12). Therefore, it has been suggested that, to eradicate or eliminate a tumor or prevent it from reoccurring, all CSCs in that tumor must be eliminated.

There are two main models that describe cancer origin as well as metastatic progression.

1. *Stochastic (clonal evolution) model:*

This model states that all cancer cells hold tumorigenic potential through accumula-

tion of epigenetic changes and genetic mutations (3, 12).

2. *Hierarchical (cancer stem cell) model:* Tumors represent a level of hierarchy organization, with a subpopulation of cancer cells known as cancer stem cells (CSCs) holding a tumorigenic potential much greater than that of other cells contributing to the tumor (3,12). These CSCs reside from the same clone within the tumor and perpetuate same Cancer Stem Marker molecules during proliferation.

The existence of CSCs was first demonstrated in acute myeloid leukemia (AML) when John Dick was able to successfully complete a xenotransplantation of acute myelogenous leukemia stem cells (CD34⁺⁺ CD38⁻) from human patients into NOD/SCID mice models (3). AML is a heterogeneous disease in which a variety of distinct genetic abnormalities have been defined both clinically and biologically (3). Despite the heterogeneity of cancer cells it was seen that these cells were able to regenerate acute myelogenous leukemia in those mice showing clonal origin and tumorigenicity. It was also seen that these cells were able to give rise to AML in secondary receivers indicating self-renewal capability (Table 1).

Table 1.

***In vivo* and *In vitro* experiments which have confirmed existence of unique cancer stem cells of different tissues (blood, breast, and pancreas)**

Model	Experiment	Results
<i>In Vivo</i> (NOD/SCID Model)	Bonnet & Dick (1994); AML	Acute myelogenous leukemia stem cells, CD34 ⁺⁺ CD38 ⁻ were successfully transplanted from human patients into this immunodeficient model, in which the stem cells regenerated acute myelogenous leukemia in those mice
	Al-Hajj et al. Breast Cancer cells (2003);	Six months after injection, the injection sites were examined by histology. The CD44 ⁺ CD24 ⁻ /lowLineage ⁻ injection sites contained tumors whereas the CD44 ⁺ CD24 ⁺ Lineage ⁻ injection sites contained no detectable tumors. The cell population, CD44 ⁺ CD24 ⁻ /lowLineage ⁻ , was discovered to be tumorigenic after <i>in vivo</i> injection to immunodeficient mice. In both cases only the CD44 ⁺ CD24 ⁻ /lowLineage ⁻ cells had the capacity to proliferate to form new tumors.
	Li et al (2007); Pancreatic Cancer cells	The cell population, CD44 ⁺ CD24 ⁺ ESA ⁺ , exhibits the potential to initiate <i>in vivo</i> pancreatic cancer and is highly concentrated in this phenotypically-defined population since as few as 100 CD44 ⁺ CD24 ⁺ ESA ⁺ cells injected <i>in vivo</i> in immunosuppressed mice are forming tumors histologically indistinguishable from human pancreatic cancer tumors from which they originated.
<i>In Vitro</i>		Cancer stem cells are identified within <i>in vitro</i> experiments via their ability to proliferate in agar. For example, propagation of breast cancer from three breast cancer lesions was completed with the derived culture of CD44 ⁺ /CD24 ⁻ cell. The cell population was able to give rise to new tumors of the same clone

Furthermore, Al-Hajj et al (2003) showed analogous results after xenotransplantation of human breast cancer stem cells where injected into immunodeficient mice (30-33). Six months after injection, the injection sites were examined and it was noted that the CD44+CD24-/low Lineage- injection sites contained tumors whereas the CD44+ CD24+Lineage- injection sites contained no detectable tumors. The cell population, CD44+ CD24-/lowLineage-, was discovered to be tumorigenic after *in vivo* injection to immunodeficient mice. In both cases only the CD44+CD24-/lowLineage- cells had the capability to proliferate and as a result form new tumors.

In an additional experiment conducted by Li *et al.* (2007) the cell population, CD44+CD24+ESA+, demonstrated the potential to initiate *in vivo* pancreatic cancer in NOD/SCID mice (26, 27) This phenotypically defined population was perceived to be highly concentrated since as few as 100 CD44+CD24+ESA+ cells injected in non-obese severely immunosuppressed mice formed tumors histologically indistinguishable from human pancreatic cancer tumors from which they originated (Table 1).

Cancer Stem Cell Markers: Classification

Finding cancers' stem cells is a rapidly growing area of research (5, 7-11). These cancer-causing cells, which make up a small fraction of cells within tumors, have properties similar, but also

different from those of normal stem cells (Table 2) (5) CSCs make up only 1-2% of the total cancer cells in a leukemia patient, which makes it challenging to find these CSCs from other cancer cells. Therefore, it seems that promising research can only be established, by further studying adult stem cells as well as embryonic stem cells (ESC). The ESC research still faces ethical problems and therefore is substantially controversial because an early embryo is destroyed when researchers remove stem cells from it. An alternative is to take the stem cells from embryos that carry a genetic defect for specific diseases.

Are cancer cells transformed normal stem cells?

Researchers have traditionally thought of cancer as a collection of cells, all growing exponentially. According to the new research, conventional cancer therapies do an effective job killing the majority of cancer cells within the tumor, but they may miss CSCs.

In Table 2 we have presented similarities and differences between normal and cancer stem cells. The research in that direction is still going on. As a result, cancers often reoccur. Even hematologic and some non-hematologic malignancies treated by autologous stem cell transplant and high dose chemotherapy, have shown that regardless of survival rate of some cancers, the final outcome is death, due to recurrence of cancer.

Table 2.

Comparison of Normal Stem Cells versus Cancer Stem Cells

Endogenous & Exogenous Cues	Normal Stem Cells	Cancer Stem Cells	Reference(s)
Homeostatic Regulation of Tissue Regeneration Signals	Maintained	Lost	4,6,8,10
Genetic Plasticity	High	High	3,4,8,10,12
Growth Regulation	Niche-driven	Self-sustained	3,4,8,15
Antigrowth Signal Response	Yes	No	6,8
Apoptosis Signal Response	Yes	No	4,6,8,16
Limitation to Replication	Yes	No	4,6,8,9,10
Angiogenic Sustainability	No	Yes	4,6,9
Tissue Invasion & Metastasis	No	Yes	4,9,10,12
Differentiation of Resultant Daughter Cells	Yes	Impaired or None	10,20
Aberrant DNA Methylation	No	Yes	12,13,23
Anaerobic Respiration	Yes	Yes	4,6,10,12,19
Heterogeneous population of cells	Yes	Yes	4,6,7,11,13,22
Different Sets of miRNA involved	Yes	Yes	12,13,22,28

DNA = deoxyribonucleic acid

miRNA = mirco ribonucleic acid

As a result, cancers often reoccur. Even hematologic and some non-hematologic malignancies treated by autologous stem cell transplant and high dose chemotherapy, have shown that regardless of survival rate of some cancers, the final outcome is death, due to recurrence of cancer. The reason is (among others) in the fact that clinicians are injecting also cancer

cells with healthy stem cells during re-infusion after apheresis collection, which accumulate and renew with a time to the critical level causing relapse or death (33,34).

Table 3. presents (to our knowledge) the most completed/detailed classification of discovered cancer stem cell markers for different tissues and /or organs.

Table 3.

Cancer stem cell markers according to different sources

Cancer	Cancer Stem Cell Markers																			Reference(s)
	CD24	CD44	ALDH1	CD90	CD29	CD117	CD133	Integrin	Integrin	CD166	Nanog	ABCG2	CD96	CD34	NCAM1	CD271	CD105	POU5F1	CD38	
Breast																				Hajj (2003); Ferro de Beca (2012)
Prostate																				Maeda(2009); Hoogland (2013)
Colon																				Vermeulen (2008)
Brain																				Zeppernick (2008)
Lung																				Bertollini (2009)
Pancre- atic																				Li (2007), Zhu (2012)
Hepatic																				Zhang (2013); Yan (2008); Shengyong (2007)
Ovarian																				Luo (2011); Zhang (2011); Siu (2013)
Acute Mye- loid Leu- kemia																				Hosen (2007); Horton (2012); Bonnet (1997)
Wilm's Tumor																				Shukrun (2013); Pode-Shakked (2012)
Mela- noma																				Luo (2012); Civenni (2011)
Gastric																				Takaishi (2009); Zhang (2011)
Renal																				Sandlund (2006; Bussolati (2008); Azzi (2011)
Thyroid																				Soon-Hyun (2013)

The terato-carcinomas are able to differentiate into normal mature cells when transplanted into another animal. This alternation between developmental and tumor cells status demonstrates how closely development and cancer are related. The present-day challenge is to decode the common molecular mechanism and genes in

involved in self-renewal for cancer cells and stem cells (34-39).

Cancer stem cell markers and their function in normal and cancer stem cells

CSCs markers have been gradually discovered and belong to proteins group of molecules

known as cluster destination antigens (CDs). A very small number belongs to other categories—such as: ALDH1, integrins ($\alpha 2\beta$, $\alpha 6$), Nanog, ABCGT, NCAM1, and POU5F1 (40-50). Their function in normal and cancerous cell is different (40-47). Table 4 represents our effort to give the newest classification of these markers according to their functional role in both normal and cancerous tissues as well as targeted therapeutic modality developed up to date (51-64).

There is a lot of work to be done on clarification of the eventual changes in these molecules in cancerous cells (and distinction with respect to CSCs alone) and causes that are inducing these changes. Apparently, normal and cancer stem cells are different as well as similar (Table 2). Does the fact that they have similarities can be “a smoking gun” for turning malignant into normal stem cells? We still do not know.

Table 4.

Cancer Stem cell Markers and their function in non- cancer and cancer cells

Marker	Function in Non-Cancerous Tissue	Function in Cancerous Tissue	Targeted Therapy Modality	References
CD24	Modulates B-cell activation responses	Indirectly stimulates cell adhesion to fibronectin, collagens I and IV, and laminin through the activation of $\alpha 3\beta 1$ and $\alpha 4\beta 1$ integrin activity. Moreover, expression supported rapid cell spreading and strongly induced cell motility and invasion as well as induced proliferation and motility	Anti-CD24 monoclonal Ab (SWA11-ZZPE38 immunotoxin) decreases CD24 expression and inhibits cell proliferation	(51)
CD44	A cell-surface glycoprotein involved in cell-cell interactions, cell adhesion and Migration	Adhesion with hyaluronic acid plays an important role in cell migration, tumor growth and progression	Monoclonal antibody called RG7356 specifically targeted CD44 and was directly toxic to cancer cells, but had little effect on normal B cells. H90 anti-CD44 therapy eradicated AML CSCs showing that it interfered with transport to a stem cell supportive microenvironment	(52)(53)
ALDH ₁	Catalyzes the oxidation of aldehydes	Higher expression results in higher rates of cell proliferation, microsphere formation and migration	Adoptive therapy with ALDH1A1-specific CD8 β T cells eliminated ALDH cells, inhibited tumor growth and metastases, or prolonged survival of xenograft-bearing immunodeficient mice	(56)
CD90	Plays a role in cell-cell or cell-ligand interactions during synaptogenesis and other events in the brain	Stimulates stronger proliferation and self-renewal abilities, and higher tumorigenic capacity	5-FU inhibits proliferative CD90 ⁺ cancer cells, decreases tumor size, and improves survival	(64)
CD29	Involved in cell adhesion and recognition	Metastatic diffusion of tumor cells and development		
CD117	Type 3 transmembrane receptor for mast cell growth factor and plays an essential role in the regulation of cell survival and proliferation	A proto-oncogene, meaning that over expression or mutations of this protein can lead to cancer	Imatinib was confirmed to selectively target CD117(+) cells in vitro, and synergistically enhanced the anti-tumor effect of low dose cisplatin in vivo	(55)



CD133	Maintains stem cell properties by suppressing differentiation, binds cholesterol in cholesterol-containing plasma membrane microdomains	Initiate tumor growth, produce tumors with preserved self-renewal and differentiation capabilities and without phenotypic alterations after serial transplantation	The viruses, termed MV-141.7 and MV-AC133, infected and selectively lysed CD133 tumor cells. Both viruses exerted strong antitumoral effects on human hepatocellular carcinoma growing in nonobese diabetic/severe combined immunodeficient (NOD/SCID) mice	(54)
$\alpha 2\beta$ Integrin	Major collagen-binding integrin	Play a role in melanoma cell migration on type IV collagen and laminin. In several studies, the expression of $\alpha 2\beta$ was increased in metastatic cells when compared to cells in the primary tumor	Inhibition of the $\alpha 2\beta 1$ integrin with function-blocking monoclonal antibodies inhibited tumour growth in SCID mice	(57)
$\alpha 6$ Integrin	Receptor for laminin on platelets	Changes in the pattern during malignant transformation are highly dependent on the type of the cancer. An altered pattern allows the cancer cells to recognize variable matrices, but it may also lead to altered signaling and changes in gene expression, increased expression of $\alpha 6$ integrin may contribute to the invasive capacity of the progression in cancer	A lentivirus delivering ShRNA directed against integrin $\alpha 6$ was transplanted into the brains of immunocompromised mice. Mice bearing integrin $\alpha 6$ shRNA showed significantly reduced tumor formation and greater median survival	(58)
CD166	Binds to T-cell differentiation antigen CD6, and is implicated in the processes of cell adhesion and migration	Protein expression is reported to be up regulated in a cell line deriving from metastasizing carcinoma, restricted to subsets of cells involved in dynamic growth and/or migration as well as tumor progression		
Nanog	A transcription factor critically involved with self-renewal of undifferentiated embryonic stem cells	Dysregulated and intimately involved in promoting tumorigenesis in part through regulation of the cancer stem cell (CSC) population, promotes the migration and invasion of breast cancer cells, implicated to promote chemo resistance	Delivery of RNAi-mediated Nanog knockdown was observed to reduce growth of subcutaneous xenograft tumors in vivo. They pre-transfected shNanog in cancer cell lines before injecting the cells in NOD/SKID mice and found that the shNanog-transfected cells presented reduced long-term clonogenic growth, proliferation, and tumor size in mice.	(59)
ABCG2	Transport various molecules across extra- and intra-cellular membranes	Responsible for tumor self-renewal, over expression confers high levels of resistance, preventing toxins from entering cells as well as potentially playing a role in regulating stem cell differentiation	The blocking of ABCG2 function by fumitremorgin C, a chemical inhibitor, inhibited cancer cell proliferation	(60)
CD96	Plays a role in the adhesive interactions of activated T and NK cells during the late phase of the immune response. It may also function in antigen presentation.	Stimulates cytotoxicity of activated NK cells, mutations result in the loss of adhesion and growth activities		



CD34	Possible adhesion molecule with a role in early hematopoiesis by mediating the attachment of stem cells to the bone marrow of extracellular matrix. Acts as a scaffold for the attachment of lineage specific glycans	Promotes the proliferation and block the differentiation of progenitor cells, mutations have been associated with increased cancer aggressiveness	Naturally occurring parthenolide and synthesized demthylaminoparthenolide inhibitors induce apoptosis of CD34 ⁺ . These results were notable because the <i>in vitro</i> observations were verified <i>in vivo</i> by treating mice previously engrafted with AML with DMAPT	(55)
NCAM 1	The encoded protein is involved in cell-to-cell interactions as well as cell matrix interactions during development and differentiation.	This pro-malignant function is mediated by its interaction with fibroblast growth factor receptor, promotes the progression of cancer via FGFR signaling		
CD271	Plays a role in the regulation of the translocation of GLUT4 to the cell surface in adipocytes and skeletal muscle cells in response to insulin	Enhanced tumor-initiating capability, enable tissue invasion by breaking down the extracellular matrix.		
CD105	Major glycoprotein of vascular endothelium. Involved in the regulation of angiogenesis and in addition plays a critical role in the binding of endothelial cells to integrins and/or other RGD receptors.	A component of the receptor complex of Transforming Growth Factor (TGF)- β a pleiotropic cytokine involved in cellular proliferation, differentiation and migration	The anti-CD105 mab antibody conjugated with endoglin immunotoxin efficiently suppressed tumor growth in murine models bearing breast and colon carcinoma without any significant systemic side effects.	(53)
POU5F 1	Controls the expression of a number of genes involved in embryonic development	Promotes invasion and metastasis of some solid tumors through enhanced degradation of surrounding extracellular matrix	Lopinavir induced apoptosis efficiently in Oct-4-positive CSCs and in addition reduced proliferation, clonogenicity and selectively induced cell death in the CSC population, thus restraining CSC-induced allograft formation	(62)
CD38	novel multifunctional ectoenzyme, functions in cell adhesion, signal transduction and calcium signaling	A component of a molecular network delivering growth and survival signals to chronic lymphocytic leukemia cells, elevated expression is associated with advanced disease stage, high-risk cytogenetics, shorter lymphocytes doubling time (LDT), shorter time to initiation of first treatment (TFT) and poorer response to therapy	RA-induced CD38 antigen was found to target anti-CD38-based immunotoxin and effectively induced selective killing of leukemia cells	(61)

However, accumulation of the knowledge itself represents a solid basis for future research. Our goal was not to consider nor hypothesize the possibilities, but to collect and narrow down the known Cancer Stem Cell markers ,e.g. to facilitate further research by offering the classified

relevant markers and pointing out those aspects of relevant research that did not give the answers to fundamental questions such as:

1. Why are these molecules playing different roles in cancerous tissues?

2. Is their role different in particular cancer stem cells?
3. What is/are the causative factor(s) of these differences at a molecular level (conformation, activation, suppression of basic function, etc.)?
4. How can we design targeted therapy based upon these answers?

CONCLUSIONS

The concept of cancer stem cells is based upon Virchow's vision, and is not as new as we would think at first sight. The specific molecular markers (proteins) for cancer stem cells in various cancers are identified and CSCs are tested *in vitro* and *in vivo* models/conditions. The role of these proteins in normal and cancerous cells differ. The causative factors of these changes at molecular level are unknown. The concept of targeted tumor therapy is developing, but requires more research in order to completely function.

REFERENCES

1. National Center for Health Statistics. Leading Causes of Death. <http://www.cdc.gov/nchs/fastats/lcod.htm> (accessed 09 October 2013).
2. National Center for Health Statistics. Estimates of Funding for Various Research, Condition, and Disease Categories (RCDC). http://report.nih.gov/categorical_spending.aspx (accessed 09 October 2013).
3. Mayfield J and Pavlovic M : A Concept of Cancer Stem Cells: The Current understanding and a Look Ahead (2014) ART,41,1-2,pp:49-60
4. Pavlovic M. :Very Small Embryonic Like Cells (VSELs): Pros and Cons: review and perspectives in the light of critical data and controversies (2014) ART,41,1-2,2014, pp. 39-48
5. Jain M, Nilsson R, Sharma S, Madhusudhan N, Kitami T, Souza AL, et al. Highlights from Recent Cancer Literature. Cancer Res 2012; 72: 13.
6. Nguyen LV, Vanner R, Dirks P, Eaves CJ. Cancer stem cells: an evolving concept. Nat Rev Cancer 2012; 12(2): 133-43.
7. Al-Sarraf M, Martz K, Herskovic A, Leichman L, Brindle JS, Vaitkevicius VK, et al. Progress report of combined chemoradiotherapy versus radiotherapy alone in patients with esophageal cancer: an intergroup study. J Clin Oncol 1997; 15(1): 277-284.
8. Reya T, Morrison SJ, Clarke MF, Weissman IL. Stem cells, cancer, and cancer stem cells. Nature 2001; 414(6859): 105-11.
9. Delaney G, Jacob S, Featherstone C, Barton M. The role of radiotherapy in cancer treatment. Cancer 2005; 104(6): 1129-37.
10. Ramalho-Santos M, Yoon S, Matsuzaki Y, Mulligan RC, Melton DA. "Stemness": transcriptional profiling of embryonic and adult stem cells. Science 2002; 298(5593): 597-600.
11. Zipori D. The nature of stem cells: state rather than entity. Nat Rev Genet 2004; 5(11): 1471.
12. Gil J, Stembalska A, Pesz KA, Sasiadek MM. Cancer stem cells: the theory and perspectives in cancer therapy. J of Appl Genet 2008; 49(2): 193.
13. Singh A, Settleman J. EMT, cancer stem cells and drug resistance: an emerging axis of evil in the war on cancer. Oncogene 2010; 29(34): 4741-51.
14. Lu B, Chiou SH, Deutsch E, Lorico A. Cancer Stem Cells. Journal of Oncology 2011; 2011(): 1. doi:10.1155/2011/269437 (accessed 7 July 2013).
15. Gugjoo MB, Amarpal S, Ahmad SR, Yatoo MA, Ahsan-ul-Haq S. Cancer stem cell. International Journal of Livestock Research 2012; 2(3): 215-8.
16. Williams JL. Cancer stem cells. Clinical Laboratory Science: J Am Soc Med Tech 2012; 25(1): 50.
17. Gupta PB, Onder TT, Jiang G, Tao K, Kuperwasser C, Weinberg R, et al. Identification of selective inhibitors of cancer stem cells by high-throughput screening. Cell 2009; 138(4): 645-59.
18. Gupta PB, Chaffer CL, Weinberg RA. Cancer stem cells: mirage or reality?. Nat Med 2009; 15(9): 1010-12.
19. Diehn M, Cho RW, Lobo NA, Kalisky T, Dorie MJ, Kulp AN, et al. Association of reactive oxygen species levels and radioresistance in cancer stem cells. Nature 2009; 458(7239): 780-3.
20. Singh A, Greninger P, Rhodes D, Koopman L, Violette S, Bardeesy N, et al. A gene expression signature associated with "K-Ras addiction" reveals regulators of EMT and tumor cell survival. Cancer Cell 2009; 15(6): 101-13.

- 489-500.
21. Rosen JM, Jordan CT. The increasing complexity of the cancer stem cell paradigm. *Science* 2009; 324(5935): 1670-73.
22. Shackleton M, Quintana E, Fearon ER, Morrison SJ. Heterogeneity in cancer: cancer stem cells versus clonal evolution. *Cell* 2009; 138(5): 822-9.
23. Hirsch HA, Iliopoulos D, Tschlis PN, Struhl K. Metformin selectively targets cancer stem cells, and acts together with chemotherapy to block tumor growth and prolong remission. *Cancer Res* 2009; 69(19): 7507-11.
24. Jamieson CHM, Ailles L, Reya T, Weissman IL. U.S. Patent No. 7,622,255. 24 Nov 2009.
25. Liu C, Kelnar K, Liu B, Chen X, Calhoun-Davis T, Li H, et al. The microRNA miR-34a inhibits prostate cancer stem cells and metastasis by directly repressing CD44. *Nat Med* 2011; 17(2): 211-5.
26. Li C, Heidt DG, Dalerba P, Burant CF, Zhang L, Adsay V, et al. Identification of pancreatic cancer stem cells. *Cancer Res* 2007; 67(3): 1030-7.
27. Li C, Lee CJ, Simeone DM. Identification of human pancreatic cancer stem cells. *Cancer Stem Cells* 2009; Humana Press: 161-73.
28. Al-Hajj M, Wicha MS, Benito-Hernandez A, Morrison SJ, Clarke MF. Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells. *National Acad Sciences* 2003; 100(7): 3983.
29. Lapidot T, Sirard C, Vormoor J, Murdoch B, Hoang T, Caceres-Cortes J, et al. A cell initiating human acute myeloid leukaemia after transplantation into SCID mice. *Nature* 1994; 367: 645-8.
30. Shimono Y, Zabala M, Cho RW, Lobo N, Dalerba P, Qian D, et al. Downregulation of miRNA-200c links breast cancer stem cells with normal stem cells. *Cell* 2009; 138(3): 592-603.
31. Charafe-Jauffret E, Ginestier C, Iovino F, Wicinski J, Cervera N, Finetti P, et al. Breast cancer cell lines contain functional cancer stem cells with metastatic capacity and a distinct molecular signature. *Cancer Res* 2009; 69(4): 1302-13.
32. Ginestier C, Liu S, Diebel ME, Korkaya H, Luo M, Brown M, et al. CXCR1 blockade selectively targets human breast cancer stem cells in vitro and in xenografts. *J Clin Invest* 2010; 120(2): 485.
33. Neve RM, Chin K, Fridlyand J, Yeh J, Baehner FL, Fevr T, et al. A collection of breast cancer cell lines for the study of functionally distinct cancer subtypes. *Cancer Cell* 2006; 10(6): 515-27.
34. Zhao C, Chen A, Jamieson CH, Fereshteh M, Abrahamsson A, Blum J, et al. Hedgehog signalling is essential for maintenance of cancer stem cells in myeloid leukaemia. *Nature* 2009; 458(7239): 776-9.
35. Collins AT, Berry PA, Hyde C, Stower MJ, Maitland NJ. Prospective identification of tumorigenic prostate cancer stem cells. *Cancer Res* 2005; 65(23): 10946-51.
36. Jachetti E, Mazzoleni S, Grioni M, Ricupito A, Brambillasca C, Generoso L, et al. Prostate cancer stem cells are targets of both innate and adaptive immunity and elicit tumor-specific immune responses. *Oncoimmunology* 2013; 2(5): e24520.
37. Singh SK, Clarke ID, Terasaki M, Bonn VE, Hawkins C, Squire J, et al. Identification of a cancer stem cell in human brain tumors. *Cancer Res* 2003; 63(18): 5821-8.
38. Vermeulen L, Felipe de Sousa EM, Van der Heijden M, Cameron K, de Jong JH, Borovski T, et al. Wnt activity defines colon cancer stem cells and is regulated by the microenvironment. *Nat Cell Biol* 2010; 12(5): 468-76.
39. Puglisi MA, Tesori V, Lattanzi W, Gasbarrini GB, Gasbarrini A. Colon cancer stem cells: controversies and perspectives. *World J Gastroenterol* 2013; 19(20): 2997.
40. Shukrun R, Shakked NP, Dekel B. Targeted therapy aimed at cancer stem cells: Wilm's tumor as an example. *Pediatr Nephrol* 2013; 28(6): 1-9.
41. Fisher B, Wolmark N, Rockette H, Redmond C, Deutsch M, Wickerham DL, et al. Postoperative adjuvant chemotherapy or radiation therapy for rectal cancer: results from NSABP protocol R-011. *J Natl Cancer Inst* 1988; 80(1): 21-9.
42. Brannon-Peppas L, Blanchette JO. Nanoparticle and targeted systems for cancer therapy. *Advanced Drug Delivery Reviews* 2004; 56(11): 1649.
43. Davis ME, Chen Z, Shin DM. Nanoparticle therapeutics: an emerging treatment modality for cancer. *Nat Rev Drug Discov* 2008; 7(9): 771.



44. Gaitanis A, Staal S. Liposomal doxorubicin and nab-paclitaxel: nanoparticle cancer chemotherapy in current clinical use. *Cancer Nano* 2010; Humana Press: 385-92.
45. Graishar WJ, Tjulndin S, Davidson N, Shaw H, Desai N, Bhar P, et al. Phase III trial of nanoparticle albumin-bound paclitaxel compared with polyethylated castor oil-based paclitaxel in women with breast cancer. *J Clin Oncol* 2005; 23(31): 7794-803.
46. Farokhzad OC, Jon S, Khademhosseini A, Tran TNT, LaVan DA, Langer R. Nanoparticle-aptamer bioconjugates a new approach for targeting prostate cancer cells. *Cancer Res* 2004; 64(21): 7668-72.
47. Kirson ED, Gurvich Z, Schneiderman R, Dekel E, Itzhaki A, Wasserman Y, et al. Disruption of cancer cell replication by alternating electric fields. *Cancer Res* 2004; 64(9): 3288-95.
48. Stupp R, Wong ET, Kanner AA, Steinberg D, Engelhard H, Heidecke V, et al. NovoTTF-100A versus physician's choice chemotherapy in recurrent glioblastoma: a randomised phase III trial of a novel treatment modality. *Eur J Cancer* 2012; 48(14): 2192-202.
49. Dylla SJ, In: Kyung P, Gurney AL. *Emerging technology platforms for stem cells*. New Jersey: Wiley; 2009th.
50. Pavlovic M, Balint B. *Stem Cells and Tissue Engineering*. New York: Springer; 2013th
51. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3220457/>
52. <http://ucsdnews.ucsd.edu/pressrelease/>
53. monoclonal antibody targets kills leukemia cells
54. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16998484>
55. <http://cancerres.aacrjournals.org/content/early/2013/01/04/0008-5472.CAN-12-2221.full.pdf>
56. <http://www.cancerletters.info/article/S0304-3835%2813%2900832-X/abstract>
57. <http://clincancerres.aacrjournals.org/content/17/19/6174.full.pdf>
58. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2361410/#bib21>
59. www.researchgate.net/...Integrin_alpha_6...cells/.../d912f50
60. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3772775/>
61. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3365812/>
62. <http://mct.aacrjournals.org/content/3/3/345.long>
63. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3730396/>
64. <http://www.fasebj.org/content/17/9/984.full>
65. <http://www.jci.org/articles/view/42550>
66. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2835048/#!po=44.2308>



DIFFERENT APPROACHES FOR ANTICANCER THERAPY

Karl Schreiber¹, Bela Balint² and Mirjana Pavlovic¹

¹Department of Computer and Electrical Engineering and Computer Science, Florida Atlantic University, USA Boca Raton, FL, USA; ²Institute for Transfusiology and Hemobiology of MMA, Belgrade, Serbia

ABSTRACT

The review on classical antitumor therapy including the anticancer stem cell therapy novelties is presented with disadvantages and advantages. The concept of targeted tumor therapy has evolved during last years into the concept of targeted stem cell therapy. The difference between the two is that in the first case we are targeting the pool of tumor cells as well as normal cells while in the second case we should target just cancer stem cells. The new theories on Cancer Stem Cells (CSCs) are comprehended in the light of new conceptual approaches. Cancer stem cell markers are envisioned as a new category of biomarkers which would be guides toward precise distinction between tumor cells and cancer stem cells. Cancer stem cells have the highest tumorigenic potential in the entire pool of tumor cells and due to that should be essential and primary target of the therapy. Thus, targeting of other less cancerogenic and normal cells would be omitted. Cancer stem cells due to that, reside in a tissues either as minimal residual disease or simply as a very low number of cloned cells. When reach critical size or count they cause tumor relapse.

The magnetotherapy as one of the novel approaches in targeted cancer stem cell therapy is described. It is concluded that further research is necessary in order to reach success in clinical arena by using novel approaches and targeting Cancer Stem Cells.

Key words: Antitumor Therapy, Cancer Stem Cells (CSCs) Targeted Stem Cell Therapy

INTRODUCTION

Science and its community are still being challenged by the search of the best cancer treatment method, which could put end to this stubborn disease. Statistics show more than a million men and women are diagnosed with cancer and practically half of these patients died due to this disease in 2012 only in the USA (1). Different treatments vary and depend on factors mainly showed by the patient status. At some point in the past, surgery and radiation therapy were the most preferred methods of treatments when the disease was localized (2-3). Nonetheless, both could not sufficiently control the metastasis of cancer (4). Consequently, different treatment methods, mostly known as cancer targeted therapies and drug delivery development, are currently applied. This field is broad and involves targeted therapy such as in cancer stem cells, heat-shock proteins and multiple-signaling pathways (1-9). Additionally, as part of these methods, therapy can be accomplished by the manipulation of antibodies, small molecules and ligands. These targeted therapy methods are basically new in the research field and have a

great potential to finally develop into the best cancer treatment available.

Cancer Targeted Therapy

There are no successful improvements in mortality rates for patients with metastatic cancer for a long time since the 1970s, which simply confirms that cancer is still one of the most severe diseases. Nevertheless, research has helped improve the knowledge in particular and specific tumor entities and therapies (10-17). Targeted therapy may directly target tumor antigens by altering their signaling or indirectly depending on these tumor antigens being expressed on the cell surface, which behave as aims for effector molecules-containing ligands (4).

Antibody-targeted therapy

Monoclonal antibodies (MoAbs), which are approved by the US FDA due to their effectiveness for different cancer treatments, have the ability to target tumors improving the selectivity of other anti-cancer agents (17-24).

Table 1.

FDA approved therapeutic antibodies

Monoclonal anti-body	Target	Indication	Product	Year	Corporate sponsors	References
Rituximab (Rituxan)	CD20	Low-grade B-cell NHL	Chimeric	1997	IDEC, Genentech	(21-24)
Trastuzumab (Herceptin)	HER2/neu	Metastatic breast cancer	Humanized	1998	Genentech	(17, 19, 25)
Gemtuzumab-ozogamicin (Mylotarg)	CD33	Acute myeloid leukemia	Humanized	2000	Wyeth Laboratories	(26-28)
Alemtuzumab (Campath)	CD52	Chronic lymphocytic leukemia	Humanized	2001	Milennium and ILEX Partners	(29-31)
Ibritumomab-tiuxetan- ⁹⁰ Y (Zevalin)	CD20	Non-Hodgkin lymphoma	Mouse	2002	IDEC	(32-34)
Tositumomab/Tositumomab- ¹³¹ I (Bexxar)	CD20	Non-Hodgkin lymphoma	Mouse	2003	Corixa, GlaxoSmithKline	(35-37)
Cetuximab (Erbix)	EGFR	Metastatic CRC; HNSCC	Chimeric	2004	ImClone Systems	(38-37)
Bevacizumab (Avastin)	VEGF	Metastatic CRC; SCLC	Humanized	2004	Genentech	(41-44)

NHL: Non-Hodgkin lymphoma / CRC: Colorectal cancer / HNSCC: Head and neck squamous cell carcinoma / NSCLC: Non-small cell lung cancer.

Cancer therapy with antibodies may be efficient alone as well as in combination with chemotherapy and radiation therapy (24-28). It is important that the antigen must be reactive with the target cell and not the healthy tissue. Thus, if antigens are not found on the cell surfaces but instead circulating in the peripheral blood, they should be prevented from reaching cancer cells. Murine, rabbit, or rabbit proteins were the first antibodies studied and purified (4,15,25). In humans, these antibodies do not normally promote antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity (ADCC) and complement-dependent cytotoxicity (CDC) which would assist in the destruction of malignant cells. Thus, humanized antibodies or hybrids are engineered allowing the human antibodies to be linked with a murine backbone, for instance, making a chimera of antibodies from two different species, which increases the effectiveness of therapy. These chimeric antibodies have been able to activate immune effector's functions such as ADCC and CDC becoming a great success in MoAb-based

therapies in the medical field (4).The list of these targeted molecules is very long (24-44).

Small molecules targeted therapy

This type of targeted therapy involves chemotherapy with the purpose of supplying agents specifically for cancer cells. For instance, lead compounds may be used as inhibitors for molecular targets (4). Additionally, protein kinases have been targeted the most by small molecules inhibitors because they do not only regulate cell life such as protein phosphorylation but may be related to pathways in tumors due to abnormal phosphorylation. Consequently, drug development increased specifically for targeting membrane associated protein tyrosine kinases (4). Some examples are: Naphthalene sulphonamides, which work as calcium-binding protein calmodulin antagonist, Glivec, which is the first selective inhibitor of tyrosine kinase for cancer treatment, and Gefitinib, which is a selective inhibitor for oral epidermal growth factor receptor tyrosine kinase (4, 45).

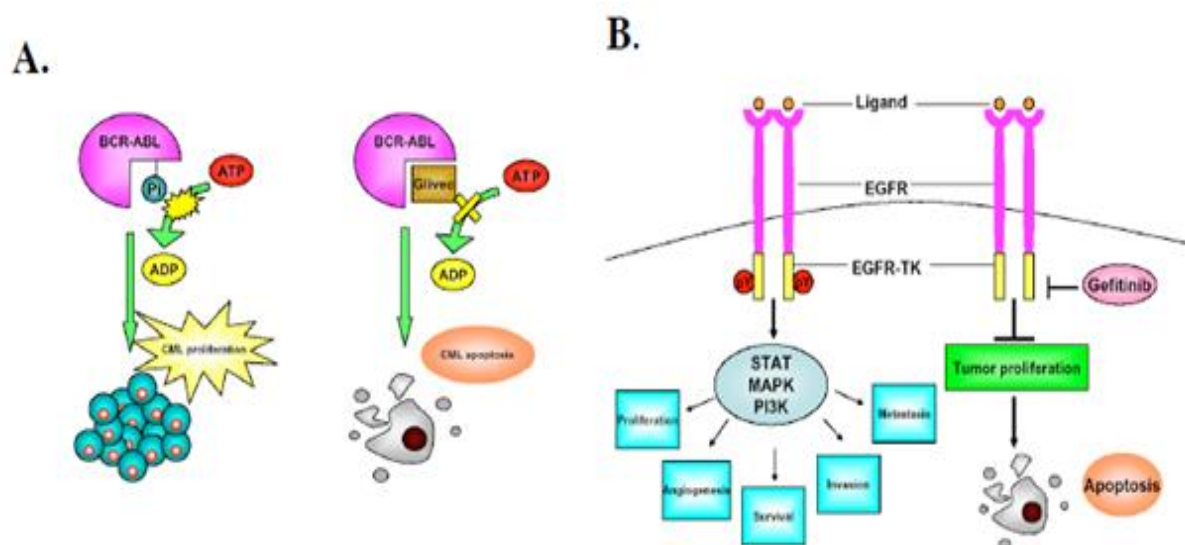


Figure 1. Mechanisms of small molecule inhibitors. (A) Constitutively activated Bcr-Abl tyrosine kinase cause chronic myelogenous leukemia (CML). (B) EGFR-mediated signaling contributes to the up-regulation of essential processes for tumor growth and progression.

Ligand-targeted therapy

The efforts to increase levels of toxicity in cancer cells with anti-cancer chemotherapeutics are limited because molecular targets may not differentiate/distinct well enough cancer cells from normal cells due to their common features. Normal tissues such as bone marrow or gastrointestinal tract may be affected inducing side effects in a patient. However, ligand-targeted therapy helps develop specific tumor detection and reduces toxicity levels. Even though this therapy shows potential favorable results, there are certain obstacles to overcome. Human tumors actually show genetic diversity yielding drug-resistant cells (45). These cells have resistant mechanisms, which affect targeted drugs and anti-tumor agents by mutating cell death pathways, for instance. Another case is high tumor interstitial fluid pressure (IFP), which decreases the transcapillary transport of drugs or therapeutic antibodies in tumors consequently increasing toxicity. Regardless of this barrier for drug development, increased tumor IFP's mechanisms are still not completely understood but possibly involving blood vessel leakiness, lymph vessel abnormalities, interstitial fibrosis and contraction of the interstitial space mediated by stromal fibroblasts (4). Even though high IFP is correlated with high recurrence rate and poor prognosis for patients with cervical cancer receiving radiation therapy, ligand-therapy may

increase the buildup of drugs in high IFP of the tumor by using the ligand affinity to the plasma membrane receptors in cancer cells.

Thus far, a technique called phage display is used for the search of targeting ligands (4). In this case, a peptide is expressed as fusion with a coat of protein of bacteriophage. When the targeting ligands to cancer cells are found, they are conjugated with chemotherapeutic drugs in order to kill cancer cells. Liposomes are chosen to conjugate with targeting ligands because of prolonged blood circulation, sufficient tumor accumulation and controlled drug release. This targeted liposomal system may be definitely improved by ligand-targeted therapy. One positive result is that targeting liposomes have an enhanced anti-tumor effect (4).

Finally, another important factor that could make this therapy not efficient enough is the natural properties of cancer stem cells (CSCs), which may increase the resistance to chemotherapy agents. As a consequence, relapse could occur by insufficient targeting of the CSCs during initial treatment. Tumor pathogenesis is linked to these characteristics of stem cells, which are found in various types of cancer. However, understanding efficiently the nature of stem cells will help improve the detection of pre-malignant lesions and tumors through different targeted therapies (4, 45-55).

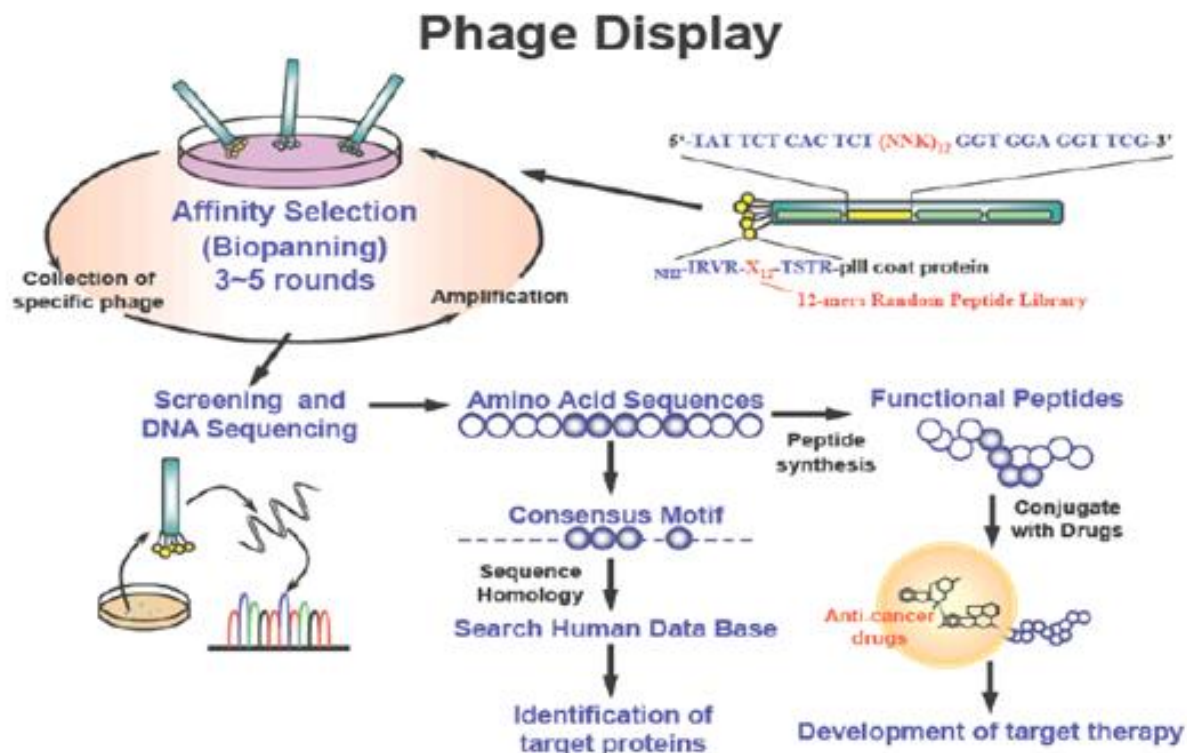


Figure 2. Identification of targeting ligands to cancer cells by phage display; Vaccine targeting mutant

Isocitrate dehydrogenase type 1 (IDH1) is represented as monoallelic point mutations in the development of gliomas, which are glial tumors, developed from glial cells, and other tumor types (7,8). IDH1 also represents a possible target for immunotherapy since it is a tumor-specific neoantigen in all tumor cells containing an immunogenic epitope appropriate for mutation-specific vaccination. Since, IDH1 is present in all tumor cells of gliomas; a mutation-specific anti-IDH1 vaccine may induce antitumor immunity becoming another therapeutic strategy for these types of tumors (7).

Kinase Inhibitors targeting Multiple Signaling Pathways

There are many cellular signaling pathways, which are able to promote cancer development. Some examples are the phosphatidylinositol-3-kinase (PI3K)/AKT, protein kinase C (PKC) family, and mitogen-activated protein kinase

(MAPK)/Ras signaling cascades. The main characteristics among them is that the receptor kinases (RTKs) which are part of the signal transduction in cancer cells. Inhibition of kinases has shown therapeutic benefit associated with molecular targeted anticancer agents. An important factor in targeted anticancer therapy is the understanding of these signaling pathways, which promote malignant cell transformation and proliferation (5). As part of this process, there is a greater emphasis on targeting multiple signaling pathways by an individual agent because cancer produces multiple abnormalities instead of a single defect. Growth receptors and their signal transduction and tumor angiogenesis (process by which new vessels grow from pre-existing vessels in the surrounding normal tissues) (8) are key therapy targets, particularly the latter because it may spare normal cells during therapy (5).

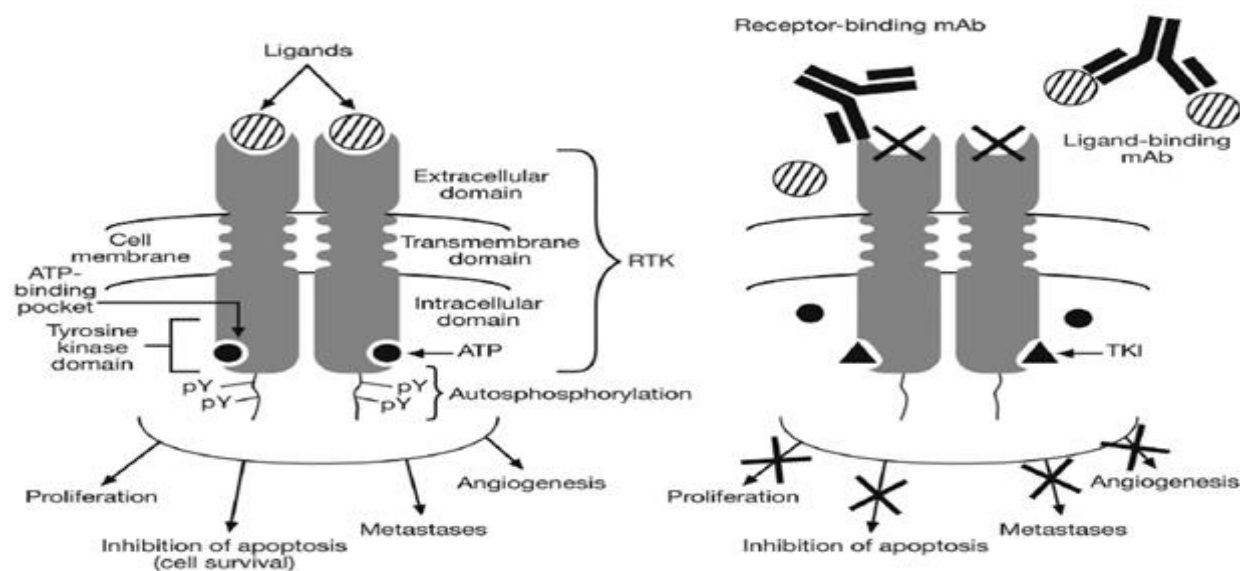


Figure 3. Structure of RTKs and mechanism of action of monoclonal antibodies and TKIs inhibiting the shown receptors. pY, phosphorylated tyrosine.

Attacking multiple targets

Multitargeted tyrosine kinases inhibitors target RTKs on tumor cells as well as supporting cells such as vascular endothelial growth factor receptors (VEGFRs) and platelet-derived growth factor receptors (PDGFRs) which indicate the anti-tumor effects and anti-angiogenic properties. Studies emphasize the effectiveness of anticancer therapies involving different drug

combinations. There are benefits when targeted anti-angiogenic agents are combined with conventional cytotoxic therapies by enhancing anti-cancer effects of anti-angiogenic treatment. Additionally, targeted therapies in combination with traditional chemotherapy may overcome resistance of breast cancer (resistance to anti-estrogen therapy) specifically (5, 25).

Table 2.

Major kinases proposed as molecular targets and expressed on cell membrane and cytoplasm

Membrane Tyrosine Kinases	Intracellular Kinases
EGFR	Ras
HER2	Raf
PDGFR	MAP
FGFR	MEK
IGF-1R	mTOR
VEGFR	PKC
FLT3	AURORA TK
RET	BCR-ABL

Agents targeting Serine/Threonine Kinases

Serine and Threonine kinases are involved in growth, pro-apoptotic signaling, and angiogenesis. The PI3K/AKT pathway is involved in cancers via regulatory effects on mammalian cell proliferation and survival. PI3K is composed of the p85 regulatory subunit and a p110 catalytic subunit. When PI3Ks are activated, they catalyze the phosphorylation of phosphatidylinositol trisphosphate (PIP₃), which serves as a ligand to recruit AKT to the plasma membrane. AKT is phosphorylated by serine/threonine kinase making AKT active in order to promote cell proliferation, growth, and survival of cancer cells. Mammalian target of rapamycin (mTOR) is a crucial AKT substrate in charge of cellular metabolism, signaling cells to expand, grow and proliferate, and may regulate apoptotic processes. It is also suggested that the abnormality of these processes promotes cancer development and, therefore, mTOR inhibitors are assessed to become anticancer agents.

Another signaling pathway being targeted involves the protein kinase C (PKC) fami-

ly, which is important transducer in the production of diacylglycerol (DAG) (intracellular second messenger). PKC inhibitors are possible anticancer agents since PKCs may have an active participation in carcinogenesis and malignant transformation.

Also, there is another type of serine/threonine kinase called Raf kinase, an effector of Ras in the MAPK/Ras signal transduction pathway, which is linked to cancer. The MEK/ERK cascade is often observed in human cancers. Raf kinase inhibition by sorafenib (oral multikinase inhibitor) interrupts this cascade, inhibiting both the kinase activity correlated to various RTKs and the MAPK/Ras pathway associated with RTK activation. Even though sorafenib is a multitargeted TKI in late stages of clinical development, it has already shown inhibition activity in the ERK pathway phosphorylation for cultured breast, melanoma, pancreatic, and colon cancer cell lines. It shows antitumor activity in many xenograft models without increasing toxicity when combined with anticancer drugs (5, 45).

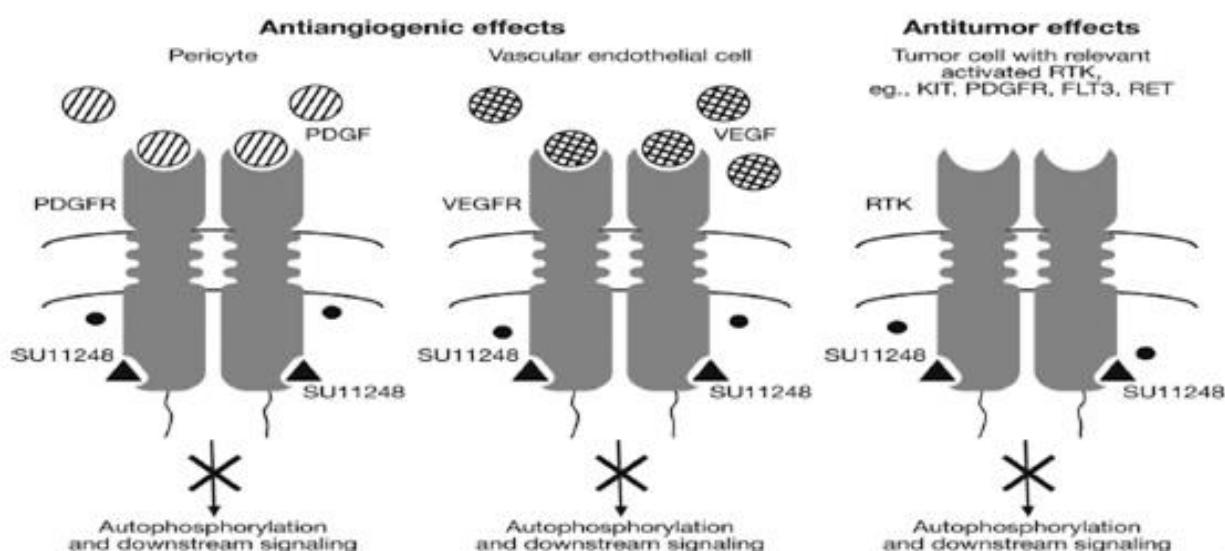


Figure 4. Mechanism of action of antiangiogenic and antitumor effects by SU11248

Heat shock protein targets

Another type of therapy used in cancer treatment aim for heat shock proteins (HSPs), which are synthesized by cells exposed to some sort of

stress in order to protect the latter from damage. They can be found overexpressed in many cancers by promoting tumor cell proliferation and

inhibiting cellular death pathways. Also known as stress proteins, HSPs function as molecular chaperones, which compose from 5% to 10% of total protein in a healthy cell. Nevertheless, when the cell is under stress, proteins misfold or accumulate and bind to chaperones in order to release a heat shock factor (HSF), which promotes the cellular increase of HSP concentration. As a result, HSPs facilitate the refolding of damaged proteins or seize them for degradation.

In cancer, the overexpression of HSPs is clear and described as an adaptive response by cancer cells to keep protein homeostasis, which leads to the survival of the cell in a stressed environment. There are different types of HSPs mainly classified based on their molecular size describing the larger HSPs (HSP100, HSP90, HSP70, HSP60, HSP40) as ATP-dependent while the smaller HSPs (sHSPs) as ATP-independent. Chaperones, such as HSP90 may be highly expressed in most tumor cells.

Overall, HSPs may contribute in six cell physiology alterations in order to identify cancerous growth. One alteration is described as *self-sufficiency in generating growth signals in cancer cells* where HSP90, for instance, keeps the activities of proto-oncogenes, such as HER2 proto-oncogene, and protein kinases, such as Akt, c-SRC and Raf-1, in order to enhance tumor growth and survival. Additionally, it promotes the stabilization of mutant protein conformations resulting in the accumulation of mutated molecules in cancer cells (3). The second alteration is *insensitivity to anti-proliferative signals where HSP70 is the main participant by binding to p53 tumor suppressor protein*. Even though the mutation in p53 protein provokes cancer development, there is still no evidence of increased levels of HSP70 may mutate p53 inducing malignant growth. The third alteration is the *avoidance of apoptosis where HSPs play an extensive role in the programmed cell death*.

When HSP70 or HSP27 are inactivated, caspase-dependent apoptosis, for instance, occurs while the up-regulated expression of these chaperones inhibits the apoptosis process (3). The fourth alteration is the *unlimited replicative capacity*, which allows cancer cells to escape senescence by avoiding the shortening of telomeres. HSP90 helps stabilize telomeres while HSP75 (HSP70 family) plays a role in increasing cancer cell divisions and counter senescence by inhibiting p53 activity. The fifth alteration is *tumor angiogenesis*, which is mainly enhanced by the overexpression of HSP90. The sixth alteration is *invasive and metastatic capability of tumors*, which, according to studies, correlates with the increase of HSP27 and HSP70. HSP90 is also leads to the increased cancerous invasion by cleaving constituents of the extracellular matrix.

Due to the diverse roles of HSPs, they become easy targets for cancer therapy. HSP inhibitors may actually obstruct multiple signaling pathways, which lead to the specific apoptosis of cancer cells (3).

Cancer stem cells therapy: concept and novelties

As previously stated, cancer stem cell therapy could improve the effectiveness in cancer treatment by targeting these particular cells. Cancer stem cells (CSCs) are characterized as self-renewal, heterogeneous and apoptotic resistant, which may contribute to the decrease of successful conventional therapies on differentiating tumor cells. CSCs arise from stem cells (SCs) or precursor cells when the latter are originally normal and transform into CSCs due to the accumulation of genetic modifications and epigenetic alterations such as the deregulation of signaling pathways.

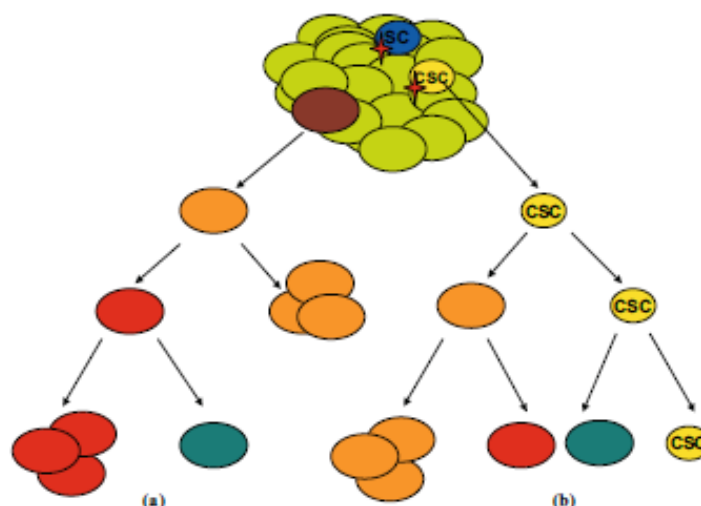


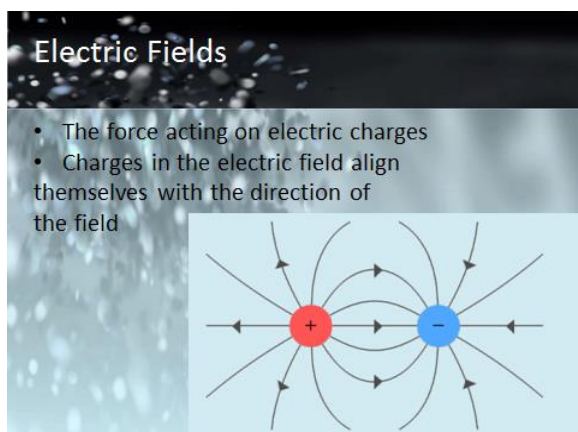
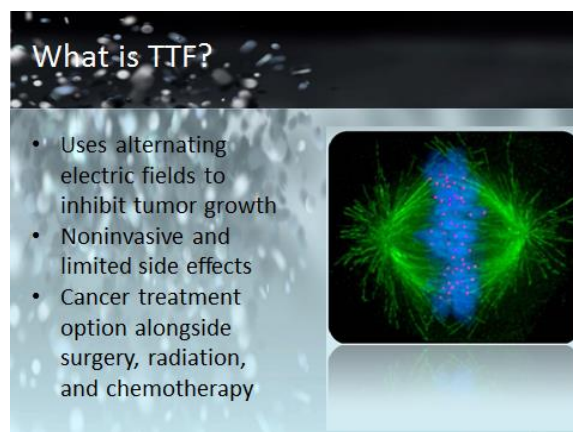
Figure 5. Tumor development models. (a) Clonal evolution model. (b) Cancer stem cell model. Green = niche cells. Blue = stem cell. Yellow = cancer stem cell. Red star = adhesive molecules. Brown, orange, red and dark turquoise = cells with genetic alterations accumulation

When SCs divide symmetrically, depending on the organism's needs, the daughter cells either differentiate or remain undifferentiated. Differentiation is normally induced by the sensitivity of the niche signaling sensitivity and outer cell environment. When SCs are cultured *in vitro*, they proliferate and differentiate rapidly. In order to keep them undifferentiated, they are cultured under special conditions so they can be stimulated to produce new cells. However, it also suggests that CSCs may be affected and start promoting the initiation of tumor growth. Interestingly enough, CSCs do not produce cancer when displaced into a different niche where epigenetic changes are not present while SCs initiate tumor growth when placed in a tissue damaged by radiation, for instance. Additionally, CSCs may be formed due to alterations in signal transmission and genetic factors (6, 55-65).

Possibilities of engineering targeted cancer SC therapy using principles of magnetism

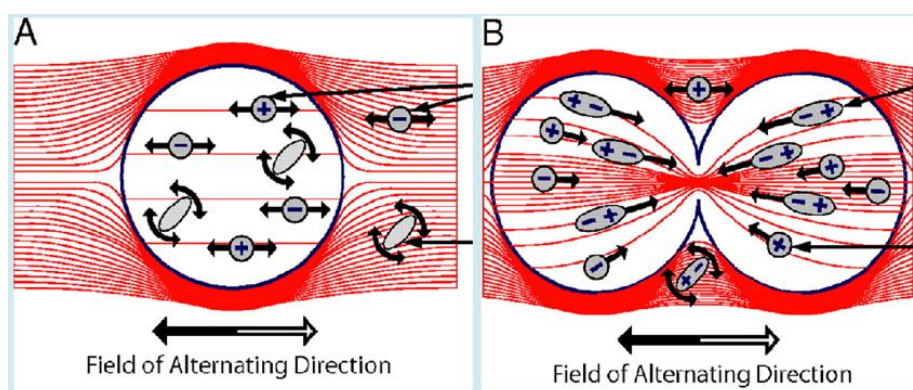
The fundamental goal of cancer therapy lies in a few key ideas: (1) create as little side-effect of the treatment to the host's tissues, (2) treat as non-invasively as possible, and (3) have long-term viability of treatment as stem cells vary in their genotypic expression. The third point, however, may be debatable if the cancer stem cells can be obliterated in the first treatment.

As technological progression builds new opportunity in other realms of science, so does it in the world of medicine. Two new treatment modalities are on the forefront of oncological intervention: *alternating magnetic fields* on replicating cancer stem cells. Although in the early phases of testing, it shows promises of accomplishing limited-to-no side effects as well as being as non-invasive as possible. This novel treatment could be used in combination with chemotherapy or radiotherapy, as indicated (45).


Figure 6. Electric Fields

Figure 7. Stem-line therapy

The other novel therapy targeting cancer stem cells that has shown great result is the use of alternating magnetic fields. As dividing cells undergo the various stages of cell replication, *a developmental stage known as mitosis is the target of this therapy*. During mitosis, all of the sister chromatids are lined up along the midline of the cell and still adjoined to one another by a centromere, which then become the target of spindles emergent from the centrioles at opposite poles of the dividing cell (45). *These spindles have a polarity in charge due to their mole-*

cular composition (Figs. 6 and 7). If this transient treatment field (TTF), is applied via an external array, the spindles of cancer stem cells (which are smaller than other progenitors and normal cells) are disrupted by the alternating fields and a resultant disruption of cancer cell replication is accomplished (38). It is important to note, however, that cancer stem cells are smaller than typical, normal-state mitotic cells and can therefore be targeted with specific frequencies in order to minimize damage to healthy, non-cancerous cells (**Figure 8**).


Figure 8. Fields of alternating directions with polarization and difference in size of normal and cancer cells

The first clinical trial was in 2003 for patients with glioblastoma (GBM), the most aggressive and most common form of primary brain tumor in the United States. Two years later, three of the original ten patients were still alive, two of which had no progression of the cancer whatsoever. In 2011, the FDA approved TTF as a viable treatment for GBM (45).

Currently, clinical trials are being run for the utilization of TTF with lung cancer, as well as in vitro research for many other types of cancer, including cervical. Some devices already are

produced and utilized in the market, making the treatment more readily available. NovocureTM, a commercial stage private oncology company, manufactures the device, NovoTTFTM-100A, a wearable device weighing around 6 pounds that can fit into a shoulder bag for easy handling. Using non-invasive, insulated transducer arrays that are placed directly on the skin in the region surrounding the tumor, TTF therapy is unlike previous applications of electricity in medicine (45).

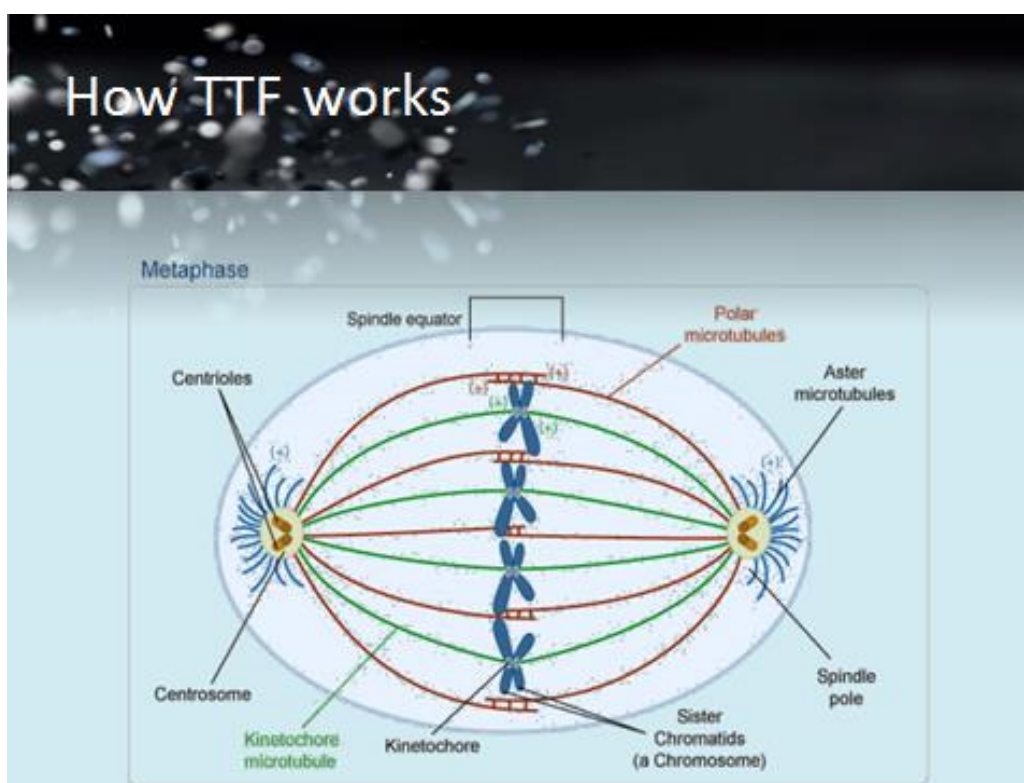


Figure 9. Transient Treatment Field (TTF) Inducing Mitotic Spindle Rearrangement in Polarity.

*The induced magnetic field specific to the frequency of CSCs disrupts the spindle formation and subsequent continuance of mitosis.

Increased apoptosis of CSCs will result in a significantly smaller number of matured cancer cells, which can then be addressed successfully with common anticancer therapies. Therefore, anti-cancer therapy that only results in apoptosis of the matured cancer cells and/or only inhibits the proliferation of CSCs provides a potential window of opportunity for new and more aggressive CSC mutants to occur and might be unsuccessful, if not dangerous. It is expected that the elimination of cancer should target the CSC pool, and successful treatment regimens would need to be the result of an orchestrated ‘target and destroy’ effect. TTF therapy is a locally or regionally delivered treatment that uses electric fields within the human body that disrupt the rapid cell division exhibited by cancer cells. TTF therapy was developed to provide physicians and patients with a fourth treatment option for cancer in addition to surgery, radiation therapy and chemotherapy(Figs.9and 10). In light of the difficulty of the manipulation of the CSC model, the research that has been done thus far is providing a solid framework upon which a new, improved paradigm of oncological treatment will be:

- TTF therapy affects only one cell type at a time, and not cells that are in division
- TTF therapy is not expected to affect the normal functions of bone marrow in creating red and white blood cells, since the bone marrow is naturally shielded from the fields.
- TTF therapy is delivered locally through a physical, non-chemical pathway, known as blood brain barrier (BBB). This allows the brain tumor treatment, whereas other mitotic inhibitor treatments such as taxanes and vinca alkaloids have poor diffusion across BBB) and therefore, are rarely used to treat brain tumors.

There is no evidence of cumulative damage to healthy tissues in the body when exposed to TTF therapy. Since the fields alternate so rapidly, they have no effect on normal quiescent cells nor do they stimulate nerves and muscles (45). Taken together, these properties will potentially allow patients to receive TTF treatment for as long as necessary with minimal side effects while maintaining a high quality of life established.

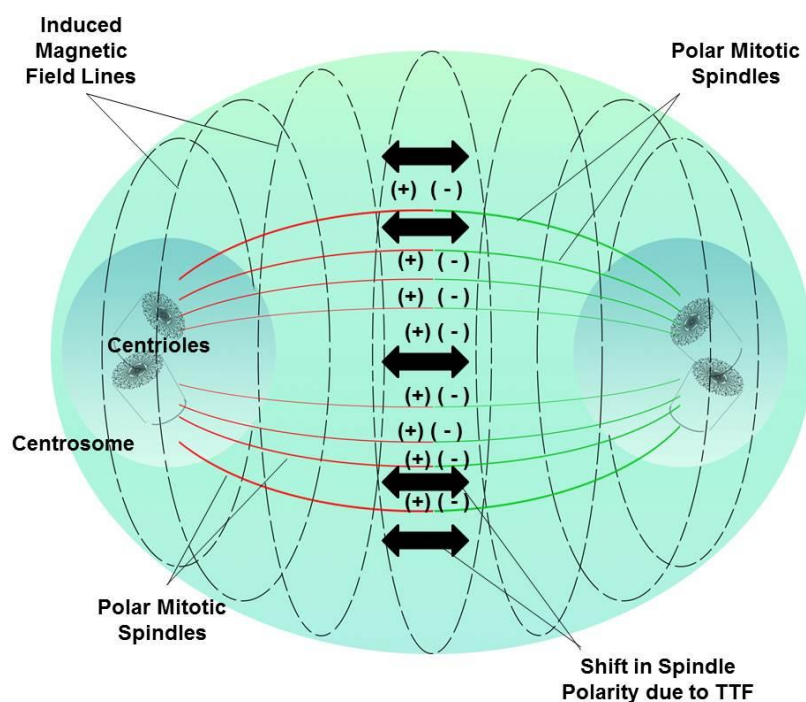


Figure10. A and B Transient Treatment Field(TTF) Inducing Mitotic Spindle Rearrangement in Polarity.
*The induced magnetic field specific to the frequency of CSCs disrupts the spindle formation and subsequent continuance of mitosis.

Cancer therapy outlook

The existence of CSCs was confirmed during the 1960s when cells were taken from specific sites in patients with malignancies in order to be transplanted to other parts resulting in that only a minor percentage of transplanted cells produced a tumor (animal models were later used due to ethical controversies).

CSCs may be resistant to therapy due to the increased expression of proteins from the BCL-2 family since they lead to the increase of expression of membrane proteins accountable for drug resistance. There are reports that checkpoint proteins play a critical role in determining the resistance of CSC to radiotherapy. These checkpoint proteins are activated and overexpressed due to DNA damaged (6).

Table 3.

Cell surface markers correlated with cancer stem cells

Tumor type	Cell surface markers	References
Acute myeloid leukemia	CD34+CD38-	(46)
Breast tumor	CD44+CD24-ESA+	(47)
Brain tumor	CD133+	(9)
Colon cancer	CD133+	(50, 53)
Head and neck cancer	CD44+	(52)
Prostate cancer	CD44+	(48, 51)
Metastatic melanoma	CD20+	(66)
Colorectal cancer	EpCAM ^{high} CD44+CD166+	(67)
Pancreatic cancer	CD24+CD44+ESA+	(4)
Lung adenocarcinoma	Sca1+CD45-Pecam-CD34+	(68)
Bone sarcoma	Stro1+CD105+CD44+	(69)

There are two models of cancer growth, which explain the development of tumors. The *stochastic model* states that every cancer cell is capable of proliferating and regenerating a tumor. The other model is, of course, *the cancer stem cell model*, which, as stated before, states that only a small group of cells within the tumor population is capable of initiating and continuing tumor growth (45). This suggests that knowledge of the cell surface phenotypes for hematopoietic stem cells (HSCs-blood cells derived from mesoderm and located in the red bone marrow) and progenitor cells may allow the isolation of similar subpopulations from different tumor types such as acute myeloid leukemia (2).

Chemoresistance, radioresistance and reactive oxygen species as targets

CSCs are most likely responsible for tumor chemoresistance and recurrence because of their unlimited self-renewal capacity. During experiments, in animal models, the multidrug resistance transporter breast cancer resistant protein 1 (BCRP1) was identified to be the molecular determinant of enriching cancer stem cells. Additionally, neuroblastoma cells were more resistant to the effects of drugs and are contributors of the overall drug resistance phenotype of relapsed or resistant cancers besides sharing characteristics of tumor stem cells. Brain tumor stem cells increased resistance in response to treatment with chemotherapeutic agents. Clinically speaking, tumors respond to chemotherapies only to come back more aggressive because

if the chemotherapy destroys most of the cells in a tumor, CSCs could be left behind in order to reoccur. Inhibitors of certain signaling pathways (Notch signaling pathway, for instance) show reduction of specific tumor stem cells such as in the brain, indicating a loss of tumor-forming capacity and finding a new therapeutic target.

CSCs also contributed to radiation resistance such as in highly malignant gliomas through activation of DNA damage checkpoint response and an increase in DNA repair. Specific inhibitors are necessary to reverse this radioresistance providing a therapeutic advantage to reducing brain tumor incidence, for instance. Since radiation treatment fails sooner or later because it may not kill subpopulation of tumor-initiating cells, creating therapies, which promote the differentiation of cancer cells, is the new goal.

Reactive oxygen species (ROS), such as superoxide (O_2^-) and its simultaneous oxidation and reduction (redox) product such as hydrogen peroxide (H_2O_2) have also been involved in the progression of cancer. Oxidative stress regulates various cellular processes correlated with transformed phenotype, including DNA damage, proliferation, cell adhesion and migration, and cell survival or death signaling. Therefore, in order to increase sensitivity to chemotherapeutic drugs and modulate tumor cell apoptosis, manipulation of cellular redox state is necessary. On top of that, there is a possibility that CSCs in malignant brain tumors, for instance, may have an altered ROS regulatory mechanism, which allows them to keep on self-renewing in response to chemotherapeutic agents (2).

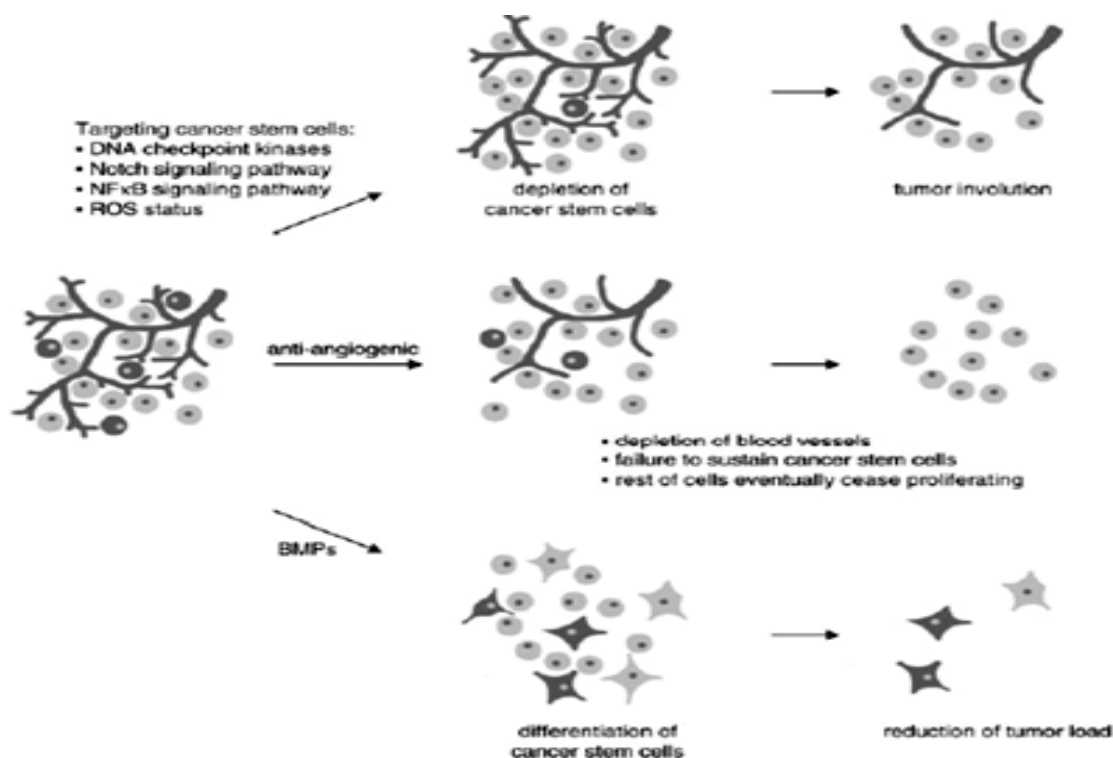


Figure 11. Therapeutic strategies. (Top) Targeting of cancer stem cells and their niche. (Middle) Anti-angiogenesis. (Bottom) Bone morphogenetic proteins (BMPs)

CONCLUSIONS

Cancer research is still growing and their treatments becoming more effective than years ago. Nevertheless, more knowledge and understanding about this serious disease is necessary. Fortunately, the current efforts of taking different approaches besides surgery and radiation are being emphasized having diverse studies mainly focusing on cancer-targeted therapy (45-69). Targeted therapies are changing the manner the scientific community treat cancer in order to design personalized treatments. Among the treatments that target specific agents at the molecular level, CSCs research seems to be the field where improvements may continue to be made because of their potential to develop into other diverse cell types, leading to get to the root of the problem by either eradicating or differentiating them. These targeted therapies definitely receive much attention over the past years and even though further studies need to be done, they could successfully treat or cure cancer.

REFERENCES

1. Mavroudi, M., Zarogoulidis, P., Porpodis, K., Kioumis, I., Lampaki, S., Yarmus, L., Malecki, R., Zarogoulidis, K., and Malecki, M. (2014). Stem cell's guided therapy of cancer: New frontier in personalized and targeted therapy. NIH Public Access, 2(1), 22-23. doi: 10.14312
2. Tang, C., Ang, B. T., and Pervaiz, S. (2007). Cancer stem cell: target for anti-cancer therapy. The FASEB Journal, 21, 3777-3785.
3. Soo, E. T. L., Yip, G.W.C., Lwin, Z.M., Kumar, S.D., and Bay, B. (2008). Heat Shock Proteins as Novel Therapeutic Targets in Cancer. In Vivo, 22, 311-316.
4. Wu, H., Chang, D., and Huang, C. (2006). Targeted Therapy for Cancer. Journal of Cancer molecules, 2(2), 57-66.
5. Faivre, S., Djelloul, S., and Raymond, E. (2006). New Paradigms in Anticancer Therapy: Targeting Multiple Signaling Pathways With Kinase Inhibitors. Seminars

- in Oncology, 33, 407-420.
6. Gil, J., Stembalska, A., Pesz, K.A., and Sasiadek, M.M. (2008). Cancer stem cells: the theory and perspectives in cancer therapy. *J App Genet*, 49(2), 193-199.
7. Schumacher, T., Bunse, L., Pusch, S., Sahm, F., Wiestler, B., Quandt, J., Menn, O., Osswald, M., Oezen, I., Ott, M., Keil, M., Balb, J., Rauschenbach, K., Grabowska, A. K., Vogler, I., Diekmann, J., Trautwein, N., Eichmüller, S. B., Okun, J., Stevanovic, S., Riemer, A. B., Sahin, U., Friese, M. A., Beckhove, P., von Deimling, A., Wick, W., and Platten, M. (2014). A vaccine-targeting mutant IDH1 induces antitumour immunity. *Nature*, 13387. 1-17. doi: 10.1038
8. Kleinsmith, L.J. (2006). *Principles of Cancer Biology*. San Francisco: Pearson Benjamin Cummings.
9. Singh, S. K., Hawkins, C., Clarke, I. D., Squire, J. A., Bayani, J., Hide, T., Henkelman, R. M., Cusimano, M. D., and Dirks, P. B. Identification of human brain tumour initiating cells. *Nature*. 2004 Nov 18; 432(7015):396-401.
10. Garcia M.A., Carrasco E., Ranirez A., Jimenez G., Lopez-Ruiz E., Peran M., et al: Apoptosis as a Therapeutic Target in Cancer Stem Cells: Novel strategies and Future Perspectives. in: Marchal et al, Chapter 5. 2012 INTECH, open access
11. Dabelsteen E.: Cell surface carbohydrates as prognostic markers in human carcinomas. 1996. *J Pathol*. 179:513-516
12. Kure S, Matsuda Y, Hagi M, Ueda J, Naito Z, Ishiwate T: Expression of cancer stem cell markers in pancreatic intraepithelial neoplasias and pancreatic ductal adenocarcinoma. *Spandidos Publications*, published online July 23, 2012
13. Jamieson KH: Chronic Myeloid Leukemia Stem Cells. *A S Hematol*, 2008, 436-442
14. W JC: Immunologic targeting of the cancer stem cells. 2014 1-37 stem book at : www.stembook.org/node/529
15. Jones RJ, Armstrong SA: Cancer Stem Cells in Hematopoietic malignancies. *BBMT*, 208, 14:12-16
16. Walter RB, Appelbaum RA, Estey HE, Bernstein ID: acute myeloid leukemia stem cells and CD33-targeted immunotherapy. *Blood*, 2012, 119:6198-6208
17. Hudziak RM, Lewis GD, Winget M, Fendly BM, Shepard HM, Ullrich A. p185HER2 monoclonal antibody has antiproliferative effects in vitro and sensitizes human breast tumor cells to tumor necrosis factor. *Mol Cell Biol* 9: 1165-1172, 1989.
18. Horton SJ, Huntly BKP: Advances in Acute Myeloid Leukemia Stem cell Biology. Review Article. *Haematologica*, 2012, 97(7):966-974
19. Carter P, Presta L, Gorman CM, Ridgway JB, Henner D, Wong WL, Rowland AM, Kottis C, Carver ME, Shepard HM. Humanization of an anti-p185HER2 antibody for human c
20. Martins AM, Vunjak-Novakovic G, Reis RL: The current status of iPSCs in cardiac research and their potential for tissue engineering and regenerative medicine. *Stem Cell Rev and rep*. 2014, 10:177-190
21. Press OW, Appelbaum F, Ledbetter JA, Martin PJ, Zarling J, Kidd P, Thomas ED. Monoclonal antibody 1F5 (anti-CD20) serotherapy of human B cell lymphomas. *Blood* 69: 584-591, 1987.
22. Reff ME, Carner K, Chambers KS, Chinn PC, Leonard JE, Raab R, Newman RA, Hanna N, Anderson DR. Depletion of B cells in vivo by a chimeric mouse human monoclonal antibody to CD20. *Blood* 83: 435-445, 1994.
23. Maloney DG, Liles TM, Czerwinski DK, Waldichuk C, Rosenberg J, Grillo-Lopez A, Levy R. Phase I clinical trial using escalating single-dose infusion of chimeric anti-CD20 monoclonal antibody (IDEC-C2B8) in patients with recurrent B-cell lymphoma. *Blood* 84: 2457-2466, 1994.
24. Czuczman MS, Grillo-Lopez AJ, White CA, Saleh M, Gordon L, LoBuglio AF, Jonas C, Klippenstein D, Dallaire B, Varns C. Treatment of patients with low-grade B-cell lymphoma with the combination of chimeric anti-CD20 monoclonal antibody and CHOP chemotherapy. *J Clin Oncol* 17: 268-276, 1999.
25. Slamon DJ, Clark GM, Wong SG, Levin WJ, Ullrich A, McGuire W.L. Human breast cancer: correlation of relapse and survival with amplification of the HER-2/neu oncogene. *Science* 235: 177- 182, 1987.

26. Naito K, Takeshita A, Shigeno K, Nakamura S, Fujisawa S, Shinjo K, Yoshida H, Ohnishi K, Mori M, Terakawa S, Ohno R. Calicheamicin-conjugated humanized anti-CD33 monoclonal antibody (gemtuzumab zogamicin, CMA-676) shows cytotoxic effect on CD33-positive leukemia cell lines, but is inactive on P-glycoprotein-expressing sublines. *Leukemia* 14: 1436-1443, 2000.
27. Boghaert ER, Khandke K, Sridharan L, Armellino D, Dougher M, DiJoseph JF, Kunz A, Hamann PR, Sridharan A, Jones S, Discafani C, Damle NK. Tumoricidal effect of calicheamicin immun-conjugates using a passive targeting strategy. *Int J Oncol* 28: 675-684, 2006.
28. Genentech Inc. Herceptin® (trastuzumab). in: Investigator brochure, Sept. San Francisco, 1998.
29. Lozanski G, Heerema NA, Flinn IW, Smith L, Harbison J, Webb J, Moran M, Lucas M, Lin T, Hackbarth ML, Proffitt JH, Lucas D, Grever MR, Byrd JC. Alemtuzumab is an effective therapy for chronic lymphocytic leukemia with p53 mutations and deletions. *Blood* 103: 3278-3281, 2004.
30. Kaufman DB, Leventhal JR, Gallon LG, Parker MA. Alemtuzumab induction and prednisone-free maintenance immunotherapy in simultaneous pancreas-kidney transplantation comparison with rabbit antithymocyte globulin induction □□long-term results. *Am J Transplant* 6: 331-339, 2006.
31. Lundin J, Osterborg A, Brittinger G, Crowther D, Dombret H, Engert A, Epentios A, Gisselbrecht C, Huhn D, Jaeger U, Thomas J, Marcus R, Nissen N, Poynton C, Rankin E, Stahel R, Upenkamp M, Willemze R, Mellstedt H. CAMPATH-1H monoclonal antibody in therapy for previously treated low-grade non-Hodgkin's lymphomas: a phase II multicenter study. European Study Group of CAMPATH-1H Treatment in Low-Grade Non-Hodgkin's Lymphoma. *J Clin Oncol* 16: 3257-3263, 1998.
32. Chinn PC, Leonard JE, Rosenberg J, Hanna N, Anderson DR. Preclinical evaluation of 90Y-labeled anti-CD20 monoclonal antibody for treatment of non-Hodgkin's lymphoma. *Int J Oncol* 15: 1017-1025, 1999.
33. Cheson BD. Radioimmunotherapy of non-Hodgkin lymphomas. *Blood* 101: 391-398, 2003.
34. Nademanee A, Forman S, Molina A, Fung H, Smith D, Dagis A, Kwok C, Yamauchi D, Anderson AL, Falk P, Krishnan A, Kirschbaum M, Kogut N, Nakamura R, O'Donnell, Parker P, Popplewell L, Pullarkat V, Rodriguez R, Sahebi F, Smith E, Snyder D, Stein A, Spielberger R, Zain J, White C, Raubitschek A. A phase 1/2 trial of high-dose yttrium-90-ibritumomab tiuxetan in combination with high-dose etoposide and cyclophosphamide followed by autologous stem cell transplantation in patients with poor-risk or relapsed non-Hodgkin lymphoma. *Blood* 106: 2896-2902, 2005.
35. Kaminski MS, Zasadny KR, Francis IR, Fenner MC, Ross CW, Milik AW, Estes J, Tuck M, Regan D, Fisher S, Glenn SD, Wahl RL. Iodine-131-anti-B1 radioimmunotherapy for B-cell lymphoma. *J Clin Oncol* 14: 1974-1981, 1996.
36. Vose JM, Wahl RL, Saleh M, Rohatiner AZ, Knox SJ, Radford JA, Zelenetz AD, Tidmarsh GF, Stagg RJ, Kaminski MS. Multicenter phase II study of iodine-131 tositumomab for chemotherapy-relapsed/refractory low-grade and transformed low-grade B-cell non-Hodgkin's lymphomas. *J Clin Oncol* 18: 1316-1323, 2000.
37. Liu SY, Eary JF, Petersdorf SH, Martin PJ, Maloney DG, Appelbaum FR, Matthews DC, Bush SA, Durack LD, Fisher DR, Gooley TA, Bernstein ID, Press OW. Follow-up of relapsed B-cell lymphoma patients treated with iodine-131-labeled anti-CD20 antibody and autologous stem-cell rescue. *J Clin Oncol* 16: 3270-3278, 1998.
38. Huang SM, Bock JM, Harari PM. Epidermal growth factor receptor blockade with C225 modulates proliferation, apoptosis, and radiosensitivity in squamous cell carcinomas of the head and neck. *Cancer Res* 59: 1935-1940, 1999.
39. Baselga J, Pfister D, Cooper MR, Cohen R, Burtneess B, Bos M, D'Andrea G, Seidman A, Norton L, Gunnett K, Falcey J, Anderson V, Waksal H, Mendelsohn J. Phase I studies of anti-epidermal growth factor re-

- ceptor chimeric antibody C225 alone and in combination with cisplatin. *J Clin Oncol* 18: 904-914, 2000.
40. Jimeno A, Rubio-Viqueira B, Amador ML, Oppenheimer D, Bouraoud N, Kulesza P, Sebastiani V, Maitra A, Hidalgo M. Epidermal growth factor receptor dynamics influences response to epidermal growth factor receptor targeted agents. *Cancer Res* 65: 3003-3010, 2005.
 41. Willett CG, Boucher Y, di Tomaso E, Duda DG, Munn LL, Tong RT, Chung DC, Sahani DV, Kalva SP, Kozin SV, Mino M, Cohen KS, Scadden DT, Hartford AC, Fischman AJ, Clark JW, Ryan DP, Zhu AX, Blaszkowsky LS, Chen HX, Shellito PC, Lauwers GY, Jain RK. Direct evidence that the VEGF-specific antibody bevacizumab has antivascular effects in human rectal cancer. *Nat Med* 10: 145-147, 2004.
 42. Ferrara N, Hillan KJ, Gerber HP, Novotny W. Discovery and development of bevacizumab, an anti-VEGF antibody for treating cancer. *Nat Rev Drug Discov* 3: 391-400, 2004.
 43. Sonpavde G. Bevacizumab in colorectal cancer. *N Engl J Med* 351: 1690-1691, 2004.
 44. Kabbinavar FF, Schulz J, McCleod M, Patel T, Hamm JT, Hecht JR, Mass R, Perrou B, Nelson B, Novotny WF. Addition of bevacizumab to bolus fluorouracil and leucovorin in first-line metastatic colorectal cancer: results of a randomized phase II trial. *J Clin Oncol* 23: 3697-3705, 2005.
 45. Mayfield J and Pavlovic M : A Concept of Cancer Stem Cells: The Current understanding and a Look Ahead (2014) ART,41,1-2,pp:49-60
 46. Bonnet, D., and Dick, J. E. (1997) Human acute myeloid leukemia is organized as a hierarchy that originates from a primitive hematopoietic cell. *Nat. Med.* 3, 730-737
 47. Al-Hajj, M., Wicha, M. S., Benito-Hernandez, A., Morrison, S. J., and Clarke, M. F. (2003) Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 100, 3983-3988
 48. Collins, A. T., Berry, P. A., Hyde, C., Stower, M. J., and Maitland, N. J. (2005) Prospective identification of tumorigenic prostate cancer stem cells. *Cancer Res.* 65, 10946-10951
 49. Li, C., Heidt, D. G., Dalerba, P., Burant, C. F., Zhang, L., Adsay, V., Wicha, M., Clarke, M. F., and Simeone, D. M. (2007) Identification of pancreatic cancer stem cells. *Cancer Res.* 67, 1030-1037
 50. O'Brien, C. A., Pollett, A., Gallinger, S., and Dick, J. E. (2007) A human colon cancer cell capable of initiating tumour growth in immunodeficient mice. *Nature* 445, 106-110
 51. Patrawala, L., Calhoun, T., Schneider-Broussard, R., Li, H., Bhatia, B., Tang, S., Reilly, J. G., Chandra, D., Zhou, J., Claypool, K., Coghlan, L., and Tang, D. G. (2006) Highly purified CD44⁺ prostate cancer cells from xenograft human tumors are enriched in tumorigenic and metastatic progenitor cells. *Oncogene* 25, 1696-1708
 52. Prince, M. E., Sivanandan, R., Kaczorowski, A., Wolf, G. T., Kaplan, M. J., Dalerba, P., Weissman, I. L., Clarke, M. F., and Ailles, L. E. (2007) Identification of a subpopulation of cells with cancer stem cell properties in head and neck squamous cell carcinoma. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 104, 973-978
 53. Ricci-Vitiani, L., Lombardi, D. G., Pilozzi, E., Biffoni, M., Todaro, M., Peschle, C., and De Maria, R. (2007) Identification and expansion of human colon-cancer-initiating cells. *Nature* 445, 111-115
 54. Gaitanis A, Staal S. Liposomal doxorubicin and nab-paclitaxel: nanoparticle cancer chemotherapy in current clinical use. *Cancer Nano* 2010; Humana Press: 385-92.
 55. Graishar WJ, Tjulndin S, Davidson N, Shaw H, Desai N, Bhar P, et al. Phase III trial of nanoparticle albumin-bound paclitaxel compared with polyethylated castor oil-based paclitaxel in women with breast cancer. *J Clin Oncol* 2005; 23(31): 7794-80.
 56. Farokhzad OC, Jon S, Khademhosseini A, Tran TNT, LaVan DA, Langer R. Nanoparticle-aptamer bioconjugates a new approach for targeting prostate cancer cells. *Cancer Res* 2004; 64(21): 7668-72.
 57. Kirson ED, Gurvich Z, Schneiderman R, Dekel E, Itzhaki A, Wasserman Y, et al. Disruption of cancer cell replication by alternating electric fields. *Cancer Res* 2004; 64(9): 3288-95.

58. Stupp R, Wong ET, Kanner AA, Steinberg D, Engelhard H, Heidecke V, et al. NovoTTF-100A versus physician's choice chemotherapy in recurrent glioblastoma: a randomised phase III trial of a novel treatment modality. *Eur J Cancer* 2012; 48(14): 2192-202.
59. Dylla SJ, In: Kyung P, Gurney AL. Emerging technology platforms for stem cells. New Jersey: Wiley; 2009th.
60. Pavlovic M, Balint B. Stem Cells and Tissue Engineering. New York: Springer; 2013th
61. Reya T, Morrison SJ, Clarke MF, Weissman IL. Stem cells, cancer, and cancer stem cells. *Nature* 2001; 414(6859): 105-11.
62. Fang, D., Nguyen, T. K., Leishear, K., Finko, R., Kulp, A. N., Hotz, S., Van Belle, P. A., Xu, X., Elder, D. E., and Herlyn, M. (2005) A tumorigenic subpopulation with stem cell properties in melanomas. *Cancer Res.* 65, 9328–9337
63. Dalerba, P., Dylla, S. J., Park, I. K., Liu, R., Wang, X., Cho, R. W., Hoey, T., Gurney, A., Huang, E. H., Simeone, D. M., Shelton, A. A., Parmiani, G., Castelli, C., and Clarke, M. F. (2007) Phenotypic characterization of human colorectal cancer stem cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 104, 10158 –10163
64. Kim, C. F., Jackson, E. L., Woolfenden, A. E., Lawrence, S., Babar, I., Vogel, S., Crowley, D., Bronson, R. T., and Jacks, T. (2005) Identification of bronchioalveolar stem cells in normal lung and lung cancer. *Cell* 121, 823–835
65. Gibbs, C. P., Kukekov, V. G., Reith, J. D., Tchigrinova, O., Suslov, O. N., Scott, E. W., Ghivizzani, S. C., Ignatova, T. N., and Steindler, D. A. (2005) Stem-like cells in bone sarcomas: implications for tumorigenesis. *Neoplasia* 7, 967–976
66. Fang, D., Nguyen, T. K., Leishear, K., Finko, R., Kulp, A. N., Hotz, S., Van Belle, P. A., Xu, X., Elder, D. E., and Herlyn, M. (2005) A tumorigenic subpopulation with stem cell properties in melanomas. *Cancer Res.* 65, 9328–9337
67. Dalerba, P., Dylla, S. J., Park, I. K., Liu, R., Wang, X., Cho, R. W., Hoey, T., Gurney, A., Huang, E. H., Simeone, D. M., Shelton, A. A., Parmiani, G., Castelli, C., and Clarke, M. F. (2007) Phenotypic characterization of human colorectal cancer stem cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 104, 10158 –10163
68. Kim, C. F., Jackson, E. L., Woolfenden, A. E., Lawrence, S., Babar, I., Vogel, S., Crowley, D., Bronson, R. T., and Jacks, T. (2005) Identification of bronchioalveolar stem cells in normal lung and lung cancer. *Cell* 121, 823–835
69. Gibbs, C. P., Kukekov, V. G., Reith, J. D., Tchigrinova, O., Suslov, O. N., Scott, E. W., Ghivizzani, S. C., Ignatova, T. N., and Steindler, D. A. (2005) Stem-like cells in bone sarcomas: implications for tumorigenesis. *Neoplasia* 7, 967–976.

AIXMED

Beograd, Aleksandra Stambolickog 27, tel: 011/2667 368, fax: 011/3067 774, @: abmed@EUnet.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 urgencije, centre i kate hitne pomoći 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 efikasan komplet za primenu u hitnim slučajevima 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 rutinsku anesteziju. Dizajniran da obezbedi gastriku drenažu sa odvojenim tubusom za respiratorni i digestivni tok, poboljšano zaptivanje.



LMA Fastrach™

Dizajnirana za upotrebu kod predviđenog ili nepredviđenog teškog disajnog puta. Može se koristiti alternativno ili da obezbedi intubaciju tokom "na stopu"



LMA Flexible™

Flexibilna LMA dizajnirana za upotrebu u kirurški i glavu, vrat i mane duplje



LMA CTrach™

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

SAVREMENI KRITERIJUMI ZA IZBOR DAVALACA KRV I HEMOPRODUKATA

Dušan Vučetić^{1,2}, Bela Balint^{1,2}, Gordana Ostojić^{1,2}, Marika Ljubenov^{1,2}, Dragana Jovičić-Gojkov¹¹Institut za transfuziologiju i hemobiologiju VMA, Beogra;²Medicinski fakultet VMA, Univerzitet odbrane, Beograd;

SAŽETAK

Transfuziološke ustanove u Srbiji zavise od dobrovoljnih neplaćenih davalaca, a da bi se podstaklo njihovo kontinuirano učešće, najvažnije je obezbediti adakvatne uslove za davanje krvi. Pored ovoga, imperativ savremene transfuziološke službe je da prikupljene jedinice krvi i hemoprodukata budu bezbedni i sigurni za terapijsku primenu kod bolesnika. Zbog toga se svi koji rade na poslovima prikupljanja, obrade i obezbeđivanja adekvatnih količina krvi i produkata moraju pridržavati zahteva propisanih od strane državnih institucija koji će biti u skladu sa svetskim normativima. Proces skriningovanja davalaca je jedan od najvažnijih postupaka, a cilj je da se nakon pregleda transfuziologa identifikuju elementi ili događaji koji su mogli uticati da se dobije bolest koja se prenosi transfuzijom. Pored toga davaoci se obaveštavaju da će krv biti testirana na markere transfuzijski transmisivnih bolesti. Svrha svega ovoga je da davanje krvi ne naškodi davaocu, a isto tako da transfuzija krvi ili produkata ne dovede do neposrednih odnosno odloženih komplikacija kod primalaca. Ukoliko davalac smatra da postoji neki razlog zbog čega njegovu krv ne bi trebalo davati bolesnicima, može se saopštiti određenoj osobi i na taj način izbeći izlaganje riziku potencijalnih primalaca (tkz. samoisključivanje). Po zakonu se svaki davalac testira na prisustvo markera hepatitisa tipa B, C, virusa humane imunodeficijencije (HIV) i sifilisa, a u poslednje vreme i na virus Zapadnog Nila. Posebno su opisani kriterijumi za autologne kao i aferezne davaoce krvi.

Ključne reči: davaoci krvi, transfuzija, kriterijumi, sigurnost krvi

UVOD

Danas se većina transfuzioloških centara oslanja na dobrovoljne, neplaćene davaoce krvi, što je usklađeno sa politikom i etičkim stavovima Međunarodne organizacije za transfuziju krvi (ISBT), Svetske zdravstvene organizacije (WHO) i Međunarodne federacije Crvenog krsta i Crvenog polumeseca. One su zvanično 1991. godine u Budimpešti usvojile definiciju dobrovoljnog, neplaćenog davaoca krvi, koja glasi: "Dobrovoljni, neplaćeni davaoci krvi su ljudi koji daju krv, plazmu ili druge komponente krvi prema svojoj slobodnoj volji i zato ne primaju nikaku nadoknadu, bilo kao gotov novac ili nešto drugo što može da nadomesti novac". U razvijenim zemljama, troškove prikupljanja, testiranja, obrade i distribucije krvi i krvnih komponenata, finansiraju vlade ili specijalni zdravstveni fondovi. Plaćeni davaoci postoje u zemljama u razvoju gde transfuziološka služba postoji u okviru bolnica, a zadržavanje rezervi zavisi od usmerenih davanja.

Transfuziološki centri u Srbiji zavise od dobrovoljnih davalaca, a da bi se podstaklo njihovo kontinuirano učešće, najvažnije je obezbediti uslove da davanje krvi bude prijatno iskustvo. Osoblje mora biti profesionalno obučeno, dobro tehnički edukovano i ljubazno sa svakim davaocem. Svi koji rade na poslovima prikupljanja, obrade i distribucije krvi moraju se pridržavati zahteva propisanih od strane državnih institucija koji će biti u skladu sa svetskim normativima (1).

Izbor davalaca

Proces skriningovanja davalaca je jedan od najvažnijih postupaka od čega zavisi bezbedna i sigurna nadoknada krvi i krvnih produkata. Odgovarajući davaoci se određuju nakon pregleda lekara – transfuziologa. Cilj je da se identifikuju elementi iz medicinske anamneze i ponašanja, ili događaji koji su bili rizični da se dobije bolest koja se može preneti transfuzijom

(1). Informacije prezentovane davaocima moraju biti jasne, da bi o svemu bili informisani kada donesu odluku da daju krv. Isto tako, moraju znati da će krv biti testirana na markere transfuzijski transmisivnih bolesti (TTB) uključujući i virus humane imunodeficiencije (HIV), te će biti informisani u slučaju da rezultat bude pozitivan. Značajno im je nagovestiti da postoji mogućnost da nakon davanja krvi izvesno vreme osećaju slabost, kao i da ne treba tokom sledećih 12 sati da voze automobil, avion, autobus ili rade na mestima gde bi zbog te slabosti mogli da ugrozi sebe i druge (visoki kranovi, penjanje na planine ili ronjenje).

Izbor davalaca se zasniva na medicinskoj anamnezi i adekvatnom pregledu lekara-transfuziologa na dan davanja krvi, da bi se ustanovilo da li će davanje krvi naškoditi davaocu ili će transfuzija krvi naškoditi primaocu (2, 3, 4). Važno je utvrditi da davalac nema u medicinskoj anamnezi dijabetes, infarkt, epilepsiju, cirozu jetre, bolest disajnog, srčanog ili bubrežnog sistema koje bi mogle dovesti do odbijanja od davanja krvi. U slučaju da se davalac razboli dve nedelje nakon davanja krvi, treba da obavesti transfuziološki centar gde je dao krv, u kom slučaju se njegova krv ili plazma može izdvojiti iz terapijske upotrebe (prema proceni transfuziologa). Davaoci kod kojih se razvije hepatitis tipa B ili C, odnosno infekcija HIV-om nakon tri do šest meseci, takođe su dužni da učine isto.

Pitanja koja se odnose na medicinsku anamnezu postavljaju lekari, a pored toga se obavezno popunjava za to propisani formular. Direktna pitanja koja se odnose na rizična ponašanja povezana sa HIV-om, mora postavljati isključivo lekar u neposrednom razgovoru i apsolutnu izolovanost (2, 3).

Medicinska anamneza

Tokom uzimanja medicinske anamneze neophodno je dobiti odgovore na neka specifična pitanja, koji će davaocu garantovati maksimalnu bezbednost tokom davanja krvi a primaocu sigurnu krv. Postavljaju se opšta ili ciljana pitanja jednostavnim jezikom koji svaki davalac razume. Onima koji ne ispunjavaju uslove daje se potpuno objašnjenje o razlozima odbijanja, kao i kada mogu ponovo doći, da ne bi izazvali negativno osećanje o sebi (2, 3).

U nekim transfuziološkim centrima postoji i mogućnost da davaoci sami odluče da li je njihova krv prihvatljiva za transfuziju drugima ili ne. Takozvana "Confidential donor exclusion", omogućava da se poverljiva informacija saopšti samo određenoj osobi, i na taj način izbegne davanje krvi ako davalac smatra da postoji neki razlog zbog čega njegovu krv ne bi trebalo davati bolesnicima (5).

Zaštita davalaca krvi

Značajno je znati da li je davalac ikada davao krv, plazmu ili trombocite. Po svetskim standardima daje se 450 ± 45 ml krvi, odn. ne više od 500 ml krvi u vremenskom intervalu ne kraćem od 12 nedelja (do 13% od procenjenog volumena krvi). Pored toga, treba dodati i 20–30ml krvi za analize. Prema američkim standardima, najkraći interval između dva davanja može biti osam nedelja, odnosno za godinu dana se može prikupiti najviše dve litre krvi (4). Drugim rečima, po jednom davanju ne bi trebalo prikupiti više od 10,5ml cele krvi po kilogramu telesne mase, računajući i uzorke za testiranje (4). U nekim državama se uzima manje od 450 ml krvi, na pr. u Turskoj, Grčkoj i Italiji (350 – 400 mL), a u nekim zemljama Azije gde su i ljudi manji svega 250 mL krvi. Prema standardima u Velikoj Britaniji, krv treba davati u razmaku od 16 nedelja (6), te se zbog toga sugerise najviše dva do tri davanja krvi tokom godine. Žene ne mogu davati krv često kao muškarci (razmak od najmanje 16 nedelja). Trudnice ne mogu davati krv, kao ni žene koje su bile trudne tokom prethodne godine. Veoma je značajno da li je davalac ikada bio privremeno odbijen ili za stalno, kao i razlog (medicinski ili rezultat testiranja).

Dobrovoljni davalac krvi mora da ima najmanje 18 godina. Poslednjih decenija je gornji limit za dobrovoljne davaoce krvi bio 66 godina (6). U poslednje vreme su modifikovani propisi, te je dozvoljeno davanje i nakon tih godina, ako su svi ostali zdravstveni parametri u granicama normale (6). Tako je u Velikoj Britaniji i Danskoj produženo na 70 godina (6), a gornji limit za davaoca koji prvi put daje krv u životu je 60 godina. Hirurške procedure tokom poslednjih 12 meseci, kao i značajna oboljenja imaju ogroman značaj u anamnezi. Naime, davaoci koji su imali neku veću operaciju moraju biti privremeno odbijeni za šest meseci,

a ako su primali krv, krvne komponente ili derivate krvi, moraju biti odbijeni tokom sledećih 12 meseci. Ozbiljna oboljenja srca, kao što su koronarna srčana bolest, infarkt miokarda, aritmije, kardiomiopatija ili reumatsko oboljenje srca sa komplikacijama, kao i terapija beta blokatorima, su razlozi za odbijanje davalaca. Pojedinačne epizode reumatske groznice ili perikarditisa, šum na srcu ili uspešna operacija kongenitalne srčane mane nisu razlozi za odbijanje davalaca. Osobe koje uzimaju antihipertenzivnu terapiju mogu davati krvi nakon individualne procene lekara, osim ako nije u pitanju maligna hipertenzija u kom slučaju se odbijaju. U slučajevima kada je krvni pritisak iznad dozvoljenih vrednosti, ne može se dati krv zbog rizika od vaskulnog akcidenta kao posledice naglog snižavanja krvnog pritiska (2, 3).

Aktivna tuberkuloza pluća ili aktivna bolest pluća predstavljaju razlog za odbijanje davalaca. Ranija uspešno izlečena tuberkuloza, koja nije aktivna, nije razlog za odbijanje davalaca, te se nakon 24 meseca od potpunog izlečenja može dati krv (6). Blaga i asimptomatska astma ne predstavlja kontraindikaciju za davanje krvi osim, ako postoje simptomi bolesti ili je davalac pod terapijom oralnim kortikosteroidima odn. završio lečenje u poslednjih sedam dana (6). Osobe sa simptomima teškog hroničnog bronhitisa ne mogu davati krv.

Aktivna inflamatorna ili hronična bolest jetre je razlog zbog koga se mora odbiti davaoc.

Hronični nephritis je kontraindikacija za davanje krvi dok akutni nije, već se nakon pet godina od izlečenja može dati krv (6).

Postojanje babesioze, Chagasove bolesti, filarijaze i lajšmanijaze u ličnoj anamnezi, je dovoljan razlog zbog koga se nikada ne može dati krv.

Potencijalni davaoci sa epilepsijom ili konvulzivnim poremećajima zahtevaju individualnu procenu (2, 3, 5). Generalno, osobe kod kojih su konvulzivni poremećaji pravilno lečeni medikamentima, odnosno ako tri godine nisu bili pod terapijom lekovima ili imali epileptički napad, mogu biti davaoci krvi (2,3,5).

Generalno, tragovi lekova u krvi i komponentama krvi nisu štetni za primaoca. Neophodno je odrediti razlog zbog kojeg se lek uzima ili je uziman. Odbijanje davalaca zbog lekova je zasnovano na prirodi procesa bolesti, a ne na karakteristikama samog leka, na pr.

oboljenja kardiovaskulnog sistema, dijabetes, anemija i maligne bolesti (7, 8).

Ako je davalac u dobrom zdravstvenom stanju, odbijanje od davanja krvi se odnosi na period od sedam dana nakon završetka terapije antibioticima, antifungicidima ili antivirusicima. Zbog mnoštva različitih preporuka o dozvoljenim lekovima (2, 3, 9, 10) navedeni su oni osnovni i najčešće korišćeni u kliničkoj praksi kada se davaocima može dozvoliti da daju krv: tetraciklini (za acne vulgaris); kortikosteroidi (za kožne promene se ne smeju aplikovati na mesto venepunkcije); antihipertenzivi, bronhodilatatori, oralni hipoglikemici, hipnotici (uzeti uveče pred spavanje); oralni kontraceptivi, blagi analgetici, vitamini, hormoni (tiroksin); aspirin i piroksikam.

Veliki gubitak telesne težine bez jasnog razloga (preko 4,5 kg), bi mogao da ukazuje na nedijaagnostikovanu ozbiljnu bolest koju je neophodno detaljno ispitati.

Davaoci koji imaju hemofiliju ili slično oboljenje krvi, a primaju činioce koagulacije krvi, ne mogu davati krv ili krvne komponente. Osobe koje su imale seksualne odnose sa hemofilicarima primaocima koncentrovanih činoca koagulacije ne mogu davati krv u trajanju od 12 meseci.

Kod bolesnika sa polycythaemiom verom eritrociti preživljavaju normalno, međutim, krv nije prihvatljiva za terapijske svrhe, s obzirom na činjenicu da se kod takvih bolesnika ponekad razvija leukemija. U stvari, rizik od dobijanja grafta malignih ćelija od davaoca je beznačajan, izuzev kod primalaca čiji su imuni mehanizmi suprimirani bolešću ili lekovima (8). Davaoci koji su oboleli ili su lečeni od neke vrste malignog oboljenja (osim karcinoma in situ cerviksa), leukemije ili limfoma kao i drugih malignih bolesti, moraju biti definitivno isključeni od strane nadležnog transfuzijologa. Osobe sa adenomatoznim polipima kolona sa karcinomom in situ, skvamoznim karcinomom in situ cerviksa uterusa, papilarnim karcinomom štitne žlezde se mogu prihvatiti kao davaoci nakon individualne procene lekara (6).

Nenormalna tendencija krvarenja može biti uzrok za odbijanje davalaca dok se ne utvrdi stvaran uzrok i oboljenje. Isto tako antikoagulantna terapija u lečenju kardiovaskulnih bolesti, tromboza ili tromboflebitisa predstavlja kontraindikaciju za davanje krvi, a ova terapija može biti nepovoljna i za primaoca krvi (8).

Osobe obbolele od autoimunih bolesti kod kojih je zahvaćeno više od jednog organa ne mogu nikada biti dobrovoljni davaoci krvi.

Na kraju, davalac mora biti u dobrom zdravstvenom stanju, što znači da kašalj, gušobolja, glavobolja, muka, vrtoglavica, menstrualne tegobe ili nervoza mogu biti razlog da se davalac privremeno odbije.

Zaštita primalaca krvi

Hepatitis

Da bi se primaoci krvi i hemoprodukata zaštitili od prenošenja virusa hepatitisa tipa B i C, neophodno je u anamnezi dobiti podatke da li je davalac krvi nekad bolovao od hepatitisa ili je imao pozitivan rezultat na testiranju za hepatitis. Značajno je znati da li je i kada imao kontakt sa osobom koja ima hepatitis, bitni su podaci o tetoviranju, akupunkturi, upotrebi intravenskih narkotika.

Zbog svega toga ustanovljene su regulative (4, 6, 11) na osnovu kojih se davalac mora trajno odbiti ako je: bio lečen od virusnog hepatitisa tipa B i/ili C, ili imao oboljenje jetre nepoznate etiologije praćeno žuticom; imao serološki potvrdno pozitivan rezultat testa na površinski antigen virusnog hepatitisa tipa B (HBsAg) i/ili potvrdno pozitivan rezultat testa na hepatitis tipa C, bio intravenski uživatelj narkotika, seksualni partner osobe koja trenutno ima hepatitis tipa B ili tipa C ili je serološki pozitivna na ove hepatitise.

Malarija

Davalac koji je imao malariju ili profilaktički uzimao lekove protiv malarije tokom ili nakon posete endemičnoj regiji, mora biti odbijen u naredne tri godine nakon poslednjeg napada malarije odnosno prestanka uzimanja terapije (5). Imigrant ili posetilac iz endemične regije može biti davalac krvi tek tri godine nakon napuštanja regije u kojoj vlada malarija, pod uslovom da nema nikakve simptome i da nije uzimao lekove protiv malarije.

Sindrom stečene imunodeficijencije – AIDS

S obzirom na sve veći broj slučajeva oboljevanja od AIDS-a, neophodno je prilikom selekcije davalaca obratiti pažnju na simptome koji mogu ukazivati na ovo oboljenje. Zbog

toga je neophodno pitati za pojavu noćnog znojenja, nerazjašnjene povišene temperature, gubitak telesne težine, perzistentnu dijareju, te obratiti pažnju na generalizovano povećanje limfnih čvorova kao i neobičnih lezija kože (potkožnih ljubičastih čvorova) (12). U anamnezi je značajno saznati za seksualne kontakte sa osobama koje su pod povećanim rizikom oboljevanja od AIDS-a, a tu spadaju i osobe koje su imale homoseksualne odnose sa muškarcem od 1977. godine (13). Osobe koji su obbolele ili imaju neki simptom AIDS-a, odnosno laboratorijski dokazanu infekciju HIV-om (potvrdno pozitivan rezultat testa) se svakako moraju odbiti, kao i oni koji su imali homoseksualne ili odnose sa prostitutkama u poslednjih šest meseci (13). Isto tako se moraju odbiti intravenski uživaoci narkotika ili drugih droga, hemofilicari.

Virus Zapadnog Nila

Standardne procedure koje se već primenjuju treba da rezultuju odbijanjem potencijalno zaraženih osoba koji imaju simptome infekcije virusom Zapadnog Nila (WNV) u momentu davanja krvi. Takvi pojedinci mogu imati groznicu, glavobolju, bol u očima, bolove u mišićima, generalizovani osip ili otok limfnih čvorova. U slučajevima gde postoji sumnja na bolest izazvanu WNV odn. potvrđenu akutnu infekciju, period odbijanja se odnosi na asimptomatski period inkubacije od četrnaest dana i na potencijalni viremični period koji iznosi 120 dana (tu spada prolongirana viremija i uračunata dodatna sigurnosna granica). Nakon 120 dana ovi davaoci se mogu uključiti u redovnu proceduru davanja krvi. Kada ne postoji nijedan dokaz o postojanju bolesti u prethodne dve nedelje (pozitivnost na PCR testu u mini pulu ili pojedinačnom testiranju), izolovan rezultat IgM pozitivnosti ne može biti razlog za odbijanje davaoca u vreme kolekcije krvi (4, 6).

Vakcinacije i imunizacije

Značajno je da li su davaoci bili podvrgnuti nekoj vrsti vakcinacije tokom poslednjih 12 meseci (6). Afebrilni i davaoci bez simptoma koji su nedavno imunizovani tokoidom, mrtvom vakcinom, vakcinom protiv bakterija ili rikecija mogu dati krv. To su vakcine protiv kolere, influence, hemophilus influenzae tip B,

difterije, tetanusa, pertusisa, hepatitisa tipa A i B. Davaoci mogu dati krv četiri nedelje nakon imunizacije zbog malih boginja, zauški, žute groznice, polio vakcine (14, 15).

Objektivni nalaz

Za svakog pojedinačnog dobrovoljnog davaoca se mora proceniti opšte stanje. Dobrovoljni davalac krvi može biti svaka zdrava osoba muškog ili ženskog pola, starosti od 18–65 godina koja zadovoljava sledeće kriterijume (14, 16):

- Da je zdrava, dobrog opšteg stanja, da nije intoksiciran, da je koža na mestu punkcije bez lezije, ekcema ili infekcije
- Telesne težine veće od 50 kg
- Telesne temperature niže od 37°C
- Puls između 50–100 otkucaja/min
- Krvnog pritiska: ne višeg od 180/100 mmHg i ne nižeg od 90/50 mmHg
- Auskultatorni nalaz nad plućima i srcem mora biti uredan
- Ždrelo ne sme biti upaljeno
- Limfne žlezde vrata i pazuha se ne smeju palpirati
- Jetra i slezina se ne smeju palpirati
- Hemoglobin mora biti iznad 135 g/L (hematokrit 0,40 L/L) za muškarce i 125 g/L (hematokrit 0,38 L/L) za žene
- Interval između davanja krvi je tri meseca za muškarce i četiri meseca za žene

Specijalne kategorije davalaca

Za pojedine kategorije davalaca mogu biti postavljeni i posebni zahtevi koji se odnose na uslove za davanje krvi.

Autologni davaoci krvi

Problem koji je često prisutan kod davalaca autologne krvi je što neki bolesnici ne mogu dati krv, jer ne ispunjavaju kriterijume za dobrovoljne davaoce krvi. Često su u pitanju hronične bolesti, ili niži hematokrit pre samog davanja krvi. Idealno bi bilo da se unapred prikupi jedna ili više jedinica krvi za planiranu hiruršku intervenciju, da bi se nakon toga primenom krvi vratila krvna slika u granice pre davanja autolognih jedinica krvi. Bolesnik mora dati pismenu saglasnost da daje autolognu krv, a ako je maloletan, onda to čine roditelj ili

staratelj. Bakterijemija je apsolutna kontraindikacija za davanje autologne krvi jer bakterije mogu proliferisati kada su skladištene na temperaturi od 1–6°C. U ostale kontraindikacije spadaju nestabilna angina pectoris, simptomatska aortna stenoza, valvularne mane, kongestivna srčana bolest, hipertenzija sa sistolnim pritiskom iznad 180 mmHg, respiratorna ili cerebrovaskulna oboljenja, trudnoća praćena anemijom, preeklampsijom, zaostajanjem u rastu fetusa ili problemima sa placentalnim krvotokom i epilepsija (8). Ne postoji limit godina koji se mora poštovati pri autolognom davanju krvi (17).

Vrednosti hemoglobina bi trebalo da su 110 g/L ili iznad, a hematokrita od 33% i više. Autologna davanja krvi bi trebalo da budu u razmaku od 72 sata, pošto je toliko neophodno za sintezu i mobilizaciju proteina i normalizaciju volumena plazme. Isto tako poslednja flebotomija bi trebalo da bude 72 sata pre operacije. Optimalno bi bilo sakupiti dve jedinice krvi (jednu nedeljno), i potom ostaviti 2–3 nedelje pre operacije, da se vrednosti krvnih parametara vrate na normalu. Strategije za prikupljanje autologne krvi su: preoperativno prikupljanje autologne krvi, intraoperativno spasavanje krvi, postoperativno spasavanje krvi i akutna normovolemijska hemodilucija. Autologna krv se primenjuje u ortopediji, urologiji, kardiovaskularnoj i grudnoj hirurgiji, neurohirurgiji, onkologiji, ginekologiji, kao i pri transplantacijama.

Donorske afereze

Svakom afereznom davaocu se mora izmeriti krvni pritisak, puls i težina, a da bi pristupio aferezi, ne može biti mlađi od 18 i stariji od 65 godina (6). Za davaoce komponenata pripremljenih aferezom, važe isti kriterijumi kao i za davaoce cele krvi. Trombocitaferenze se koriste za prikupljanje trombocita od nebiranih davalaca, članova porodice bolesnika ili od davalaca odgovarajućeg HLA fenotipa. Prednost ovakvog postupka je visok prinos trombocita dobijen od jedne osobe, i smanjena mogućnost ekspozicije bolesnika velikom broju antigena nebiranih davalaca.

Za aloimunizovane bolesnike koji su refraktorni na alogene trombocite nebiranih davalaca,

trombociti dobijeni aferezom (odabrani na osnovu kompatibilnog unakrsnog testa) predstavljaju jedini način da se postigne zadovoljavajući posttransfuzijski porast broja trombocita. Interval između davanja bi trebalo da bude najmanje dva dana i ovaj postupak se može primenjivati samo dva puta nedeljno odnosno najviše 24 puta godišnje (6). U svakom slučaju maksimalna zapremina prikupljene plazme ne bi trebalo da prelazi količinu od 500 mL. Za trombocitaferazu, broj trombocita mora biti iznad $150 \times 10^9/L$. Tokom trombocitaferaze broj trombocita davaoca pada za oko 30%, (nema klinički značaj) a vraća se na normalu za 72 sata (18). Veoma je značajno da li davaoci uzimaju neke medikamente – naročito aspirin tokom pet dana, ili druge nesteroidne anti-reumatike poslednjih 48 sati (Ibuprofen, Ketoprofen, Indometacin, Diklofenak, Piroxicam), jer se bolesniku daje samo jedna jedinica trombocita.

Davaoci za leukocitaferazu moraju imati apsolutni broj granulocita iznad $4 \times 10^9/L$. Zbog neophodne primene kortikosteroidne stimulacije (radi povećanja broja granulocita), moraju se ispitati zbog hipertenzije, dijabetesa i ulkusne bolesti. Isto tako se odbijaju i davaoci koji imaju interkurentne bolesti koje mogu egzacerbirati nakon terapije kortikosteroidima. Pre započinjanja procedure neophodno je proveriti vrednost hematokrita odnosno hemoglobina (ne niži od 125g/L za muškarce odn. 115g/L za žene). Tokom godinu dana se dozvoljava najviše 12 leukocitaferaza. Afereze se koriste za sakupljanje plazme u terapijske svrhe kao zamrznuta sveža plazma (ZSP), ili kao izvor za derivate plazme. Regulative su drugačije od onih koji važe za celu krv ili trombocitaferazu. Postoji razlika između *povremenih* plazmaferaza, gde davaoci imaju plazmaferazu nakon četiri nedelje i *serijskih* plazmaferaza gde su plazmaferaze češće. Između dve plazmaferaze mora proći najmanje 48 sati, ne više od dve plazmaferaze nedeljno, a vantelesni volumen krvi tokom procedura ne bi trebalo da bude veći od 15% ukupnog volumena krvi davaoca. Maksimalni volumen plazme dobijene od davaoca tokom godine iznosi 15 litara (4,6, 16).

LITERATURA

1. Kasprisin C, Laird-Fryer B, eds. Blood donor collection practices, Bethesda: AABB Press, 1993.
2. Vučetić D. Kriterijumi za izbor davalaca krvi/hemoprodukata. In: B. Balint, M. Trkuljić. Osnovi transfuziologije. Beograd: Čigoja štampa; 2002. p. 103–121
3. Vučetić D. Izbor davalaca krvi i hemoprodukata. In: B. Balint. Transfuziologija. Beograd: Zavod za udžbenike i nastavna sredstva; 2004. p. 223–40
4. Thomas H. Carson. Standards for blood banks and transfusion services. 28st ed. Bethesda: AABB Press, 2012.
5. Smith KJ, Simon TL. Recruitment and evaluation of blood and plasma donors. In: Rossi EC, Simon TL, Moss GS eds. Principles of transfusion medicine. 2nd ed. Baltimore: Williams & Wilkins; 1995. p. 871–9.
6. United Kingdom Blood Transfusion Services & National Institute for Biological Standards & Controls. Donor selection guidelines (DSG) Edition 008 (DSG008), Issued 02. In: The Guidelines for the Blood Transfusion Services in the United Kingdom, Eight edition, Watford, UK, The Quality System, 2013.
7. Tomasulo PA, Anderson AJ, Paluso MB, Gutschenutter MA, Aster RH. A study of criteria for blood donor deferral. Transfusion 1980; 20: 511–8.
8. Klein HG, Anstee DJ. Mollison's Blood Transfusion in Clinical Medicine. 12th ed. Oxford: Wiley–Blackwell, 2014.
9. Widmann FK. Questions and answers. American Association of Blood Banks News Briefs 1978; 8: 41–3.
10. Armed Services Blood program Office. Drugs and medications. ([http://memedications.\(http://www.tricare.osd.mil/asbpo/asb_drug.html](http://memedications.(http://www.tricare.osd.mil/asbpo/asb_drug.html))
11. Food and Drug Administration. Memorandum: Exemptions to permit persons with a history of viral hepatitis before the age of eleven years to serve as donors of whole blood and plasma: alternate procedures. April 23, 1992. Rockville, MD. CBER Office of Communication, Training and Manufacturers Assistance, 1992.
12. Food and Drug Administration. Memorandum: Revised recommendations for the prevention of human immunodeficiency virus (HIV) transmission by blood and blood products—section I, parts A&B only. December 5, 1990. Rockville, MD: CBER Office of Communication, Training and

- Manufacturers Assistance, 1990.
13. Esber EC. FDA, OBRR. Recommendations concerning persons at increased risk of HIV-1 and HIV-2 infection. April 6, 1988.
 14. Roback JD, Grossman BJ, Harris T, Hillyer CD. Technical Manual, 17th ed. Bethesda: AABB Press; 2011.
 15. Denise M. Harmening. Modern Blood Banking & Transfusion Practices, 6th ed. Philadelphia: F.A Davis Company; 2012. Guide to the preparation, use and quality as
 16. surance of blood components. 17th edition Council of Europe, January 2013. Council of Europe Publishing.
 17. Greenwalt TJ. Autologous and aged blood donors. JAMA 1987; 257: 1220-1.
 18. Westphal RG. Complications hemapheresis. In: Westphal RG, Kasprisin DO, eds. Current status of hemapheresis: Indications, technology and complications. Arlington, VA: American Association of Blood Banks, 1987. p. 87-104.



Drägermedical

A Dräger and Siemens Company

Dräger Tehnika d.o.o.
Tošin Bunar 41,
11000 Beograd
tel: 011 22 88 001
fax: 011 22 88 002
e-mail: office@draeger.rs



Već više od sto godina kompanija Drägerwerk AG & Co, je vodeća u svetu u obezbeđivanju inovativnih sistema aparata u oblasti anestezije i intenzivne akutne nege, kao i kompletnih rešenja sistema razvoda medicinskih gasova.

Kompanija Dräger prisutna je na našem tržištu od 1952. godine, zahvaljujući izuzetnom kvalitetu poslovanja kao i uslugama servisa koji na našem tržištu posluje saglasno svim svetskim standardima više od 37 godina, kompanija Dräger je izgradila renome ozbiljnog i korektnog partnera svim zdravstvenim ustanovama u Srbiji i Crnoj Gori.

Kao jedan od generatora razvoja EN normi i standarda u oblasti razvoda medicinskih gasova i sistema Dräger je postao prepoznatljivo ime u pomenutoj oblasti.

Pored pomenutog Dräger nudi kompletne radne stanice za hitnu pomoć, neonatalnu medicinu, oprema za operacione sale, fleksibilna rešenja za praćenje pacijenata, obezbeđujući pri tom optimalnu terapije u svim oblastim.

TERAPIJSKE IZMENE PLAZME U LEČENJU IMUNONEUROLOŠKIH BOLESNIKA

Gordana Ostojic^{1,2}, Marika Ljubenov^{1,2}, Milena Todorović-Balint³, Dragana Obradović^{1,2},
Dragana Jovićić-Gojkov¹, Bela Balint^{1,2,4}

¹Vojnomedicinska akademija, Beograd; ²Medicinski fakultet VMA, Univerzitet odbrane, Beograd;

³Klinika za hematologiju, Klinički Centar Srbije, Beograd; ⁴Institut za medicinska istraživanja, Univerzitet u Beogradu.

SAŽETAK

Uvod: Terapijska izmena plazme (TIP) je aferezna procedura sa ekstrakorporalnom cirkulacijom čije izvođenje ima za cilj smanjenje koncentracije ili otklanjanje specifičnog patogena iz plazme, uz nadoknadu otklonjenog volumena nekom pogodnom tečnošću. Dugi niz godina se TIP koristila u velikom broju indikacija, u nekima je TIP standardna, odnosno primarna terapijska linija, dok je za druge dodatna, suportivna terapija.

Cilj: Stalno uvođenje novih i sve efikasnijih imunomodulacijskih i drugih medikamenata (kortikosteroida, imunoglobulina, specifičnih antitela), dovodi u pitanje izvođenje TIP kod neuroloških bolesnika i zahteva kritičku analizu postignutih efekta. Zato su analiza njene primene i opravdanosti ovog vida lečenja, uz osvrt na najčešće indikacije u neuroloških bolesnika od izuzetnog značaja za sagledavanje mesta i uloge TIP u lečenju ove grupe bolesnika.

Materijal i metodi: Izvršena je retrospektivna analiza indikacija i uspešnosti primene TIP za ukupno 385 TIP, kao i procentualni udeo TIP u lečenju neuroloških bolesnika u periodu od 2011. do 2014. godine, u Institutu za transfuziologiju i hemobiologiju VMA. TIP su izvedene pomoću separatora krvnih ćelija kontinuiranog toka, Cobe Spectra i Spectra Optia (Terumo BCT, USA), a prema standardima i preporukama vezanim za početak, broj i učestalost procedura (tri do pet nedeljno ili jednom mesečno), i količinu izdvojene plazme 30 do 50 mL/kg telesne mase bolesnika.

Rezultati: Analizirano je 385 ukupno urađenih procedura TIP i dobijeni su sledeći rezultati: najveći broj je primenjen kod neuroloških bolesnika, 194 procedure ili 50,3%, najčešća indikacija je bila mijastenija gravis (MG) sa 72,7%, neuromijelitis optika sa 18%, a ostale neurološke indikacije su bile zastupljene sa 9,3% u ispitivanoj grupi bolesnika. Ukupni volumen procesirane krvi prosečno je iznosio 4503 mL, a volumen odstranjene plazme po jednoj TIP prosečno 2232 mL.

Zaključak: Rezultati pokazuju da su TIP izvedene predominantno kod neuroloških bolesnika, da indikacije pripadaju kategoriji I i II, tj. poremećajima u kojim se kao primarna terapijska linija i preporučuje primena TIP. Prilikom izvedenih procedura TIP uz neurološku medikamentoznu podršku, kod svih bolesnika je uočeno poboljšanje opšteg stanja uz smanjenje ili povlačenje postojećih simptoma za odgovarajući period. Treba napomenuti da je terapijske efekte TIP teško razdvojiti i oceniti jer je lečenje uvek u kombinaciji sa medikamentoznom neurološkom terapijom, ali ona svakako ima značajnu ulogu.

Opšti pristup afereznom lečenju u imunoneurologiji

Terapijska izmena plazme (TIP) je aferezna procedura sa ekstrakorporalnom cirkulacijom čije izvođenje ima za cilj smanjenje koncentracije ili otklanjanje specifičnog patogena (autoantitela, imunski kompleksi, citokini) iz plazme, uz nadoknadu otklonjenog volumena nekom pogodnom tečnošću. Dugo godina se TIP koristila u velikom broju indikacija, u

nekima je ona standardna, tj. primarna terapijska linija, dok je za druge dodatna, suportivna terapija. U nekim patološkim stanjima tačna uloga afereze nije još uvek sa sigurnošću definisana, a postignuti efekti su individualni, te se primena TIP stalno razmatra kao terapijski modalitet (1–7).

Za ovaj tip procedure u upotrebi su termini terapijska plazmaferaza i izmena plazme. Radi upotrebe ujednačene terminologije, od Američke asocijacije krvnih banaka (AABB) predloženo

je da se za sve procedure čiji je cilj otklanjanje plazme (nezavisno od toga čime se nadoknađuje otklonjena plazma) koristi naziv terapijska izmena plazme (2, 5). Tako, TIP predstavlja skup afereznih postupaka vezanih za eksfuziju (tj. privremeno odstranjivanje) dela bolesnikove krvi, njeno razdvajanje na komponente, otklanjanje određenog volumena plazme – koji je u fiziko-hemijskom pogledu patološki izmenjen i/ili u kome se nalazi specifični "patogeni supstrat" – i reinfuziju preostalog (modifikovanog) dela krvi, uz upotrebu najpogodnije nadoknadne tečnosti (2). Posebnu grupu TIP čine aferezne procedure čiji je cilj selektivna redukcija (adsorpcija) nekog plazmatskog konstituenta, kao što su autoantitela, imunski kompleksi ili lipoproteini male gustine (2, 5–16).

U praktičnom radu, TIP se najčešće izvodi u što kraćem vremenu od postavljene dijagnoze, tri puta nedeljno, obično pet u tretmanu, a prilikom takozvanih održavajućih izmena plazme, jedan do dva puta mesečno. Volumen otklonjene plazme jednom procedurom TIP treba da iznosi jedan ili dva volumena bolesnikove plazme, tokom terapijske kure oko 3 – 5 volumena cirkulišuće plazme (2, 6, 12). Pri proceni terapijskog učinka TIP u bolesnika sa većinom autoimunskih poremećaja prisutne su određene teškoće zbog samo delimičnog poznavanja etiopatogeneze i istovremene primene medikamentozne terapije (2). Povoljni efekat TIP se zasniva na adekvatnoj dijagnozi, brzini primene, na volumenu otklonjene plazme jednom procedurom, ali i celom terapijskom kurom i istovremenoj medikamentoznoj (antiinflamatornoj i imunosupresivnoj) podršci. U urgentnim stanjima opravdano je izvoditi TIP svakodnevno (ili čak dva puta dnevno) do poboljšanja kliničke slike sa većim volumenom odstranjene plazme od 55 – 60 mL/kg telesne mase bolesnika (2).

Prilikom izvođenja TIP pored "patogenog supstrata", jednom konvencionalnom TIP, otklanja se oko 150 g plazmatskih proteina iz cirkulacije kod odraslih osoba, tj. oko 110 g albumina i oko 40 g globulina – uz još neke biološki aktivne plazmatske proteine, kao što su hormoni, medijatori i modulatori imunskog odgovora, citokini i drugi (2). Primenom relativno učestalih TIP, ukoliko je sinteza u jetri očuvana, činioci koagulacije će se u dovoljnoj meri nadoknaditi, ali u određenom broju slučajeva uz redovnu kontrolu činioca koagulacije, potrebno je vršiti i njihovu supstituciju, te se pri nadoknadi

uključuje zamrznuta sveža plazma. Tu posebno treba obratiti pažnju na deficit AT-III koji može biti kritičan već ispod 0,6 IU/mL plazme (2, 6–16) te se preporučuje i redovna kontrola kako albumina i proteina, tako i činioca koagulacije. Nadoknada otklonjene plazme se postiže rastvorima humanog albumina u kombinaciji sa kristaloidnim rastvorima (najčešće 5% i 20% rastvori), a ređe sa plazmom ili plazmom siromašnom u krioprecipitatu, odnosno nekim sintetskim koloidima (1–16). Količina primenjenog albumina zavisi od volumena otklonjene plazme, od vrednosti albumina pre tretmana i funkcionalne očuvanosti jetre bolesnika, i uvek je individualna.

Tokom prethodnih decenija bilo je evidentirano više od 150 poremećaja i bolesti u čijem su lečenju primenjivane TIP. Postignuti terapijski efekti nisu bili jednaki, što je dovelo do analize opravdanosti primene TIP. Cilj TIP je sa jedne strane otklanjanje "patogenog supstrata" iz cirkulacije bolesnika, dok se imunosupresivnim sredstvima želi postići inhibicija njihovog stvaranja ili modulacija imunskog odgovora (2), što bi rezultovalo boljim terapijskim odgovorom.

Zato se izvođenje TIP primenjuje kod imunski posredovanih poremećaja, nastalih zbog delovanja antitela, imunskih kompleksa, citokina i drugih medijatora. Od imunoneuroloških poremećaja, TIP su indikovane u prvom redu u tretmanu poliradikuloneuritisa ili Guillain-Barreovog sindroma, mijastenije gravis (MG), hronične inflamacijske demijelizacijske neuropatije, polimiozitisa. Najbolji terapijski učinak se konstatuje kod bolesnika sa akutnim poliradikuloneuritisom i mijastenijom gravis sa cirkulišućim antitelima protiv acetilholinskih receptora (postoje u 85 – 90% bolesnika). Mijastenija gravis je oboljenje koje karaktriše patološka zamorljivost i mišićna slabost, a posledica su nedepolarizovanog, kompetitivnog postsinaptičkog oštećenja neuromišićne transmisije, kao rezultat nemogućnosti ispoljavanja dejstva oslobođenog kvanta acetilholina (ACh). MG je prototip autoimune receptorske bolesti, jer je odgovorni antigen-nikotin-acetilholinski receptor (AChR), a titar cirkulišućih anti-n-AChR-antitela ne stoji u značajnoj korelaciji sa ozbiljnošću bolesti (2–11).

Prema nekim istraživanjima zaključeno je da elektrofiziološka ispitivanja neuromišićne transmisije u funkciji masivne izmene plazme nedvosmisleno ukazuju na pozitivan neposredan

efekat TIP, koji je najbolje uočljiv u drugom minutu posle zamaranja 4x15 s prilikom izvođenja protokola TIP, pri čemu je uobičajeno da se terapijske izmene plazme rade na drugi dan. Povoljan efekat lečenja kod ovih bolesnika se manifestuje povratkom oslabljenih refleksa, normalizovanjem motornih funkcija, iščezavanjem disfunkcije govora i gutanja – uz pozitivan nalaz određenih laboratorijskih testova (2). Pri proceni terapijskog učinka TIP prisutne su određene teškoće zbog: a) nepotpunog poznavanja etiopatogeneze većine imunoneuroloških poremećaja; b) nepostojanja odgovarajućih kontrolnih grupa; c) istovremene primene imunosupresivnih lekova i d) nedostatka jednostavnih laboratorijskih testova za kvantifikaciju "patogenog supstrata" u bolesnikovoj krvi i u otklonjenoj plazmi (2–11).

Stalno uvođenje novih i sve efikasnijih imunomodulacijskih i drugih medikamenata (kortikosteroida, imunoglobulina, specifičnih antitela), dovodi u pitanje izvođenje TIP kod neuroloških bolesnika i zahteva kritičku analizu postignutih efekta. Zato je osnovni cilj ovog rada analiza opravdanosti TIP i potencijalnog rizika kod pojedinih neuroloških indikacija/bolesnika. Naime, TIP predstavlja invazivnu proceduru, koja sa sobom može nositi povoljan terapijski efekat, ali i niz neželjenih reakcija. Njeno izvođenje zahteva određene preduslove (osoblje, aparatura, setovi, nadoknadne tečnosti, albumin), što sve govori u prilog cene koja nije mala i koja se

mora uvek imati u vidu prilikom odluke o njenoj primeni. Istovremeno su dostupni novi imunomodulacijski i imunosupresivni lekovi, koji takođe sa sobom nose visoke troškove, što se takođe mora uzeti u obzir.

Kratak osvrt na sopstvene rezultate

Izvršena je retrospektivna analiza indikacija i uspešnosti primene TIP za ukupno 385 TIP, kao i udeo TIP u lečenju neuroloških bolesnika u periodu od 2011. do 2014. godine, u Institutu za transfuziologiju i hemobiologiju VMA. TIP su izvedene pomoću separatora krvnih ćelija kontinuiranog toka, Cobe Spectra i Spectra Optia (Terumo BCT, USA), a prema standardima i preporukama vezanim za početak, broj i učestalost procedura i količinu izdvojene plazme. Analizirano je 194 procedure, njihova raspodela po polu, životnoj dobi, volumenu procesirane krvi, volumenu izdvojene plazme i procentualne zastupljenosti pojedinih indikacija.

Analizirano je 385 ukupno urađenih TIP procedura i dobijeni su sledeći rezultati: najveći broj je primenjen kod neuroloških bolesnika, 194 procedure ili 50,3%. Od 194 procedure, TIP su izvedene kod 57 (29,4 %) muškaraca i 137 (70,6 %) žena. Prosečna starost je 48 (raspon : 27–69) godina (tabela 1). Prosečan broj TPE procedura po tretmanu bio je 5 (raspon 1-7), uz jednu održavajuću mesečno.

Tabela 1.

Karakteristike TIP i bolesnici

parametri	procedure i bolesnici
procedura/tretmanu	1-7
uzrast/godine	48 (raspon : 27–69)
muškarci	57 (29,4 %)
žene	137 (70,6 %)

Najčešća neurološka indikacija je bila mijatzenija gravis (MG) sa 72,7%, neuromielitis optika sa 18%, a 9,3% pripada ostalim neurolo-

škim indikacijama (Guillain-Barre akutni diseminovani encefalomijelitis, akutna demijelinaciona poliradikuloneuropatija) (tabela 2).

Tabela 2.

Oboljenja tretirana primenom TIP

Mijatzenija gravis	Neuromielitis optika	Ostale bolesti	ukupno
141	35	18	194
72,7	18,0	9,3	%

Analiza učinjenih procedura je pokazala da je ukupni volumen procesirane krvi prosečno iz nosio 4503 mL, volumen odstranjene plazme po jednoj TIP prosečno 2232 mL (tabela 3).

Tabela 3.

Tehnički aspekti procedura TIP

parametri	volumeni (krv/plazma [mL])
ukupni volumen procesirane krvi	4503±420
volumen odstranjene plazme po jednoj TIP	2232±328

Kao nadoknadna tečnost je korišćen rastvor albumina i kristaloida kod svih bolesnika, dok je antikoagulacija vršena sa rastvorom ACD (formula B). TIP je izvedena preko perifernog venskog pristupa za ambulantne bolesnike, a u retkim slučajevima preko centralnog venskog katetera, većinom u hospitalizovanih bolesnika i bolesnika gde su rađene intenzivne izmene plazme. Većina komplikacija su bile vezane za venski pristup, najčešće pucanje vena i razvoj hematoma (14,4%), hipotenzija (7,2%), pre svega vezana za upotrebu albumina. Sporedni efekti i komplikacije mogu se prevenirati adekvatnom pripremom samog bolesnika, prilagođavanjem brzine protoka krvi u minuti i odnosa antikoagulansa i krvi, adekvatnom medikamentoznom premedikacijom, kao i brzo, adekvatnom reakcijom obučenog osoblja u zbrinjavanju bolesnika.

Rezultati pokazuju da su TIP izvedene predominantno (50%) kod neuroloških bolesnika, da indikacije pripadaju kategoriji I i II, tj. poremećajima u kojim se kao primarna terapijska linija i preporučuje primena TIP, pre svega MG. Prilikom izvedenih procedura TIP uz obaveznu neurološku medikamentoznu podršku, kod svih bolesnika je uočeno poboljšanje opšteg stanja uz smanjenje ili povlačenje postojećih simptoma za odgovarajući period. Napominjemo da je u većini neuroloških bolesti terapijski efekat TIP ograničenog vremenskog trajanja, te da primena tzv. održavajućih izmena plazme nalazi svoje opravdanje. Svakako da i ovde treba napomenuti da je terapijske efekte TIP teško razdvojiti i oceniti jer je lečenje uvek u kombinaciji sa medikamentoznom neurološkom terapijom, ali ona svakako ima značajnu ulogu. Neželjene reakcije su uglavnom bile blage, kratkotrajne i adekvatno zbrinute, te nisu dovodile do većih komplikacija i ugrožavale bolesnike, što sve ukupno navodi da će TIP još

Duži period vremena biti moćno terapijsko sredstvo u borbi sa neurološkim bolestima.

LITERATURA

1. Balint B, Radović M. Afereza: prošlost i savremena transfuziološka aplikacija. *Anest Reanim Transf* 1995; 24: 1–12.
2. Balint B, Bogdanović G, Dimitrijević G. Hemaferenze. In: Balint B, editor. *Transfuziologija*. Beograd: Zavod za udžbenike i nastavna sredstva; 2004. p. 455–77.
3. Balint B, Radović M, Jovičić A, Apostolski S, Milenković Lj, Taseski J. Izmene plazme u lečenju bolesnika sa imunoneurološkim poremećajima. *Vojnosanit Pregl* 1990; 47: 348–51.
4. Radović M, Balint B, Jovičić A. The use of therapeutic plasma exchange for treatment of acute polyradiculoneuropathy. *Transfus Sci* 1995; 16: 167–71.
5. Roback JD, Grossman BJ, Harris T, Hillyer CD. *Technical Manual*, 17th ed. AABB (American Association of Blood Banks); 2011.
6. Balint B, Radovic M, Malesevic M, Jovicic A, Stamatovic D, Ostojic G, et al. The rationale for therapeutic apheresis in the treatment of hematologic and immune-mediated neurologic disorders. *Blood Banking Transf Med* 2003; 1: 73–80.
7. van Der Meche FG, van Doorn PA. Guillain-Barre Syndrome. *Curr Treat Options Neurol* 2000; 2: 507–516.
8. Balint B, Jovičić A, Apostolski S, Magdić B, Taseski J. Plasma exchange in myasthenia gravis and multiple sclerosis. *Vojnosanit Pregl* 2000; 57 (5 Suppl): 11–5.
9. Schröder A, Linker RA, Gold R. Plasma-pheresis for neurological disorders. *Expert Rev Neurother* 2009; 9: 1331–9.
10. Lehmann HC, Hartung HP, Hetzel GR, Stüve O, Kieseier BC. Plasma exchange in

- neuroimmunological disorders: part 2. Treatment of neuromuscular disorders. *Arch Neurol* 2006; 63: 1066–71.
11. Gwathmey K¹, Balogun RA, Burns T. Neurologic indications for therapeutic plasma exchange: 2011 update. *J Clin Apher*. 2012; 27(3):138–45.
 12. Balint B, Jevtić M, Todorović M, Ostojić G, Trkuljić M, Ignjatović Lj, et al. Afereze – opšti principi i upotreba za selektivno otklanjanje plazmatskih konstituenata. *Anest Reanim Transfuziol* 2007; 35: 1–22.
 13. Williams ME, Balogun RA. Principles of separation: indications and therapeutic targets for plasma exchange. *Clin J Am Soc Nephrol* 2014; 9: 181–90.
 14. Balint B, Ostojić G. Principi i klinički aspekti afereznog lečenja. U: Balint B, Trkuljić M, Todorović M (eds). *Osnovni principi hemoterapije*. Beograd: Čigoja štampa; 2010. p. 209–56.
 15. Balint B, Todorovic M, Ostojic G, Vucetic D. Plasma removal/exchange efficacy: Spectra-Optia versus Cobe-Spectra – A comparative preclinical study. *J Clin Apher* 2013; 28: 126.
 16. Balint B, Todorovic-Balint M, Ostojic G, Vucetic D, Krstic M, Radovic M, et al. Immediate benefit from plasma exchange in the treatment of severe hypertriglyceridemia using Spectra-Optia Vs Cobe-Spectra. *Vox Sang* 2013; 105: 256.
 17. Sutton DMC, Nair RC, Rock G. Complications of plasma exchange. *Transfusion* 1989; 29: 124–7.
 18. Weinstein R. Hypocalcemic toxicity and atypical reactions in therapeutic plasma exchange. *J Clin Apher* 2001; 16: 210–1.
 19. Mokrzycki MH, Balogun RA. Therapeutic apheresis: a review of complications and recommendations for prevention and management. *J Clin Apher*. 2011; 26(5): 243–8.
 20. Kaya E, Keklik M, Sencan M, Yilmaz M, Keskin A, Kiki I, et al. Therapeutic plasma exchange in patients with neurological diseases: multicenter retrospective analysis. *Transfus Apher Sci*. 2013 Jun; 48(3): 349–52.



INAKTIVACIJA / REDUKCIJA PATOGENA U KRVI / HEMOPRODUKTIMA

Dragana Jovičić-Gojkov¹, Gordana Ostojić^{1,2}, Milena Todorović-Balint³, Dušan Vučetić^{1,2},
Nataša Rafajlovski¹, Bela Balint^{1,2,4}

¹Vojnomedicinska akademija, Beograd; ²Medicinski fakultet VMA, Univerzitet odbrane, Beograd;

³Klinika za hematologiju, Klinički Centar Srbije, Beograd;

⁴Institut za medicinska istraživanja, Univerzitet u Beogradu.

SAŽETAK

Bez obzira što sigurnost krvi od transfuzijom prenosivih virusa nikada nije bila veća, rizik i dalje postoji zbog „prozor“ perioda, patogena koji se tek pojavljuju, bakterijske kontaminacije-naročito preparata trombocita, potencijalnog prisustva protozoa koje se prenose komponentama krvi, kao i prisustva rezidualnih leukocita, koji se mogu naći i posle leukoredukcije. Zbog toga, implementacija tehnologije za redukciju patogena (PRT) omogućava proaktivan pristup sigurnosti krvi inaktivirajući patogene i leukocite.

Metode PRT se baziraju na dva osnovna pristupa: hemijska inaktivacija i foto inaktivacija, a ciljne strukture su ili ćelijska membrana ili nukleinske kiseline. Od hemijskih metoda u upotrebi su solvent/detergent tretman i nanofiltracija za inaktivaciju plazme i FRALE tehnologija za tretman preparata eritrocita (u fazi ispitivanja). Fotoinaktivacija se zasniva na primeni UVC zraka-Teraflex-UV sistem za trombocite; upotrebi riboflavina i UV svetlosti širokog spektra (Mirasol PRT) u koncentrovanim trombocitima i plazmi, a u toku su usavršavanja koja će omogućiti primenu i na jedinicama eritrocita; Amotosalena i dugotalasnih, UVA zraka (Intercept sistem) koji je prilagođen tretmanu trombocita i plazme (nije pogodan za eritrocite jer hemoglobin absorbuje UVA zrake, pa smanjuje njihovo dejstvo na nukleinske kiseline) i metilensko-plavog za plazmu.

Iako tokom PR tretmana dolazi do nekog stepena kvantitativnog/ kvalitativnog gubitka faktora koagulacije/trombocita, ovi parametri su i dalje u granicama zahteva kontrole kvaliteta, a procene odnosa rizik-benefit su pozitivne.

Ključne reči: redukcija patogena, metilensko plavo, riboflavin, amotosalen, svetlost

UVOD

Sigurnost krvi od transfuzijom prenosivih virusa nikada nije bila veća, s obzirom na poboljšane metode skrininga davalaca i palete testova koje uključuju detekciju antitela, antigena i genoma (1). Međutim, i dalje je postoji opasnost od patogena koji se tek pojavljuju, kao što je bio slučaj sa West Nile virusom, severe acute respiratory syndrom (SARS) virusom, Chikungunya i Dangu virusom (2,3). Takođe, mada tehnologije za testiranje postaju sve senzitivnije, uvek će postojati period tokom kojeg je nemoguće detektovati prisustvo patogena („prozor“ period) te će i procedure za testiranje ostati limitirane senzitivnošću testova. Osim toga, bakterijska kontaminacija, naročito preparata trombocita, i prisustvo protozoa koje se prenose komponentama krvi, još uvek predstavljaju značajan rizik, pogotovo u zemljama u razvoju.

Dalje, sigurnost krvi je ugrožena i prisustvom rezidualnih leukocita, koji se mogu naći i posle leukoredukcije. Zbog toga, implementacija tehnologije za redukciju patogena (PRT) omogućava proaktivan pristup sigurnosti krvi inaktivirajući patogene koji bi mogli biti prisutni u krvnom produktu i na taj način prevenirajući infekciju primaoca (4-6).

Redukcija patogena (PR) u produktima iz pulirane plazme je praktično eliminisala rizik od transfuzijom prenosive infekcije ne ugrožavajući značajno kvalitet produkta ali je redukcija patogena u komponentama krvi nešto veći izazov.

Specifične tehnologije za inaktivaciju virusa u proteinskim koncentratima dobijenim frakcionisanjem plazme koriste se rutinski još od 80. godina prošlog veka. Za razliku od njih, tehnologije za redukciju patogena u preparatima

eritrocita, trombocita i zamrznute sveže plazme (ZSP) za direktnu kliničku upotrebu su relativno skorašnje inovacije, i u mnogim slučajevima tek stižu u kliničku upotrebu. Rizik od transfuzijom prenete virusne infekcije, na koje se rutinski radi skrining donora je minimalan, ali je i dalje prisutna zabrinutost zbog pojave novih virusnih infekcija, bakterijske kontaminacije (naročito trombocita zbog njihovog skladištenja na sobnoj temperaturi) i, u nekim zemljama, protozoama izazvanih bolesti. Očekivanja od novijih PR tehnologija je da bi one mogle osigurati sigurnu krv bez obzira na nove pretnje koje se pojavljuju. Međutim, postoji i bojazan vezana za ove sisteme, a u pogledu stepena redukcije, toksičnosti, gubitka efikasnosti komponenata i poskupljenja hemoprodukta do koga će oni dovesti.

Naime, inaktivacija patogena ima nekoliko potencijlnih izazova: raznolikost infektivnih agensa zahteva od bilo koje tehnike ili tehnologije širok spektar aktivnosti koje bi bile efikasne protiv inkapsuliranih i neinkapsuliranih virusa, Gram-pozitivnih i Gram-negativnih bakterija (uključujući spore), parazita i leukocita. Kako ove tehnike imaju zajedničku osobinu da zahtevaju hemijsku reakciju na biološkom produktu, ne iznenađuje da sve tehnike trenutno u upotrebi pokazuju različite stepene ćelijskog i protenskog oštećenja kao i neki stepen toksičnosti. Iako je većina PRT usmerena na nukleinske kiseline patogena kako bi onemogućila njihovo funkcionisanje jer trombociti, plazma i eritrociti ne zahtevaju gensku DNK za svoju viabilnost, ipak može doći do sekundarnog oštećenja proteina i ćelijskih membrana i moguće degradacije kvaliteta krvnog produkta. Zbog toga, veoma je značajno naći ravnotežu između dovoljne redukcije patogena i prihvatljivog kvaliteta produkta.

Tehnologije redukcije patogena

Metode PR se baziraju na dva osnovna pristupa: hemijska inaktivacija i foto inaktivacija, a ciljne strukture su ili ćelijska membrana ili nukleinske kiseline (1,3).

A. Hemijska inaktivacija je primena solvent/detergent (SD) tretmana za redukciju patogena u ZSP, nanofiltracija i FRALE tehnologija za tretman prepatrata eritrocita koja je još u fazi ispitivanja.

1. Tehnologija "solvent/detergent". Ova

metoda se zasniva na oštećenju lipidnog omotača patogena pod dejstvom SD, koji će, takođe, lizirati i sve prisutne krvne ćelije. Zbog toga, ovaj metod ne deluje na patogene koji nemaju lipidni omotač i može se primenjivati samo na acelularne produkte kao što je ZSP i to samo na pul od 500-1000 ABO identičnih jedinica, tako da je primenjiva jedino u industrijskim razmerama. Pošto tretman uništava lipidni omotač eritrocita nije potrebno voditi računa o Rh(D) pripadnosti. Kod upotrebe Octapharma sistema, pul plazme se inkubira sa solventom (tri-n-butyl phosphate) i deterdžentom. Zatim se ovi reagensi otklanjaju pomoću uljne ekstrakcije i hromatografije, a plazma se potom filtruje i zamrzava. Izlaganje SD-u uništava lipidni omotač virusa humane imunodeficijencije (HIV) i hepatitis B i C virusa i transmisija ovih virusa nije prijavljena. Međutim, virusi bez lipidnog omotača (parvovirus B19, hepatitis A (HAV)), nisu specifično inaktivisani, ali je njihov titar značajno smanjen tokom ostatka procesa. Pored toga, pulovi plazme sa visokim genskim titrom ovih virusa se odbacuju, a pul mora sadržati određen nivo virusnih antitela, koja su, bar delimično protektivna. Transmisija parvovirusa B19 i HAV ovako tretiranom plazmom nisu do sada prijavljeni.

2. Nanofilteri. Sobziom na veličinu pora filtera, 15-40 nm, ova tehnologija je, takođe, primenjiva samo na plazmu i ispitivanja pokazuju da oporavak aktivnosti proteina plazme iznosi 90-95%, dok se von Willebrandov faktor, zbog velike molekularne težine, gubi upotrebom ovih filtera (7).

3. Postupak "FRALE". Reč je o tehnici koja koristi Frangible Anchor Linker Effector (FRALE) jedinjenje (S-303) bazirano na strukturi quinacrina, koji je sličan toksičnom agensu, gasu mustard, korišćenom u drugom svetskom ratu. S-303 je molekula sastavljena iz tri dela: sidrenog, vezujućeg i efektorskog. Molekulski mehanizam dejstva je sličan kao kod amotosalena, ali se aktivacija postiže promenom u pH. Ekstracelularna reakcija se svodi na minimum odavanjem molekula glutatona u sistem koji vezuje višak S-303. S-303 brzo ulazi u ćelije i

patogene, a molekule su tako dizajnirane da se pod fiziološkim uslovima raspadaju preko osetljive estarske veze i stvaraju S300 koji ima mnogo manji afinitet za nukleinske kiseline; iluminacija nije potrebna tokom ovog procesa. Početni produkt kome se dodaje S-303, dekstro-

za i glutation su leukoredukovani eritrociti u odgovarajućoj aditivnoj soluciji. Inkubacija se odvija na sobnoj temperaturi tokom 12-24 sata, a zatim narednih 8 sati u aparatu za otklanjanje rezidualnih jedinjenja koji eliminiše preko 90% S300. Ispitiivanja pokazuju da tretman sa S-303 ne dovodi do hemolize i ne utiče na ekstracelularni kalijum, glukozu, laktat, 2,3DPG ili ATP. Tretiranje eritrocita sa 150 μ S-303 i dvosatna inkubacija je udružena sa bakterijskom redukcijom u rasponu od 4,8-7,4 log₁₀. Podaci o uništavanju spora još nisu dostupni. Tokom kliničkih ispitivanja dva tretirana pacijenta su razvila antitela na eritrocite zbog čega je ispitivanje obustavljeno. Proizvođač je nastavio sa razvojem ovog sistema i uvodi promene koje će značajno smanjiti verovatnoću razvoja antitela na eritrocitne antigene.

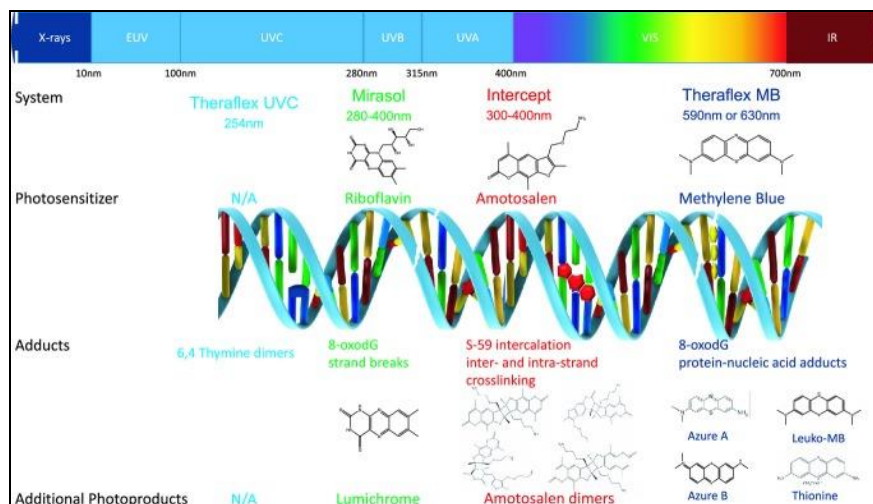
B. Fotoinaktivacija patogena se bazira na dodavanju heterocikličnih jedinjenja koja imaju specifičan afinitet za nukleinske kiseline (jednostruku i dvostruku RNA i DNA), preko interakcije sa baznim grupama nukleotida. Nakon aktivacije fotosenzitizatora, bilo UV ili vidljivom svetlošću, dolazi do jedne od dve poznate reakcije:

1. U odsustvu kiseonika odvija se reakcija Tip 1 (redox): direktan transfer elektrona između fotosenzitizatora i mete (u ovom slučaju, DNK)

koja, obično, rezultuje stvaranjem jonskih radikala koji će dalje propagirati hemijske reakcije konačno dovodeći do redukcije patogenog opterećenja (npr. Amotosalen).

2. U prisustvu kiseonika odvija se reakcija Tip 2 (foto-oksidativna) kada nastaje sekundarna aktivacija tokom koje se oslobađaju reaktivni kiseonični radikali ili reaktivni kiseonik u foto-dinamičkoj reakciji (npr. Methylene blue). Kao posledica vezivanja unutar ili između traka nukleinskih kiselina, dolazi do inhibicije replikacije patogena.

Kako su eritrociti i trombociti ćelije bez jedra, a zamrznuta sveža plazma je bez ćelija, njima nije potrebna replikacija nukleinskih kiselina za funkcionisanje. Treba reći da se ovaj pristup zasniva na relativno visokom afinitetu dodatih jedinjenja za nukleinske kiseline u poređenju sa drugim komponentama krvnog produkta. Kolateralne reakcije mogu dovesti do neželjenih efekata na membranama krvnih ćelija i koagulacionim faktorima ako se jedinjenja vežu za njih. Još jedna karakteristika većine PR sistema je da su ona osmišljena tako da se mogu primeniti na pojedinačne krvne komponente, a vrsta fotosenzitizirajućeg molekula diktira talasnu dužinu svetlosne energije potrebne za pokretanje reakcije (1,4).



Slika 1. Ilustrovani rezime fotohemijskih mehanizama za Theraflex UVC, Mirasol, Intercept and Theraflex methylene blue (MB) tehnologije za redukciju patogena.

1. Sistem UVC. Teraflex-UV sistem za trombocite je jedini sistem fotoinaktivacije koji ne uključuje dodavanje fotosenzitizirajućih komponenti. Koristi UVC (254 nm) kao izvor za inaktivaciju patogena, a kako je ovo kratka tala-

na dužina, najefikasnija je u relativno transparentnim sredinama i može se koristiti samo za inaktivaciju trombocita dobijenih aferezom ili iz buffy coat-a u Platelet Additive Solution, SSP+ po preporuci proizvođača. UVC deluje direktno

na nukleinske kiseline stvarajući „timinske dimere“, tj. cyclobutan-pyrimidin i pyrimidin-pyrimidin dimere koji konačno, sprečavaju DNK polimerazu da nastavi transkripciju. Kako nema dodavanja fotosenzitivnih agenasa, nije potrebno filtriranje nakon tretiranja Teraflex-UV sistemom. Ovaj sistem je trenutno u procesu kliničke evaluacije i nije u rutinskoj upotrebi (4).

2. Upotreba riboflavina. Mirasol PRT sistem koristi vitamin riboflavin (B_2) u njegovoj nativnoj formi. Ovaj sistem se trenutno koristi za redukciju patogena u koncentrovanim trombocitima i plazmi, a u toku su usavršavanja koja će omogućiti primenu i na jedinicama eritrocita. Riboflavin u prisustvu svetlosti deluje kao fotosenzibilizator stvarajući oštećenje DNK preko reaktivnih produkata kiseonika. Osveljeni riboflavin može stvarati i nova jedinjenja sa timinom i adeninom. Oba procesa interferiraju sa DNA i RNA replikacijom. U trenutno važećem Mirasol protokolu riboflavin se dodaje trombocitima, tj. plazmi; vrši se iluminacija produkta svetlošću širokog spektra (UVA, UVB; 280-400nm, 6,2J/ml) u toku 10 minuta i produkt je odmah spreman za transfuziju. Nije potrebno da se riboflavin ili foto-nusprodukti otklanjaju, jer nisu toksični. Riboflavin i tretman svetlošću mogu da oštete ćelijsku membranu i proteine, a tokom ovog procesa javlja se hemoliza kod eritrocita. Studije o funkciji i kvalitetu trombocita i plazme tretiranih riboflavinom i svetlošću su u prihvatljivim granicama, s tim što je povećana glikoliza u odnosu na kontrolnu grupu praćena sniženjem pH. Takođe, ekspresija CD62P je 33-100% veća kod tretiranih trombocita, ukazujući da proces dovodi do aktivacije trombocita. U eksperimentima sa inokulacijom bakterija logaritama redukcije se kreće od 3,1 do 5,5. Niža redukcija je postignuta kod *Bacillus cereus*, verovatno zato što ni ovaj sistem ne može da inaktivira spore. Trenutno, Mirasol PRT sistem je jedina PR tehnologija koja inaktivira neinkapsulirane viruse, kao što je HAV, koji su veoma rezistentni na hemijska i toplotna dejstva (5). Sistem je u eksperimentalnoj fazi u cilju primene na celu krv. Koristi istu tehnologiju (UV svetlost 280-400 nm plus riboflavin) ali se cela krv iluminira sa 80 J/mL eritrocita, a doza zavisi i od volumena i hematokrita produkta. Razvijanjem tehnologije za inaktivaciju cele krvi i njeno sledstveno procesiranje bi teoretski omogućilo

da se jednim tretmanom inaktivacije dobiju tri PRT tretirana produkta spremna za kliničku upotrebu (4).

3. Primena amotosalena. Intercept sistem koristi kao fotosenzitizator amotosalen hidrohlorid, jedinjenje bazirano na psoralenu. Amotosalen-HCl se umeće između nukleinskih kiselina sa svoja dva reaktivna mesta. U prisustvu dugotalasnih ultravioletnih zraka (UVA, 300-400nm), reverzibilno umetnut amotosalen-HCl reaguje sa pirimidinskim bazama i formira stalne, kovalentne veze, unakrsno vezujući trake nukleinskih kiselina, čime onemogućava transkripciju i blokira replikaciju. Ovo znači da je širok spektar virusa, bakterija i leukocita osetljiv na ovaj PR metod, ali prioni, pošto nemaju nukleinske kiseline, nisu. Na kraju procesa, rezidualni amotosalen-HCl i fotodegradacioni produkti se otklanjaju pomoću uređaja za adsorpciju čestica. Za sada mora da se koriste aditivna solucija za trombocite (Intersol) i plazma u odnosu 65:35%. Iluminacija koncentrovanih trombocita se odvija sa 3 J/cm² u toku 3-6 minuta i zatim se otklanja rezidualni amotosalen u toku minimum 4-6 sati, zavisno od vrste produkta. Još uvek postoji bojazan vezana za moguće dugoročne neželjene genotoksične i mutagene efekte transfuzije psoralena i njegovih derivata, ali kliničke studije do sada nisu pokazale ni jedan takav efekat. In vitro studije su pokazale da tretiranje amotosalenom nema značajan uticaj na sledeće promenljive u koncentrovanim trombocitima tokom skladištenja 5-7 dana: broj trombocita, pH, bikarbonati, morfološki skor, potrošnja glukoze, agregacija trombocita na ADP i kolagen, promena oblika, odgovor na hipotonički šok i ATP. Međutim, neke studije pokazuju da je gubitak trombocita veći u ovoj grupi (8-11%) nego u kontrolnoj (0-5%), a prisutan je i veći stepen lize tretiranih trombocita (15% prema 5%). Uz ove gubitke trombocita koji nisu bili očekivani postoji i njihov gubitak od 7-15% tokom dodatnih koraka u procesu. Međutim, ispitivanja na dobrovoljcima su pokazala da je oporavak i preživljavanje ¹¹¹In obeleženih tretiranih trombocita vrlo malo smanjeno u odnosu na kontrolnu grupu. U eksperimentima gde su patogeni inokulisani u hemoprodukt, postignuta je bakterijska redukcija od >5,6 do >7,0 log₁₀. Dosadašnja ispitivanja pokazuju da spore ne mogu biti inaktivisane osim ako nisu počele da prelaze u vegetativnu formu. Sistem je prilagođen tretmanu

trombocita i plazme, ali nije pogodan za eritrocite zato što hemoglobin absorbira UVA zrake, pa smanjuje njihovo dejstvo na nukleinske kiseline.

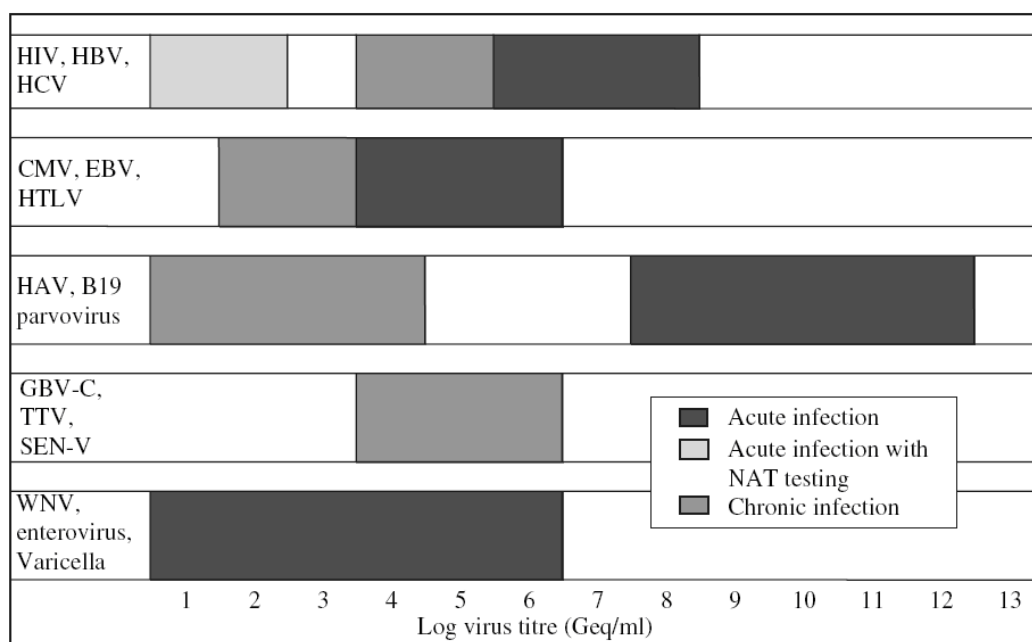
4. Korišćenje metilensko-plavog (MB). Dva sistema koriste metilensko plavo za redukciju patogena u plazmi za transfuziju: THERAFLEX MB-Plasma i Springe method. MB je fenotijazinska boja koja se umeće u nukleinsku kiselinu virusa. Kada se iluminira vidljivom svetlošću, dovodi do njene destrukcije preko reaktivnog kiseonika. Inaktivira parazite i širok spektar DNK i RNK virusa ali, kako razara ćelijsku membranu, njegova primena je ograničena na plazmu. Protokol THERAFLEX MB-Plasma podrazumeva filtriranje plazme kroz 0,65 µm filter u cilju otklanjanja leukocita, eritrocita, trombocita i mikropartikula. Zatim se filtrirana plazma prebacuje u kesu sa pilulom MB (85mg; finalna koncentracija 1 µM za volumen plazme od 235 do 315 ml). Sledi iluminacija vidljivom svetlošću (590nm, 20 min. u dozi od 180 J/cm²). Poslednji korak je otklanjanje

fotoprodukata specijalnim filterima do nivoa od 2 µg/L, tj. 0,5 µg/jedinici plazme (3,5,7).

Obim/stepen redukcije patogena

Redukcija patogena je atraktivan i pragmatičan pristup daljem smanjenju rizika od hematogeno transmisivnih bolesti uz održavanje adekvatnog snabdevanja komponentama krvi. Potencijal PR se ogleda u eliminaciji rezidualnog rizika od prenosa infekcije tokom „prozor perioda“ za patogene na koje se radi screening donora; redukcija rizika od prenosa poznatih infektivnih agenasa na koje se ne radi screening donora; proaktivna zaštita od rizika infekcije agensima koje se tek pojavljuju u populaciji; globalna protekcija od bolesti kalem-protiv-domaćina.

Da bi se pokazalo da određena tehnologija može da postigne klinički efektivnu PR neophodno je demonstrirati da je tehnologija sposobna da otkloni nivo odgovarajućeg patogena (ili adekvatnog eksperimentalnog modela za isti) koji je veći od onog koji bi mogao da se nađe u inficiranoj doniranoj jedinici.



Grafikon pokazuje izračunate titrove virusa (u logaritamskoj skali u kopijama po ml) za niz relevantnih virusa tokom akutne faze i tokom kasnije hronične faze kod zdravih prenosilaca, tamo gde se javljaju. Od kada je uvedena nuclear acid testing (NAT) metoda kao rutinski skrining test, donirane jedinice sa dovoljno visokim titrom se mogu odbaciti pre procesiranja. Kako

se vidi iz grafikona, titar virusa sa lipidnim opotačem se kreće između 100 000 i 100 000 000 (5 do 8 log₁₀) tokom akutne faze. Sposobnost PR tehnologije da se suoči sa takvim titrom mikroorganizama obično se izražava kao redukcioni faktor (RF): odnos ukupnog nivoa virusa (titar x volumen) pre i posle tret-

mana, izražen u logaritamskoj skali. Isti princip se može primeniti i na bakterijske infekcije. U vreme donacije retko se može desiti da jedinica sadrži bakterije, a i tada u količini manjoj od 100 bakterija po ml (50 000 po jedinici). Mada se one mogu brzo umnožavati tokom skladištenja, danas dostupne tehnologije omogućavaju inaktivaciju neposredno ili kratko vreme posle donacije (1).

Nedostatci tehnologija za redukciju patogena

Međutim, svaki PR sistem ima i neki nedostatak. Najčešće je to ograničen kapacitet za inaktivaciju bakterijskih spora, što ima poseban značaj za preparate trombocita sobzirom da se u njima spore mogu razviti u vegetativne forme i umnožiti do klinički relevantnog broja tokom skladištenja.

Druga važna stavka koja se odnosi na implementaciju PRT je njen uticaj na integritet krvnih komponenata i toksičnost hemikalija korišćenih u ovim sistemima. Idealno, aktivne substance u PRT moraju biti vrlo selektivne i toksične za širok spektar patogena ali, istovremeno, netoksične za krvne ćelije i proteine kao i za samog primaoca transfuzije. Inaktivacione tehnike koje koriste hemijske agense (MB, amotosalen, riboflavin) su prošle ekstenzivna preklinička toksikološka ispitivanja dok su fotohemijski agensi, koji se koriste kraće vreme, manje i ispitivani. Dosadašnja saznanja ukazuju da svi agensi trenutno u upotrebi, imaju dovoljne granice sigurnosti i ne ispoljavaju toksičnost, karcinogenost, mutagenost, genotoksičnost niti reproduktivnu toksičnost.

Još jedno polje od naročitog značaja je da li će PR tretirane komponente izazvati stvaranje novih struktura (neoantigena) specifičnih za korišćeno hemijsko jedinjenje. Ovo može da dovede do neželjenog imunskog odgovora u smeru stvaranja aloantitela koja bi dovela do rapidne destrukcije transfundovanog hemoprodukta. Potencijalna ozbiljnost imunskog odgovora na neoantigene je naglašena nedavnom obustavom kliničkog ispitivanja dva PR produkta za eritrocite: Inactine, tj. PEN110 i S-303.

Efekti PR tehnologija na faktore koagulacije i trombocite

In vitro studije su pokazale da sve PR tehnologije utiču na kvalitet proteina plazme i trombocita. Nivo faktora koagulacije: Za SDZSP proizvođač garantuje da će u svakom pulu biti $>0,50$ U/ml

– svih faktora koagulacije, međutim, za SD plazmu je karakteristično da se značajno razlikuje po nivou faktora koagulacije i njihovog aktivacionog statusa u zavisnosti od načina procesiranja. Plazma proizvedena u USA se razlikuje od one proizvedene u Evropi po tome što ima upola manje citrata, proteina S, α_2 -antiplazmina, α_1 -antitripsina i plazminogen aktivator inhibitora 1 (PAI-1).

Kod PR metoda primenjenih na pojedinačne jedinice, sadržaj proteina plazme mnogo više zavisi od početnog nivoa kod određenog davaoca. Kod MB metode najveći uticaj je uočen na faktor VIII i fibrinogen koji mogu biti smanjeni za 20-35%, pri čemu MB utiče na biološku aktivnost fibrinogena, a ne na koncentraciju. Ovako tretiranom fibrinogenu je smanjena sposobnost polimerizacije ali je očuvana sposobnost vezivanja za GPIIb/IIIa receptore na trombocitima. Generalno, gubitak faktora koagulacije je manji kod upotrebe amotosalena nego MB, naročito, fibrinogena. Kod upotrebe Mirasol sistema najveći je gubitak fibrinogena (33%), FXI (32%), FVIII (30%) i FV i FIX (po 18%).

– Aktivacija faktora koagulacije: Faktori FVII, FIX i FX nisu aktivirani kada se meri odnos aktivirani faktor:antigen, ali, kada se meri direktno, uočava se viši nivo aktiviranog faktora FVII u odnosu standardnu ZSP. Nivo trombin-antitrombin kompleksa ni kod jedne metode nije povišen ukazujući na to da aktivacija bilo kojeg faktora koagulacije tokom procesa ne dovodi do povećanog stvaranja trombina.

– Inhibitori koagulacije i fibrinolizni sistem: Funkcionalna merenja prirodno prisutnih antikoagulanata, proteina S i C i antitrombina, pokazuju relativno nepromenjen nivo; takođe, nije uočen značajan efekat na nivo plazminogena, plazminogen aktivator inhibitora 1 (PAI-1, glavni inhibitor plazminogen aktivatora), α_2 -antiplazmina (glavni inhibitor plazmina), fibrin monomera i D-dimera, sugerišući da tretmani ne dovode do povećanja nivoa fibrinolize, osim kod SD plazme gde je uočeno značajno smanjenje aktivnosti proteina S, C i antitrombina, a $>90\%$ α_2 -antiplazmina je bilo u latentnoj ili polimerizovanoj formi koja gubi aktivnost. Zbog ovoga u Americi postoji bojazan da primena SDZSP može biti udružana ili sa povećanim rizikom tromboze ili povećanim rizikom hiperfibrinolize, u zavisnosti od kliničke situaci-

je, i produkt je za ove namene povučen sa američkog tržišta. Ovakav problem nije zapažen kod SDZSP proizvedenoj po evropskim metodama, mada je nedavno prijavljen slučaj duboke venske tromboze kod pacijenta lečenog SDZSP u Velikoj Britaniji – Ispitivani su von Willebrand faktor multimeri (vWF) i nivo vWF cepajuće proteaze (ADAMTS 13). Upotreba kriosupernatanta koji su siromašni u MW multimerima bilo ne tretirane ili PR tretirane plazme se pokazala jednako uspešna. Takođe, sobzirom na nedavno utvrđeni značaj ADAMTS 13, koji je smanjen kod bolesnika sa TTP, za izmenu plazme kod ovih bolesnika uspešna je bila primena MBZSP i amotosalenom tretirana plazma, kao i supernatant dobijen od istih, ali je ispitivanih studija premalo za donošenje konačnog zaključka.

– Ispitivanja preparata trombocita su pokazala povišenu metaboličku aktivnost i umerenu aktivaciju trombocita posle PRT tretmana. 20-30% smanjeni oporavak i preživljavanje PRT-tretiranih trombocita posle reinfuzije zdravoj osobi sugerise uticaj na vijabilnost trombocita mada su rezultati iznad dozvoljenog limita (1,3,7).

Naša iskustva

U našoj zemlji od tehnologija za inaktivaciju patogena zastupljen je Mirasol PRT sistem. Jedan takav aparat imamo i mi, u Institutu za transfuziologiju i hemobiologiju VMA, i relativno dobra iskustva sa njim. To potvrđuje nekoliko radova:

U oceni efikasnosti inaktivacije bakterija pomoću Mirasol PRT sistema u koncentrovanim trombocitima primenom modela bakterijske kontaminacije, ispitivana je inaktivacija koncentrovanih trombocita (KT) kontaminiranih bakterijama *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus aureus* i *Escherichia coli* sa šest različitih koncentracija. Sve jedinice kontaminirane bakterijom *Staphylococcus epidermidis* u koncentraciji 10^4 CFU/pul 4 KT posle tretmana Mirasol PRT sistemom ostale su sterilne tokom perioda skladištenja (5 dana), dok je pri kontaminaciji od 10^5 CFU/pul 4 KT posle inaktivacije samo jedna jedinica ostala sterilna do kraja roka skladištenja. Inaktivacija *Staphylococcus aureus*-a je bila postignuta u svim uzorcima kontaminiranim sa 10^3 CFU/pul 4 KT dok je pri

kontaminaciji od 10^4 CFU/pul 4 KT inaktivacija bila samo delimično uspešna. Najviši stepen redukcije patogena postignut je u uzorcima kontaminiranim *Escherichia coli*. Svi uzorci kontaminirani sa $\leq 10^5$ CFU/pul 4 KT ostali su sterilni do kraja roka skladištenja. Dakle, kompletna inaktivacija ispitivanih patogena je postignuta pri koncentraciji od 10^2 i 10^3 CFU/pul 4 KT što odgovara stepenu redukcije od 2 i 3 Log, odnosno 3-5 Log za sve tri bakterijske vrste sumarno (8). U radu koji ispituje integritet konstituenta plazme nakon tretmana riboflavinom i UV zracima primenjenom pre i posle skladištenja u zamrznutom stanju, pokazano je da nema signifikantne promene niti razlike u nivou proteina (ukupni proteini, albumini) ni ispitivanih imunoglobulina između kontrolne (inaktivacija pre zamrzavanja) i eksperimentalne grupe (inaktivacija nakon zamrzavanja, skladištenja i odmrzavanja prema potrebama bolesnika u pogledu krvne grupe). Aktivnost CH50 je bila smanjena u obe grupe. Koncentracija C3 komponente komplementa kod inaktivacije nakon odmrzavanja bila je statistički značajno viša ($p < 0,05$). Takođe, nije bilo statistički značajne razlike u hemostatskoj aktivnosti plazme između dve grupe, a u obe grupe se zapaža pad prokoagulantne aktivnosti. Suprotno tome, vrednosti AT-III u eksperimentalnoj grupi su bile značajno više ($p < 0,05$) (9). U studiji u kojoj je na osnovu procene INR kvantifikacije utvrđivana klinička efikasnost riboflavinom i UV zračenjem tretirane zamrznute sveže plazme, koja je rađena na po 30 hospitalizovanih bolesnika u eksperimentalnoj i kontrolnoj grupi, utvrđeno je da postoji signifikantno povećanje broja transfundovanih jedinica ZSP u eksperimentalnoj grupi ($p < 0,05$). Najčešća indikacija za transfuziju ZSP bilo je krvarenje sa visokim vrednostima INR-a i koagulopatijama sa deficijencijom faktora protrombinskog kompleksa. Osim toga, postoji statistički značajna razlika ($p < 0,01$) između grupa u poboljšanju INR-a nakon svake transfuzije dve jedinice ZSP pri čemu je srednja vrednost poboljšanja pretransfuzionog vs. postransfuzionog INR posle svake transfuzije dve Mirasol-inaktivisane ZSP iznosila 0,66, a nakon transfuzije netretirane ZSP 0,83. Međutim, ova razlika je prisutna samo u početnoj fazi korekcije INR. Konačno, u ovoj studiji nije bilo ozbiljnih postransfuzijskih neželjenih događaja kod bolesnika koji su pri-

mili Mirasol-inaktivisanu ili neinaktivisanu ZSP, osim dve blage kožne alergijske reakcije u kontrolnoj grupi (10).

U zaključku, možemo reći da još uvek stoje pitanja u vezi sa obimom inaktivacije poznatih (i nepoznatih) patogena, uključujući neinkapsulirane viruse, bakterijske spore i prione, od strane PR tehnologija trenutno u upotrebi. Takođe, benefit postignut primenom PR tretiranih hemoprodukata ne sme biti umanjen pojavom neočekivanih neželjenih događaja. Konačno, PRT mora sačuvati terapijsku efikasnost tretiranih produkata od krvi.

S druge strane, interes za uvođenje PR ZSP i KT u rutinsku upotrebu je sve veći, verovatno, zbog pozitivne procene odnosa rizik-benefit što potvrđuju i rezultati kanadskog modela rizika koji pokazuju da bi upotreba PR ZSP i KT smanjila očekivani broj transfuzijom prenetih infekcija za 40% na šta upućuje i studija Kleiman-a (Kleiman et al, 2012). Trenutno, izgleda da potencijalni benefit prevazilazi bojazan vezano za obilno krvarenje ili moguću toksičnost kao posledicu upotrebe PRT (3).

LITERATURA

1. Trkuljić M, Borovčanin N, Vučetić D, Jovičić D. Transmisivne bolesti-etiotopogeneza, testiranje na markere, inaktivacija patogena. In: Balint B, Trkuljić M, Todorović M. Osnovni principi hemoterapije. Beograd: Čigoja štampa; 2010. p.475-505.
2. Solheim BG. Pathogen reduction of blood components. *Transfus Apher Sci* 2008;39(1):75-82.
3. Seltsman A, Muller T.H. Update on the use of pathogen-reduced human plasma and platelet concentrates. *British Journal of Haematology* 2013;162, 442-454.
4. Mundt J. M, Rouse L, Van den Bossche J and Goodrich P. Chemical and Biological Mechanisms of Pathogen Reduction Technologies. *Photochemistry and Photobiology* 2014; 90: 957-964.
5. Picker S.M. Pathogen Reduction Technologies: The Best Solution for Safer Blood? *J Blood Disorders Transf* 2012, 3:5, 1-5.
6. P.Schlenke Pathogen Inactivation Technologies for Cellular Blood Components: an Update *Transfus Med Hemother* 2014 ;41:309-325.
7. Solheim B.G. Pathogen reduction of blood components. *Transfusion and Apheresis Science* 2008; 39:75-82.
8. Jocić M, Trkuljić M, Jovičić D, Borovčanin N, Todorović M, Balint B. Mirasol PRT System inactivation efficacy evaluated in platelet concentrates by bacteria-contamination model. *Vojno-sanit Pregl* 2011; 68(12):1041-1046.
9. Balint B, Jovicic-Gojkovic D, Todorovic-Balint M, Subota V, Pavlovic M, Goodrich R. Plasma constituent integrity in pre-storage vs. post-storage riboflavin and UV-light treatment – A comparative study. *Transfusion and Apheresis Science* 2013; 49: 434-439.
10. Stanojkovic Z, Balint B, Antic A, Todorovic M, Ostojic G, Pavlovic M. Clinical efficacy of riboflavin and ultraviolet light inactivated fresh frozen plasma evaluated with INR-quantification. *Transfusion and Apheresis Science* 2012; 47:33-37.

PRIMENA D-DIMERA U DIJAGNOZI VENSKOG TROMBOEMBOLIZMA U TRUDNOĆI**Mirjana Kovač^{1,2}**¹Institut za transfuziju krvi Srbije, Beograd; ²Medicinski fakultet, Univerzitet u Beogradu**SAŽETAK**

D-dimer je pokazatelj nivoa hemostatske aktivacije ali i aktivnosti fibrinolitičkog sistema. Nastaje dejstvom plazmina na fibrin na koji je prethodno delovao FXIII u cilju stabilizacije stvorenog fibrinskog ugruška. Glavni razlog za određivanje vrednosti D-dimera su klinički suspektne venske tromboze i DIK. D-dimer se pokazao kao veoma koristan test u isključivanju duboke venske tromboze i pulmonalnog embolizma sa visokom negativnom prediktivnom vrednošću (NPV). Takođe važnu ulogu ima u predikciji venskog tromboembolizma nakon isključenja antikoagulantne terapije. Primena D-dimera u dijagnozi venskog tromboembolizma u trudnoći ima svoja ograničenja, imajući u vidu smanjenje specifičnosti ovog testa u trudnoći. Naime u toku trudnoće dolazi do niza fizioloških promena u hemostaznom sistemu koje uslovljavaju nastanak hiperkoagulabilnog stanja. Te promene uključuju porast koncentracije faktora koagulacije, pojačanu aktivaciju trombocita, sniženje pojedinih prirodnih inhibitora koagulacionog sistema. Takođe dolazi do porasta koncentracije D-dimera, tako da se granične vrednosti D-dimera van trudnoće ne mogu koristiti u praćenju trudnica sa sumnjom na VTE. Naše istraživanje je pokazalo da, primenom prethodno utvrđenih referentnih raspona D-dimera, za pojedini gestacijski period (trimestar), možemo sa velikom verovatnoćom ukazati na rizik od postojanja trombotičkog procesa, što zajedno sa nalazom doplera omogućava pravovremeno postavljanje dijagnoze i otpočinjanje lečenja ove ozbiljne komplikacije u trudnoći, koja može da ugrozi kako život majke tako i fetusa. Važno je naglasiti, da se D-dimer kad je u pitanju venski tromboembolizam (VTE), koristi kao test za isključenje tromboze i da se ne treba tumačiti odvojeno, nego uvek u saglasnosti sa kliničkom slikom. Na osnovu odnosa D-dimer rezultata i/ili kliničke procene, donosi se odluka o nastavku dijagnostičkih pretraga, a od dobijenih rezultata zavisi dalji terapijski tretman.

Ključne reči: trudnoća, venski tromboembolizam, D-dimer**Venski tromboembolizam u trudnoći**

Venski tromboembolizam (VTE) sa incidencom u toku trudnoće/puerperijuma od 0.76 - 1.72 na 1000 trudnoća je relativno česta i ozbiljna komplikacija u trudnoći ili puerperijumu, a plućni embolizam je jedan od najvažnijih uzroka mortaliteta majke (1). U toku trudnoće se duboka venska tromboza (DVT) u 90% slučajeva javlja kao levostrana, što se objašnjava kompresijom na levu iliačnu venu, a više od 70% tromboza zahvata ileofemoralni region, za razliku od DVT koje se javljaju van trudnoće kad je najčešća lokalizacija potkolenica i podjednako su zastupljene obe strane. Meta-analize su pokazale da se u 2/3 slučajeva DVT dešava u antepartalnom periodu i da su jednako zastupljene u sva tri trimestra. Suprotno tome 43-60% epizoda plućnih embolija se dešava u postpartalnom periodu (1,2).

Različite fiziološke i patofiziološke promene dovode do porasta rizika za venski tromboembolizam u trudnoći, a odnose se na hiperkoagulabilnost, vensku stazu ili oštećenje krvnih sudova. Usporen protok krvi kroz venski sistem, se registruje već na kraju prvog trimestra, što se održava sve do kraja trudnoće i 6 nedelja postpartalno (2).

Promene na nivou hemostaznog sistema u trudnoći

Porast faktora koagulacije - u toku trudnoće dolazi do progresivnog porasta hiperkoagulabilnosti koju karakteriše porast nivoa faktora koagulacije naročito: fibrinogena, faktora VIII i von Willebrandovog faktora. Naše istraživanje je pokazalo da se u toku trudnoće beleži porast

koncentracije fibrinogena i faktora VIII, čije vrednosti su u toku trećeg trimestra udvostručene, što je praćeno značajnim skraćanjem protrombinskog vremena (PT) i aktiviranog parcijalnog tromboplastinskog vremena (APTT) (3).

Stečena rezistencija na aktivirani protein C - odnosi na APC senzitivnost, koja je smanjena u toku cele trudnoće i čak 45% trudnica ima nižu vrednost APC-R u odnosu na normalane vrednosti kod žena, iste starosne dobi, van trudnoće. Niži količnik za klasični APC-R koji se registruje u toku trudnoće je fenomen nazvan „stečena APC rezistencija“ i nije uslovljen prisustvom mutacije faktora V Leiden, ali ima uticaj na nastanak komplikacija trudnoće (4, 5).

Promene na nivou inhibitora koagulacionog sistema – odnose se na sniženje nivoa proteina S koji najnižu vrednost dostiže u odmakloj trudnoći. Prema istaživanju Gilberta i saradnika sniženje ukupnog i slobodnog proteina S se registruje već u toku drugog trimestra, a Bremmeova istraživanja pokazuju da nivo slobodnog proteina S opada već od 12.-15. nedelje, sa značajnim sniženjem u 24. i značajno nižim nivoom u 35. gestacijskoj nedelji. Sniženje proteina S u toku trudnoće kod žena koje su heterozigoti za urođeni nedostatak proteina S mogu imati uticaj na nastanak trombotičkih komplikacija (6, 7).

Promene na nivou fibrinolitičkog sistema – odnose se na porast nivoa inhibitora aktivatora plazminogena (PAI-1 i PAI-2) i smanjenje nivoa tkivnog aktivatora plazminogena (t-PA), što dovodi do smanjene fibrinolitičke aktivnosti. Plazma fibrinolitička aktivnost je smanjena u toku trudnoće i porođaja i vraća se u normalno stanje u toku jednog sata posle porođaja placente (6).

Porast markera aktivirane hemostaze - hiperkoagulabilnost u trudnoći se može definisati kao stanje prokoagulantne neravnoteže, uzrokovane porastom koagulacijskih enzima u odsustvu laboratorijskih i kliničkih znakova tromboze. To stanje hiperkoagulabilnosti se može detektovati merenjem markera hemostazne aktivacije. Efekat je porast trombotičkog potencijala, koji označava celu trudnoću i kratko postpartalni period. Naime dolazi do porasta solubilnog fibrina u plazmi, trombin antitrombin kompleksa (TAT), protrombin fragmenta 1+2 (F1+2) i D-dimera, što ukazuje na pojačanu aktivnost trombina u trudnoći (8, 9).

Prokoagulantne partikule - prisustvo mikropartikula poreklom iz majčinih ćelija

endotela i trombocita kao i od ćelija placentalnog trofoblasta, može da doprinese hiperkoagulabilnom stanju u toku trudnoće. U osnovi mikropartikule mogu nastati od bilo koje ćelije nakon njene aktivacije i apoptoze, a poseban doprinos trombofilnom stanju daju partikule koje nastaju iz trombocita i endotelinih ćelija (10). Mikropartikule mogu smanjiti antikoagulantna svojstva placente, što u sadejstvu sa fiziološkim promenama u trudnoći može dovesti do placentalne tromboze, i posledično do neželjenog ishoda trudnoće, odnosno gubitka ploda (11, 12).

Promene u hemostaznom sistemu nakon porođaja – identične su promenama koje su zabeležene nakon opsežne hirurške intervencije. Period neposredno posle porođaja karakteriše značajan porast hemostatske aktivacije na što ukazuje porast nivoa markera aktivirane hemostaze. Nivo AT značajno opada nakon carskog reza, dok promena nivoa AT posle vaginalnog porođaja nije zabeležena. Porast AT nakon carskog reza se očekuje u naredne dve nedelje od porođaja. Nivo proteina S (totalni i slobodni) raste od prvog dana posle porođaja, ali do normalizacije slobodnog PS dolazi tek posle 8 nedelja nakon porođaja. Nivo faktora koagulacije se potpuno normalizuje tri nedelje nakon porođaja (4, 6).

Faktori rizika za VTE u trudnoći

Sve promene na nivou hemostaznog sistema koje se dešavaju u trudnoći, predstavljaju deo fiziološkog odgovora na trudnoću i imaju ulogu da štite trudnicu od eventualnih krvarenja u toku porođaja, ali sa druge strane mogu biti presudan faktor za razvoj tromboze. Promene hemostaznog sistema mogu biti potencirane prisustvom drugih faktora rizika koji se dele u dve grupe, zajednički i dodatni faktori rizika (1,2).

Zajednički faktori rizika: starost iznad 35 godina, carski rez, gojaznost, trombofilija sa porodičnom ili ličnom anamnezom o prethodnim trombozama.

Dodatni faktori rizika: prisustvo venskih varikoziteta, imobilizacija, paraplegija, dehidracija usled hiperemesis gravidarum, infekcije, preeklampsija, placentalna abrupcija, nefrotski sindrom.

Trombofilija kao rizik za VTE u trudnoći

Urođena ili stečena trombofilija se registruje u

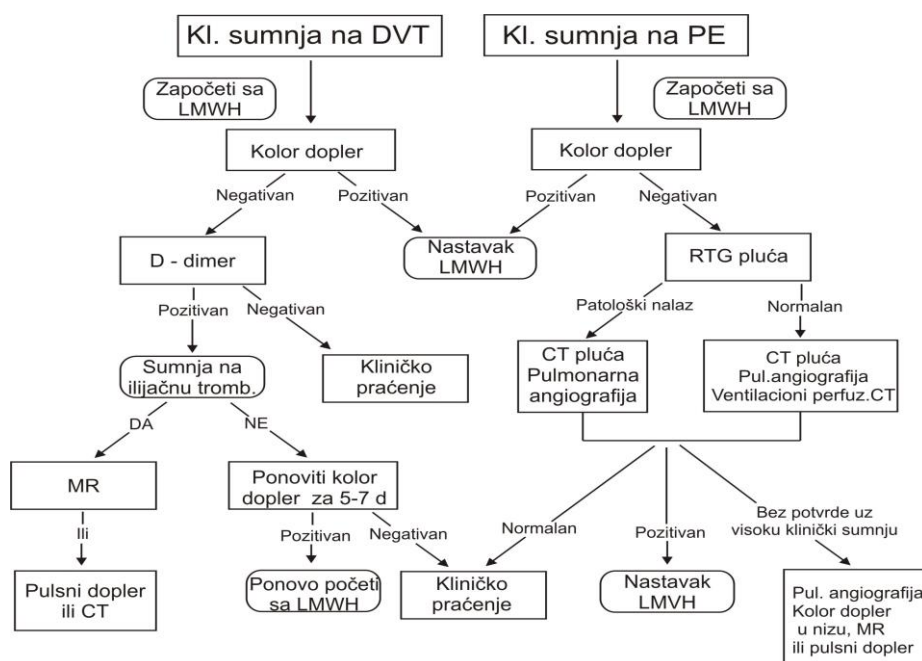
oko 50% žena sa VTE u toku trudnoće. Najčešće do razvoja tromboze u trudnoći dolazi zbog interakcije urođenih i stečenih faktora rizika, a naročito je njen nastanak povećan kod osoba sa kombinovanim trombofilijom ili kombinacijom trombofilije i ranijih tromboza ili gojaznosti u toku trudnoće.

Najčešće se FV Leiden identifikuje kao razlog za pojavu gestacijske tromboze kod 20-40% žena (13). Procena rizika od pojave gestacijske VTE bez primene profilaktičke terapije pokazuje da je kod deficita AT taj raspon najveći (32- 60%), kod FV Leiden do 46%, kod deficita PC (3-10%), kod PS do 6% i raste postpartalno (7-22%) (13,14). Ispitivanje učestalosti trombofilija u našoj populaciji, kod trudnica kod kojih se tromboza razvila u toku trudnoće ili posle porođaja pokazuje da je FV Leiden mutacija prisutna kod 22%, mutacija FII G20210A kod 9.6%, deficit inhibitora u 6%, kombinovane trombofilije u 9.6% a prisustvo APL antitela kod 1.2% (15). Za sada ne postoji opravdanje da se kod svih trudnica radi skrining na trombofiliju, ali je kod žena sa ranijim trombozama, te sa trombozama u porodici obavezan i predstavlja deo prevencije i menadžmenta gestacijskog VTE koji je važan deo savremene obstetričke prakse.

Dijagnoza gestacijskog VTE

Klinička sumnja na VTE u trudnoći je ključna za postavljanje dijagnoze. Mnogi od kliničkih znakova i simptoma DVT ili embolije kao što su otok i neugodnost u nogama, tahikardija, tahipneja ili dispneja mogu biti udružene sa normalnom trudnoćom i mogu imati uticaj da se previde znakovi klinički suspektne tromboze. Objektivna dijagnoza VTE u trudnoći je neobično važna, jer greška u postavljanju dijagnoze izlaže trudnicu životnom riziku, a sa druge strane ako tromboza nije prisutna, a postavi se dijagnoza, trudnica se izlaže nepotrebnom riziku primene antikoagulantne terapije u toku trudnoće, a nakon porođaja ima uticaj na nemogućnost korišćenja hormonske kontracepcije, kao i neophodnost primene profilaktičke terapije u narednoj trudnoći.

Pojava tromboze je praćena pojavom: bola i nelagode u nozi, otoka, te bolom u donjem delu abdomena udruženo sa umerenim porastom temperature i blagom leukocitozom. Klinički znaci koji ukazuju na pojavu plućne embolije (PE) su: dispneja, bol u prsima, hemoptizije, nesvestica, kolaps i porast pritiska u jugularnoj veni. PE se obično javlja u toku trećeg trimestra trudnoće ili postpartalno, često se razvija zbog tromboze pelvičnih vena dok vene nogu ostaju nezahvaćene (16).



Šema 1. Algoritam pretraga u dijagnozi VTE u trudnoći

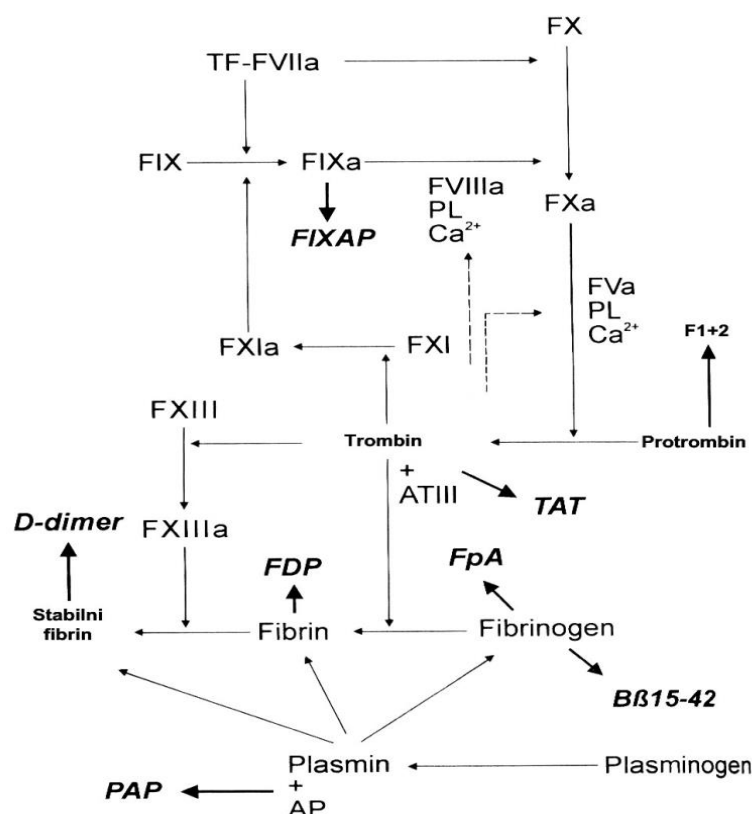
(Marik PE, Plante LA. Venous Thromboembolic Disease and Pregnancy. *N Engl J Med*2008;359:2025-33.)

Dopler ehosonografija je glavno dijagnostičko sredstvo kod sumnje na DVT. Negativan nalaz doplera sa niskim nivoom kliničke sumnje na DVT uslovljava prekid antikoagulantne terapije. Ukoliko je dopler nalaz negativan a klinička sumnja na DVT jasna, nalaz se ponavlja za nedelju dana uz nastavak terapije, čija dalja primena zavisi od ponovljenog doplera. Ukoliko je nalaz opet negativan isključuje se antikoagulantna terapija. Kod sumnje na PE radi se ventilacioni perfuzioni skener pluća i collor dopler obe noge (17). Dopler ehosonografija je manje tačna kod pojave izolovanih vena lista ili ilijačne venske tromboze. U tom slučaju je uloga D-dimera veoma važna jer pozitivan

D-dimer zahteva dodatne dijagnostičke procedure poput pulsnog doplera.

Uloga D-dimera u dijagnozi venskog tromboembolizma

D-dimer je pokazatelj nivoa hemostatske aktivacije ali i aktivnosti fibrinolitičkog sistema. D-dimer nastaje dejstvom plazmina na fibrin na koji je prethodno delovao FXIII u cilju stabilizacije stvorenog fibrinskog ugruška.



Šema 2. Stvaranje molekularnih markera hemostatske aktivnosti u toku intravaskularne koagulacije. (Francis JL. Thromboembolic states. In: Gross S, Roath S editors. Haematology, Baltimore: Williams&Wilkins, 1996:599-611.)

D-dimer se pokazao kao veoma koristan test u isključivanju duboke venske tromboze i pulmonarnog embolizma sa visokom negativnom prediktivnom vrednošću (NPV). Međutim prilikom tumačenja rezultata D-dimera treba imati na umu da postoji značajna interindividualna varijabilnost u koncentraciji

D-dimera u sklopu normalnog raspona. Naime kod odraslih osoba sa povećanim rizikom za kardiovaskularne bolesti postoji pozitivna korelacija povišenih vrednosti D-dimera sa određenim stanjima: starija životna dob, smanjena fiziološka funkcija, pušenje, hipertenzija, upalni procesi praćeni porastom:

fibrinogena, FVIII, C-reaktivnog proteina (CRP) i interleukina-6 (19,20). Pored ovog stečenog faktora postoje i genetske determinante koje utiču na povećanje koncentracije D-dimera kao što su singl nukleotidni polimorfizmi (SNPs) na nivou fibrinogena, urokinaze (u-PA) i inhibitora aktivatora plazminogena (PAI-1). Istraživanje Langea i sar. pokazuje da razlike postoje i u odnosu na etničku pripadnost pri čemu se kod Afro-Amerikanaca beleže više koncentracije a kod Kineza niže u odnosu na Evro-Američku belu populaciju (21).

S druge strane postoji interindividualna varijabilnost u koncentraciji D-dimera u sklopu patoloških stanja, gde nam je povišen rezultat D-dimera veoma važan pokazatelj prisutnih oboljenja. Poseban klinički značaj ima određivanje D-dimera koji služi kao pokazatelj već završenog trombotičkog procesa i reaktivne fibrinolitičke aktivnosti. Povišene vrednosti D-dimera su prisutne kod: venske tromboze,

plućne embolije, DIK-a, subarahnoidalnog krvarenja, maligniteta i oboljenja bubrega (HBI) (22, 23).

Kod kliničke primene svakog testa važna je njegova senzitivnost i specifičnost. Specifičnost D-dimera se smanjuje u određenim stanjima povišene hemostatske aktivacije: maligna oboljenja, infekcije i trudnoća. U tim situacijama, D-dimer ne može biti jedini test za dijagnozu ili isključenje venske tromboze pa su potrebne dodatne dijagnostičke pretrage. Danas postoji više vrsta komercijalnih testova koji se koriste za merenje D-dimera. U izboru testa neophodno da se za testiranje D-dimera koriste testovi sa najvišim nivoom senzitivnosti, uz obavezno korišćenje kontrola (K1, K2) i izvođenje analiza na odgovarajućem kalibrisanom koagulometru. Ne manje značajna je primena vlastitih referentnih vrednosti u tumačenju dobijenih rezultata, posebno za suspektne tromboze u trudnoći.

Tabela 1.

Odabir testova u odnosu na princip i senzitivnost testa

Princip testa	Senzitivnost testa
Enzyme –linked immunofluorescence assay	96%
Microplate enzyme linked immunosorbent assay (ELIZA)	94%
Quantitative latex immuno assay	93%
Quantitative immunoturbidimetric assay	93%
Blood D-dimer assay	83%
Latex semiquantitative assay	85%

D-dimer u normalnoj trudnoći

U toku normalne trudnoće dolazi do porasta koncentracije D-dimera koja se beleži već od drugog trimestra trudnoće, a najveći porast D-dimera se registruje pred kraj trudnoće (24,25). Određena patološka stanja koja komplikuju trudnoću, mogu biti povezana sa izraženim porastom koncentracije D-dimera, pri čemu se ovaj test koristi kao dodatna dijagnostička metoda u detekciji takvih stanja, kao što su preeklampsija i abrupcija placente (26,27). Zbog porasta D-dimera koji je odraz povišene hemostatske aktivacije u trudnoći i predstavlja jedan od zaštitnih mehanizama hemostaznog sistema u toku trudnoće, smanjuje se specifičnost D-dimera u toku trudnoće i ne može se referentna vrednost van trudnoće koristiti za poređenje rezultata dobijenih tokom

trudnoće (28). Zbog svih navedenih činjenica naše istraživanje, koje je uključilo populaciju zdravih trudnica, rezultiralo je formiranjem referentnih vrednosti D-dimera za pojedini trimestar trudnoće. Ujedno je za nove referentne vrednosti i „cut-off“ u odnosu na trimestar ispitana NPV, što je pokazalo da se novoutvrđene referentne vrednosti D-dimera mogu primenjivati u trudnoći kao dijagnostičko sredstvo za isključivanje VTE (Tabela 2 i Tabela 3).

U tabeli 2. dat je prikaz vrednosti rezultata D-dimera u populaciji zdravih trudnica, koji je određen primenom HemosIL test reagens (Instrumental Laboratory Milan), Automatizovan lateks imunoesej, sa „cut-off“ van trudnoće od 230 ng/ml.

Tabela 2.

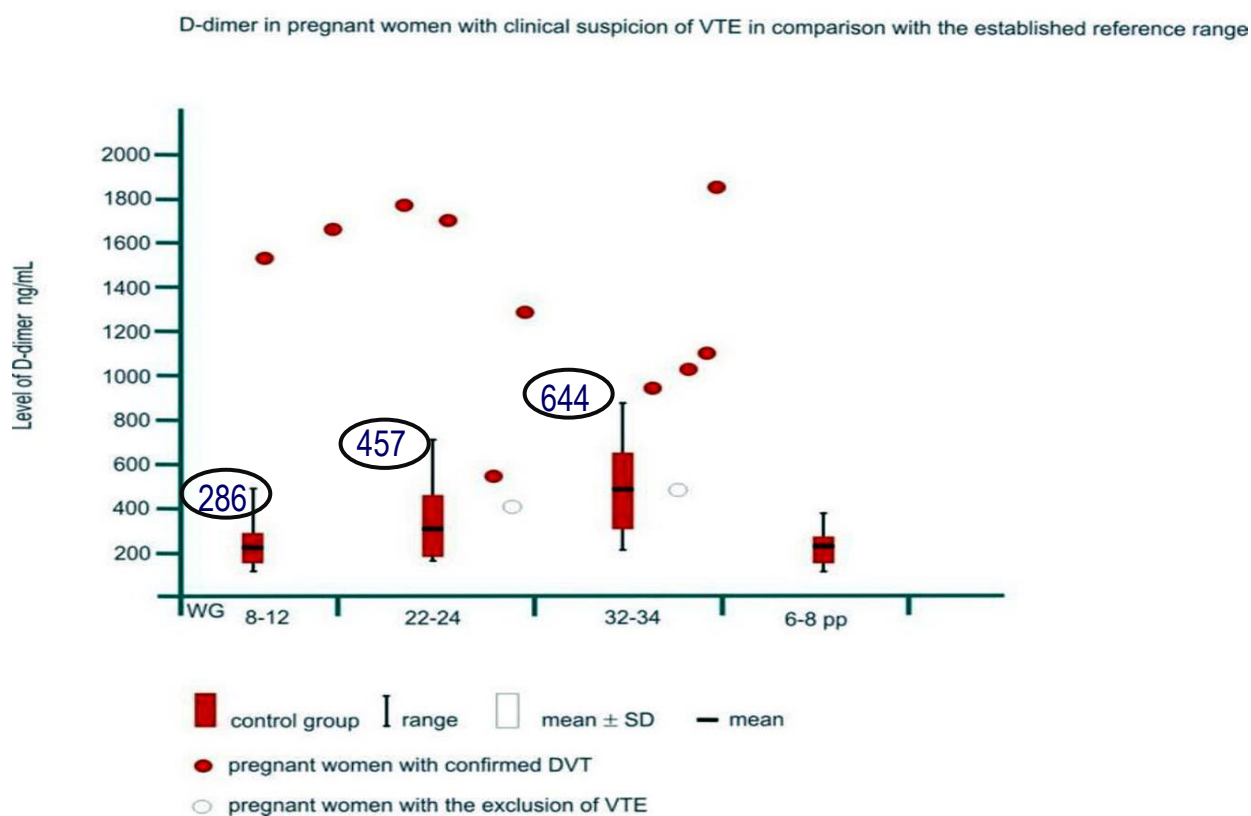
Referentne vrednosti D- dimera i novoutvrđeni “Cut off” u odnosu na trimestar

Gestaciona nedelja	8-12	22-24	32-34	6-8 n. postpart.
D-dimer (ng/ml)				
X±SD	222 ± 64	326 ± 131	475 ± 169	223 ± 59
Raspon	121 – 474	171 – 733	206 – 890	110-390
“Cut off”	286	457	644	
N	89	87	86	86

p < 0.0001 razlika između prvog i drugog, drugog i trećeg, prvog i trećeg; p= 0.933 razlika između prvog trimestra i nakon porođaja.

Primenom novih “cut-off” vrednosti ispitana je grupa trudnica sa suspektnom trombozom pri čemu je utvrđen NPV od 100% (Slika 1).

Figure 1.



(Kovac et al. The use of D-dimer with new cutoff can be useful in diagnosis of venous thromboembolism in pregnancy. Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol 2010; 148: 27-30.)

U tabeli 3. dat je prikaz vrednosti rezultata D-dimera u populaciji zdravih trudnica, koji je određen primenom Innovance D-dimer; Simens immunoturbodimetric assay, Innovance

D-dimer, Dade Behring. Vrednosti D-dimera su izražene u mg/L, sa „cut off“ vrednošću van trudnoće od 0.55 mg/L.

Tabela 3.

Referentne vrednosti D- dimera i novoutvrđeni "Cut off" u odnosu na trimestar

Gestaciona nedelja	8-12	22-24	32-34
D-dimer (mg/L)			
X±SD	0.38 ± 0.20	1.01 ± 0.41	1.49 ± 0.62
Raspon	0.17-0.92	0.41-2.45	0.78-3.25
"Cut off"	0.58	1.42	2.12

$p < 0.0001$ razlika između prvog i drugog, drugog i trećeg, prvog i trećeg trimestra

Prilikom tumačenja rezultata treba imati u vidu da određena patološka stanja utiču na varijabilnost D-dimera, u trudnoći, odnosno da su ta stanja praćena visokim vrednostima D-dimera.

Varijabilnosti D dimera u trudnoći:

- Venski tromboembolizam
- Preeklampsija
- HELLP sindrom
- Abrupeija placente
- Multifetalne trudnoće
- Trombofilija (deficit inhibitora)
- Deficit C1 INH

ZAKLJUČAK

Važno je naglasiti, da se D-dimer u dijagnozi venskog tromboembolizma, koristi kao test za isključenje tromboze i da se ne treba tumačiti odvojeno, nego uvek u saglasnosti sa kliničkom slikom. Na osnovu odnosa D-dimer rezultata i/ili kliničke procene, donosi se odluka o nastavku dijagnostičkih pretraga: color dopler za duboke venske tromboze i perfiziona scintigrafija za plućni embolizam, a od dobijenih rezultata zavisi dalji terapijski tretman (nastavak ili obustavljanje antikoagulantne terapije).

LITERATURA

1. Marik PE, Plante LA. Venous Thromboembolic Disease and Pregnancy. N Engl J Med 2008;359:2025-33.
2. Greer I. Inherited thrombophilia and venous thromboembolism. Best Practice & Research Clinical Obstetrics & Gynaecology 2003;7:413-25.
3. Kovač M. Uloga D-dimera u predviđanju prevenciji i lečenju tromboembolizma u

trudnoći. Doktorska teza. Medicinski fakultet u Beogradu, 2009.

4. Clarc P, Brennand J, Conkie JA, et al. Activated protein C sensitivity, Protein C, protein S and coagulation in normal pregnancy. Thromb Haemost 1998;79:1166-70.
5. He S, Wramsby M, Bokareva M. et al. Decrease in protein C inhibitor activity and acquired APC resistance during normal pregnancy. Journal of Thrombosis and Thrombolysis 2000;9:277-81.
6. Bremme K, Ostlund E, Almqvist I. et al. Enhanced thrombin generation and fibrinolytic activity in the normal pregnancy and the puerperium. Obstet Gynecol 1992;80:132-7.
7. Gilbert J, Fernandez JA, Espana F. et al. Physiological coagulation inhibitors (protein S, protein C and antithrombin III) in severe preeclamptic states and in users of oral contraceptives. Thromb Res 1988;49:319-29.
8. Bremme K. Haemostasis in normal pregnancy. In Brenner B, Marder V, Conard J, editors. Womens Issues in Thrombosis and Haemostasis. Martin Dunitz Ltd, a member of the Taylor&Francis Group; 2002. p.151-65.
9. Kjellberg U, Anderson NE, Rosen S. et al. APC resistance and other haemostatic variables during pregnancy and puerperium. Thromb Haemost 1999;81:527-31.
10. Freyssinet JM. Cellular microparticles: what are they bad or good for? J Thromb Haemost 2003;1:1655-62.
11. Chabloz P, Reber G, Boehlen F. et al. TAFI antigen and D-dimer levels during normal pregnancy and at delivery. Br J Haematol 2001;115:150-2.
12. Bretelle F, Sabatier F, Desprez D. et al. Circulating microparticles: a marker of procoagulant state in normal pregnancy and pregnancy complicated by preeclampsia or

- intrauterine growth restriction. *Thromb Haemost* 2003;89:486-92.
13. Conard J. and Horellou H. Inherited thrombophilia and gestational venous thromboembolism. In Brenner B, Marder V, Conard J, editors. *Womens Issues in Thrombosis and Haemostasis*. Martin Dunitz Ltd, a member of the Taylor&Francis Group; 2002. p.166-79.
14. Conard J. Horellou MH, Van Dreden P. et al. Thrombosis and pregnancy in congenital deficiencies in AT III, Protein C or Protein S: study of 78 women. *Thromb Haemost* 1990;63:319-20.
15. Kovac M, Mitic G, Mikovic Z. et al. Thrombophilia in women with pregnancy-associated complications: fetal loss and pregnancy related venous thromboembolism. *Gynecologic and Obstetric Investigation* 2010;69:233-8.
16. Greer I. Diagnosis prevention and treatment of gestational venous thromboembolism. In Brenner B, Marder V, Conard J, editors. *Womens Issues in Thrombosis and Haemostasis*. Martin Dunitz Ltd, a member of the Taylor&Francis Group; 2002. p.182-197.
17. Nijkeuter M, Ginsberg J, Huisman V. et al. Diagnosis of deep vein thrombosis and pulmonary embolism in pregnancy: a systematic review. *Journal of Thrombosis and Haemostasis* 2005;4:496-500.
18. Francis JL. Thromboembolic states. In: Gross S, Roath S editors. *Haematology*, Baltimore: Williams&Wilkins, 1996:599-611.
19. Zakai NA, Katz R, Jenny NS. et al. Inflammation and hemostasis biomarkers and cardiovascular risk in the elderly: the Cardiovascular Health Study. *J Thromb Haemost* 2007;5:1128-35.
20. Lowe GD, Rumley A, Sweetnam PM. et al. Fibrin, D-dimer markers of coagulation activation and the risk of major ischaemic heart disease in the caerphilly study. *Thromb Haemost* 2001;86:822-7.
21. Lange LA, Reiner AP, Carty CL. et al. Common genetic variants associated with plasma fibrin D-dimer concentration in older European and African-American adults. *J Thromb Haemost* 2008;65:654-9.
22. Caliesi C, Funfsinn N, Mauron I. et al. Performance of a new fibrin monomer assay to excluded deep vein thrombosis in symptomatic patients. *Thromb Haemost* 1999;81:50-3.
23. Freyburger G, Trillaud H, Labrousse S. et al. D-dimer strategy in thrombosis exclusion. *Thromb Haemost* 1998;79:32-7.
24. Chan WS, Sanjeev C, Lee A. et al. A red Blood Cell Agglutination D-dimer Test to Exclude Deep Venous Thrombosis in Pregnancy. *Annals of Internal Medicine* 2007; 147:165-70.
25. Morse M. Establishing a normal range for D-dimer levels through pregnancy to aid in the diagnosis of pulmonary embolism and deep vein thrombosis. *J Thromb Haemost* 2004;2:1202-4.
26. Epiney M, Boehlen F, Boulvain M. et al. D-dimer levels during delivery and postpartum. *J Thromb Haemost* 2005;3:268-71.
27. Eichinger S, Waltermann A, Phillip K et al. Prospective Evaluation of Hemostatic System Activation and Thrombin Potential in Healthy Pregnant Women with and without Factor V Leiden. *Thromb Haemost* 1999;82:1232-6.
28. Eichinger S. D-dimer testing in pregnancy. *Seminars in vascular medicine* 2005;5:375-8.
29. Kovac M, Mikovic Z, Rakicevic Lj. et al. The use of D-dimer with new cut-off can be useful in diagnosis of venous thromboembolism in pregnancy. *European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology* 2010;148:27-30.

PERIOPERATIVNO TRANSFUZIOLOŠKO ZBRINJAVANJE BOLESNIKA SA HEMATOLOŠKIM POREMEĆAJIMA

Ana Antić¹, Zoran Stanojković^{1,2}

¹Zavod za transfuziju krvi Niš; ²Medicinski fakultet Niš.

SAŽETAK

Preoperativna priprema svakog bolesnika treba da obuhvati ispitivanje kompletne krvne slike i koagulacijska testiranja, kako bi se blagovremeno otkrili primarni ili sekundarni hematološki poremećaji koji mogu biti uzrok brojnih peri- ili postoperativnih komplikacija.

Anemija je najčešći preoperativni poremećaj kod hirurških pacijenata, a terapijski pristup zavisi od vrste i stepena anemije, kao i vrste i težine hirurške intervencije. Kod pacijenata sa eritrocitozom preporučuje se smanjenje ukupnog volumena eritrocita venepunkcijom, uzimajući u obzir stepen perioperativnog krvarenja. Trombocitopenije zahtevaju preoperativnu korekciju broja trombocita, a u slučajevima masivnog krvarenja indikovana je transfuzija koncentrata trombocita.

Perioperativno praćenje sistema koagulacije obuhvata standardna i "point-of-care" koagulacijska testiranja, koja omogućavaju direktno uvođenje rezultata testiranja u transfuzijske algoritme i racionalno vođenje terapije. Poseban terapijski pristup u perioperativnom periodu zahtevaju bolesnici sa urođenim poremećajima koagulacije (hemofilija A, hemofilija B, von Willebrandova bolest), zavisno od stepena koagulacijskog poremećaja i vrste hirurške intervencije. Najdramatičniji sekundarni koagulacijski poremećaj je diseminovana intravaskularna koagulacija, gde je neophodna brza dijagnoza i hitna i intenzivna terapija.

Ključne reči: perioperativni period, anemija, eritrocitoza, trombocitopenija, koagulacija

Hematološke bolesti, prethodno dijagnostifikovane ili uglavnom neprepoznate, su česte u hirurškoj kliničkoj praksi i povezane su sa povišenom stopom perioperativnog morbiditeta i mortaliteta. Multidisciplinarni pristup i bliska saradnja hirurga, hematologa, transfuziologa i anesteziologa zasnovana na pažljivom posmatranju i poštovanju preoperativnih, intraoperativnih i postoperativnih protokola smanjuje rizik od komplikacija za ove pacijente i povećava uspešnost izvođenja hirurških procedura. U ovom radu osvrnuli smo se na hematološke poremećaje koji se najčešće sreću u hirurškoj praksi uz savremene preporuke za njihovo zbrinjavanje.

Anemija

Anemija je najčešći preoperativni problem kod hirurških pacijenata. Definiše se kao smanjenje koncentracije hemoglobina ispod 12,5 g/dL kod muškaraca i 11,5 g/dL kod žena, a prema podacima Svetske zdravstvene organizacije (WHO) prevalenca anemije u opštoj populaciji je 11% kod muškaraca i 10,2 % kod žena (1).

Preoperativna anemija je udružena sa povećanom incidencom postoperativnih komplikacija i povišenom stopom mortaliteta, kao i potrebom za većim brojem transfuzija eritrocita, koje same po sebi nose rizik neželjenih reakcija. Retrospektivna analiza Wu WC i saradnika na preko 300.000 hirurških pacijenata je pokazala da je pad hematokrita ispod 0,30 udružen sa statistički značajnim povećanjem mortaliteta u postoperativnom periodu od 30 dana (2), dok je ispitivanje Beattie WS i saradnika u kome su 40% pacijenata preoperativno imali anemiju pokazalo da je upravo taj faktor udružen sa petostrukim povećanjem mortaliteta u postoperativnom periodu od 90 dana (3). Postoji određen stepen tolerancije na postoperativnu anemiju kod pacijenata bez kardiovaskularnih oboljenja, ali je dokazano da se za svaki pad od 1 g/dL postoperativne koncentracije hemoglobina koja je ispod 7 g/dL stopa mortaliteta povećava za 1,5 puta (4).

Ciljna koncentracija hemoglobina (Hb) kod pacijenata sa anemijom je 7-9 g/dL. Akutna anemija (Hb<5 g/dL) se kod zdravih osoba dobro podnosi, obzirom da kompenzatorni meha-

nizmi obezbeđuju adekvatnu tkivnu oksigenaciju. Ispitivanja takođe pokazuju da restriktivni transfuzijski protokol primenjen kod hirurških pacijenata ($Hb = 7-8 \text{ g/dL}$) je jednako efikasan i bezbedan kao i liberalni protokol ($Hb = 9-11 \text{ g/dL}$) (5), kao i da povećanje koncentracije hemoglobina iznad 9 g/dL ne smanjuje krvarenje niti broj primenjenih koncentrata eritrocita (6). Savremene preporuke zbrinjavanja perioperativne anemije podrazumevaju:

- da se nivo Hb određuje najduže u roku od 28 dana pre planirane hirurške intervencije, u kome bi eventualna korekcija anemije podrazumevala primenu preparata gvožđa, vitamina B12, folne kiseline ili eritropoetina umesto transfuzije koncentrata eritrocita;
- da ciljani preoperativni nivo Hb bude u skladu sa preporukama WHO (za žene $>12 \text{ g/dL}$, za muškarce $>13 \text{ g/dL}$);
- laboratorijska ispitivanja treba usmeriti u pravcu dijagnostifikovanja deficijencije hranljivih činilaca, hronične bubrežne insuficijencije i hroničnih inflamatornih oboljenja;
- primeniti transfuzije koncentrata eritrocita isključivo prema savremenim preporukama i transfuziološkim algoritmima (7).

Eritrocitoza

Povećanje nivoa Hb , čak i umereno, može značajno uticati na promenu viskoznosti krvi. Povećanje hematokrita (Hct) iznad 0,50 dovodi do eksponencijalnog povećanja viskoznosti krvi, posebno malih krvnih sudova, što se manifestuje usporenim krvnim protokom i smanjenom tkivnom oksigenacijom. Klinički simptomi eritrocitoze zavise od vrste osnovnog oboljenja i stepena porasta Hct , a posebno je osetljiva cerebralna cirkulacija, zbog čega se najpre javljaju glavobolje. Pacijenti su u riziku za arterijsku ili vensku trombozu, te su preoperativno indikovani flebotomija, primena kiseonika i ispitivanje koagulacionog statusa (8).

Trombocitopenija

Broj trombocita u cirkulaciji kreće se normalno između $150 - 450 \times 10^9/L$, životni vek je između 9 i 12 dana. Najveći deo trombocita cirkuliše krvotokom, a ostali su smešteni u slezini. Ako dođe do naglog gubitka trombocita u krvi potrebno je prosečno 10 dana da se sazrevanjem megakariocita nadoknadi smanjeni

broj trombocita. Trombocitopenija se klinički manifestuje krvarenjem sa različitih mesta, najčešće kao epistaksa, petehije, modrice, krvarenja iz gastrointestinalnog trakta ili na mestu venepunkcije, posebno kod pacijenata kod kojih je broj trombocita manji od $15 \times 10^9/L$ (9). Trombocitopenije mogu biti imunog ili neimunog karaktera. Najčešći primer autoimune destrukcije trombocita je idiopatska trombocitopenijska purpura (ITP), dok su trombotična trombocitopenijska purpura (TTP), hemolitičko uremijski sindrom (HUS) i HELLP sindrom oblici destrukcije trombocita koja nije uzrokovana imunim mehanizmima. Savremene preporuke za zbrinjavanje trombocitopenije podrazumevaju:

- za manje invazivne procedure kao što je plasiranje katetera, biopsija ili lumbalna punkcija najmanji broj trombocita kod pacijenta treba da bude između $20 - 30 \times 10^9/L$;
- za veće hirurške intervencije neophodno je da broj trombocita bude veći od $50 \times 10^9/L$;
- za neurohirurške i operacije na oku broj trombocita treba da bude veći od $100 \times 10^9/L$;
- terapija TTP-a podrazumeva primenu kortikosteroida, izvođenje terapijske izmene plazme (TIP) i transfuzije zamrznute sveže plazme, dok su transfuzije koncentrata trombocita (KT) kontraindikovane;
- terapija ITP-a počinje niskim dozama kortikosteroida, a kod ozbiljnih krvarenja primenjuju se KT (transfuzije na svakih 8-12 sati) u kombinaciji sa kortikosteroidima ili imunoglobulinima, TIP i na kraju urgentna splenektomija;
- zbog rizika pojave neželjenih reakcija (pre svega, bakterijska sepsa, aloimunizacija, pojava refraktarnosti) broj transfuzija KT treba svesti na optimalnu meru odnosno usmeriti ih na primenu aferezni trombocita od pojedinačnog davaoca (9-11).

Poremećaji koagulacije

Perioperativno praćenje sistema koagulacije predstavlja osnovu za adekvatno i pravovremeno sprovođenje pro- i antitromboznih procedura kod pacijenata koji se podvrgavaju hirurškoj intervenciji. Danas se prednost daje "point-of-care" koagulacijskom monitoringu u odnosu na standardna preoperativna laboratorijska testiranjima, posebno imajući u vidu ograničenja rutinskih testova kod zbrinjavanja masivnog

krvarenja. Savremeni pristup perioperativnog koagulacijskog monitoring obuhvata: anamnezu bolesnika, rutinska koagulacijska testiranja, ispitivanje viskoelastičnih svojstava krvi u okviru "point-of-care" koagulacijskih testiranja, praćenje heparinske terapije i ispitivanje funkcije trombocita (12).

Urođeni poremećaji koagulacije (hemofilija A, hemofilija B, von Willebrandova bolest) su stanja koja zahtevaju posebnu pažnju u perioperativnom periodu. Bolesnici sa hemofilijom mogu imati spontana krvarenja u zglobove i mišiće ili ekscesivna krvarenja nakon povrede ili hirurške intervencije, pri čemu je stepen krvarenja u direktnoj korelaciji sa stepenom deficita faktora koagulacije. Kod pacijenata sa blagim i umerenim oblikom hemofilije preporučuje se primena dezmodipresina i traneksamske kiseline, dok je u težim slučajevima indicirana primena koncentrata faktora koagulacije. Svetsko Udruženje za Hemofiliju (WFH) preporučuje da preoperativna koncentracija faktora koagulacije treba da bude između 80-100%. Postoperativno, koncentraciju faktora treba održavati na 60-80 % u prva tri dana, 40-60 % između četvrtog i šestog dana i 30-50% tokom druge postoperativne nedelje. Takođe se preporučuje da kod biopsije jetre koncentracija faktora koagulacije bude veća od 80% u trajanju od najmanje tri dana. Kod izvođenja manjih invazivnih procedura primena koncentrata faktora je potrebna samo neposredno pre procedure, dok je za ekstrakciju zuba važno postići koncentraciju faktora od najmanje 50% (13, 14). Transfuzija zamrznute sveže plazme (ZSP) i krioprecipitata je indicirana samo u slučajevima nedostupnosti koncentrata faktora koagulacije. Zbrinjavanje krvarenja kod pacijenata sa von Willebrandovom bolešću (vWD) podrazumeva primenu krioprecipitata ili koncentrata von Willebrandovog faktora (vWF) u početnoj dozi od 40-60 U/kg, uz dozu održavanja od 20-40 U/kg na svakih 8-24 h. Obzirom da koncentri vWF sadrže FVIII i time imaju potencijalni tromboembolijski rizik, neophodna je antitrombozna profilaksa. Ukoliko je kod ovih pacijenata prisutno krvarenje i pored povećanja nivoa FVIII i vWF potrebno je primeniti koncentrate trombocita (15).

S druge strane, mijeloproliferativna oboljenja, trudnoća, malignitet, primena oralnih kontraceptivnih sredstava, nefrotski sindrom, antifosfolipidni sindrom i mnoga druga stanja udružena su sa povećanim rizikom za nastanak tromboze.

Preoperativna profilaksa ovih bolesnika uključuje primenu nefrakcionisanog ili niskomolekularnog heparina, oralne antagoniste vitamina K (varfarin), direktne inhibitore trombina (hirudin) i inhibitore FXa (rivaroxaban).

Diseminovana intravaskularna koagulacija (DIK) je sindrom koji se karakteriše sistemskom aktivacijom koagulacije, te se u isto vreme javljaju tromboza i krvarenja. DIK je sekundarna pojava i komplikuje brojna klinička stanja, kao što su infekcije, solidni tumori, hematološke maligne bolesti, trauma, ginekološka oboljenja, bolesti jetre i dr. U dijagnostici DIK-a koristi se skrining laboratorijski testovi, koji pokazuju produženo vreme krvarenja, sniženi broj trombocita, sniženu koncentraciju fibrinogena, produženo protrombinsko vreme (PT), aktivisano parcijalno trombotoplastinsko vreme (aPTT) i trombinsko vreme (TT), povećanje D-dimera (16). Terapija DIK-a podrazumeva pre svega zbrinjavanje osnovnog poremećaja koje je dovelo do razvoja DIK-a (npr. primena antibiotika ili hirurška drenaža), transfuzija KT se preporučuje kod postojanja aktivnog krvarenja ukoliko je broj trombocita manji od $50 \times 10^9/L$ ili kod postojanja visokog rizika za krvarenje ukoliko je broj trombocita manji od $20 \times 10^9/L$, dok se transfuzija ZSP primenjuje ukoliko je PT i/ili aPTT produženo više od 1,5 puta ili je koncentracija fibrinogena manja od 1,5 g/dL (u tom slučaju preporučuje se primena krioprecipitata ili koncentrata fibrinogena). Ukoliko dominira tromboza preporučuje se primena terapijskih doza niskomolekularnog heparina, a u slučajevima stanja hiperfibrinolize (leukemija, trauma) indicirana je primena antifibrinolitika (17).

LITERATURA

1. Guralnik JM, Eisenstaedt RS, Ferrucci L. Prevalence of anemia in persons 65 years and older in the United States: evidence for a high rate of unexplained anemia. *Blood* 2004; 104: 2263-8.
2. Wu WC, Schiffner TL, Henderson WG. Preoperative hematocrit levels and postoperative outcomes in older patients undergoing noncardiac surgery. *J Am Med Assoc* 2007; 297: 2481-8.
3. Beattie WS, Karkouti K, Wijeyesundera DN, Tait G. Risk associated with preoperative anemia in noncardiac surgery: a single-center cohort study. *Anesthesiology* 2009; 110: 574-81.



4. Marjanović V, Mihajlović M, Budić I, Janković R, Marjanović G. Treatment of hematological emergencies in surgical patients. Sixth Annual Spring Scientific Symposium in Anesthesiology and Intensive Care, April 25-27, 2014, Niš, Serbia; p.79-84.
5. Vincent JL, Baron JF, Reinhart K. Anemia and blood transfusion in critically ill patients. *JAMA* 2002; 288: 1499-507.
6. Bisbe E, Castillo J, Sáez M.. Prevalence of preoperative anemia and hematinic deficiencies in patients scheduled for elective major orthopedic surgery. *Transfus Alternat Transfus Med* 2008; 10:166-73.
7. Goodnough LT, Maniatis A, Earnshaw P, Benoni G, Beris P, Bisbe E, et al. Detection, evaluation, and management of preoperative anaemia in the elective orthopaedic surgical patient: NATA guidelines. *Br J Anaesth* 2011; 106 (1): 13-22.
8. Tomin D. Preoperative preparation of the patient with the abnormalities of red and white blood cells. *ACI* 2011; 58(2): 77-82.
9. Stanojković Z, Antić A, Balint B, Stanojković M, Jelić M. Klinička primena transfuzije trombocita. *Bilt Transfuziol* 2013; 59(1-2): 20-6.
10. Italian Society of Transfusion Medicine and Immunohaematology. Recommendations for the transfusion of plasma and platelets. *Blood Transfus* 2009; 7: 132-50.
11. Alamelu J, Liesner R. Modern management of severe platelet function disorders. *Brit J Haematol* 2010; 149(6): 813-23.
12. Stanojković Z, Antić A, Stanojević G, Stanojković M. Point-of-care testiranja sistema hemostaze. *Bilt Transfuziol* 2011; 57(1-2): 41-8.
13. Hermans C, Altisent C, Batorova A. Replacement therapy for invasive procedures in patients with haemophilia: literature review, European survey and recommendations. *Haemophilia* 2009; 15: 639-58.
14. Redwine J, Bold RJ. Perioperative care of the patient with hemophilia undergoing urgent appendectomy. *Arch Surg* 2007; 142(9): 894-7.
15. Nichols WL, Hultin MB, James AH. von Willebrand disease (VWD): evidence-based diagnosis and management guidelines, the National Heart, Lung, and Blood Institute (NHLBI) Expert Panel report (USA). *Haemophilia* 2008; 14: 171-232.
16. Wada H, Matsumoto T, Yamashita Y. Diagnosis and treatment of disseminated intravascular coagulation (DIC) according to four DIC guidelines. *J Intensive Care* 2014; 2:15.
17. Nienaber JJ, Duncan AA, Oderich GS, Pruthi RK, Nichols WL. Operative and nonoperative management of chronic disseminated intravascular coagulation due to persistent aortic endoleak. *J Vasc Surg* 2014; 59 (5):1426-9

LIMFOMI U TRUDNOĆI – DIJAGNOSTIČKO TERAPIJSKI PRINCIPI

Milena Todorović-Balint^{1,2}, Katarina Jeremić^{3,2}, Bela Balint^{4,5,6}, Vesna Kesić^{3,2}, Darko Antić^{1,2},
Jelena Bila^{1,2}, Boško Anđelić^{1,2}, Aleksandra Sretenović¹, Vladislava Đurašinović¹,
Jelena Jeličić¹, Vojin Vuković¹, Biljana Mihaljević^{1,2}

¹Klinika za hematologiju Klinički centar Srbije, Beograd, Srbija, ²Medicinski fakultet Univerzitet u Beogradu, Srbija, ³Klinika za ginekologiju i akušerstvo Klinički centar Srbije, Beograd, Srbija, ⁴Institut za transfuziologiju i hemobiologiju VMA, Beograd, Srbija; ⁵Medicinski fakultet VMA, Univerzitet odbrane, Beograd; ⁶Institut za medicinska istraživanja, Univerzitet u Beogradu

SAŽETAK

Limfom je četvrti po učestalosti malignitet u trudnoći, mada se podaci o tome zasnivaju više na malim serijama i prikazima slučajeva, nego na velikim kontrolisanim studijama. Trećina trudnica sa limfomom primi terapiju tek postpartalno, dok oko 70% trudnica prima hemioterapiju već od početka drugog trimestra trudnoće, kada je to i dozvoljeno. Rezultati lečenja trudnica nisu se razlikovali od onih postignutih kod negravidnih bolesnica sa istom dijagnozom. Najčešće komplikacije lečenja limfoma u trudnoći su nešto veća učestalost prematurusa i zaostajanje u intrauterinom ravoju. Prosečna težina novorođenčeta ipak, nije odstupala od uobičajenih mera pri rođenju u toku normalnih trudnoća. Psihomotorni i kognitivni razvoj ovako rođene dece nije se razlikovao od njihovih vršnjaka rođenih iz normalnih trudnoća. Standardna hemioterapija, data najranije u 13-oj nedelji gestacije, nije bila udružena sa značajnim komplikacijama i dala je zadovoljavajuće rezultate lečenja kod trudnica sa limfomom.

Ključne reči: limfomi, trudnoća, hemioterapija, rezultati lečenja, komplikacije

Limfomi predstavljaju primarne neoplazme limfnog tkiva, a četvrti su po učestalosti malignitet u trudnoći, nakon karcinoma dojke, grlića materice i jajnika (1). Svake godine se dijagnostikuje 3500 - 4000 limfoma u toku trudnoće, što znači da se na svakih 5-6 hiljada trudnoća postavi dijagnoza limfoma (2).

Pojava limfoma se najčešće klinički manifestuje uvećanim limfnim žlezdama na vratu kao i opštom simptomatologijom (noćno znojenje, malaksalost, gubitak u telesnoj masi, povišena telesna temperatura). Klinička slika, prognoza, kao i terapija variraju u zavisnosti od patohistolškog tipa kao i kliničkog stadijuma (CS) bolesti. Sami limfomi, kao heterogene neoplazme limfnog tkiva, precizno su definisani Klasifikacijom Svetske zdravstvene organizacije (WHO klasifikacija) iz 2008. godine (3), a globalno se dele na Hočkinov limfom (HL) i niz entiteta iz grupe nehočkinskih limfoma (NHL).

Prema nekim istraživanjima HL se dominantno dijagnostikuje u ranijim stadijumima bolesti I-II, dok se NHL prezentuje u uznapredovalom CS III-IV. Zahvaljujući današnjem terapijskim dostignucima, posebno u poslednjih godina,

limfomi postaju bolest kod kojih je moguća dugotrajna remisija. Naime, smatra se da je HL potencijalno izlečiva bolest u preko 80% u ranom stadijumu bolesti, dok taj procenat iznosi oko 50% kod uznapredovale forme bolesti (4,5). Kada se limfom javi u trudnoći, nameću se pitanja vezana za njihov međusobni uticaj, kao i kao i na dejstvo trudnoće na plod.

Dijagnostika je otežana zbog nemogućnosti korišćenja radioloških tehnika tipa Rx zraka i CT-a, ali uz ehosonografiju, NMR, i obaveznu biopsiju limfnog (tumorskog) tkiva postavlja se dijagnoza.

Kod praćenja i lečenja ovih pacijentkinja, cilj je ne samo postizanje remisije, već što sigurniji tok trudnoće i rađanje zdravog novorođenčeta. Multidisciplinarni pristup trudnoćama kod kojih je ustanovljen limfom u trudnoći kao i pre nje, zahteva timski rad hematologa, radiologa, psihologa i pedijatra neonatologa. Ipak, zdravlje trudnice prioritet je u odnosu na rizik za fetus usled primene hemioterapije.

Uticaj trudnoće na pojavu i tok limfoma još uvek je predmet istraživanja. Prema nekim autorima nema razlike u preživljavanju žena koje su

imale terapijski prekid trudnoće zbog HL u odnosu na grupu žena koje trudnoću nisu prekidale zbog bolesti (6). Ipak kod pacijentkinja sa NHL i agresivnim histološkim tipom kao i diseminovanom bolešću, situacija je drugačija. Kod takvih trudnoća kada je protok krvi povećan, može se očekivati dalja diseminacija bolesti sa zahvatanjem dojke, materice i jajnika. Ipak hormonske, a prvenstveno imunološke promene u trudnoći mogu stabilizovati rast limfoma do porođaja (6).

Uticaj limfoma na tok trudnoće, rast i razvoj fetusa, pojavu kongenitalnih malformacija kao i zahvatanje placente, prema većini autora nema preveliki značaj (7). U slučaju HL zabeležen je slučaj zahvatanja posteljice koji se završio rađanjem zdravog ploda, kao i slučaj vertikalne transmisije maligniteta sa majke na plod. Mogući mehanizam takvog dejstva je prelazak malignih ćelija u ranoj gestaciji kada još nije formiran imunološki sistem ploda (8).

Ipak, brojne retrospektivne studije pokazuju da su kod trudnica sa limfomom lečenih hemioterapijom, novorođenčad imala normalan psihomotorni razvoj, bez neurološkog, kardiovaskularnog, renalnog ili hematološkog deficita (9,10).

Terapijski principi

Terapijski pristup je prevashodno individualan poštujući aspekte bolesti, hemioterapijske opcije, dobrobit lečenja, rizike po majku/fetus, kao i želju trudnice. Ipak, opšte terapijske smernice definišu u I trimestru prekid trudnoće, dok je u II/III trimestru moguće lečenje trudnice. U slučaju trudnoće stare 36 i više gestacijskih nedelja, terapija se odlaže postpartalno, ukoliko tip limfoma to dozvoljava (6). Uopšteno gledano, hemioterapiju treba odložiti, koliko god je to moguće do postizanja fetalne zrelosti, što ipak predstavlja opciju kod malignog oboljenja koje ne ugrožava život majke. Generalno, kod agresivnih limfoma treba sprovesti lečenje, dok se kod indolentnih limfoma terapija odlaže postpartalno. Standardni tretman limfoma podrazumeva primenu hemioterapije, radioterapije, kao i ciljnu imunoterapiju monoklonskim antitelima, kao što je kod B ćelijskih limfoma monoklonsko anti CD20 antitelo (Rituximab).

Radioterapija se svakako ne preporučuje u trudnoći koja se želi održati, pogotovo ne u prvom trimestru kada je aktuelna organogeneza, zbog velike incidence malformacija, zastoja u

rastu i intrauterine smrti ploda. U kasnijim trimestrima može primeniti uz obaveznu zaštitu abdomena i male karlice i minimalni rizik po plod. Efektivnost radioterapije u trudnoći u tretmanu supradijafragmalne limfadenopatije najčešća je kod HL (11).

Hemioterapija se preporučuje tokom drugog i trećeg trimestra, kada je moguće primeniti punu dozu citostatika u lečenju limfoma, uz minimalan rizik po plod.

Lečenje Hoćkinovog limfoma u trudnoći

Lečenje HL podrazumeva primenu ABVD protokola (doxorubicin, bleomycin, vinblastin, dakarbazin) koji je standardna inicijalna terapijska opcija. Vreme započinjanja lečenja zavisi od kliničkog stadijuma, kao i gestacijske starosti trudnoće (5,6).

Tokom prvog trimestra u slučaju povoljnog stadijuma HL, uglavnom se primenjuje princip "posmatraj i čekaj". Međutim kod odmaklih stadijuma odnosno kod trudnica sa visokim rizikom ili progresijom bolesti, predlaže se terapijski princip koji podrazumeva primenu polihemioterapije.

U toku drugog kao i trećeg trimestra poželjno je odložiti hemoterapiju što kasnije ukoliko to ne utiče na tok bolesti. Ipak, u odmaklim stadijumima a bolesti (velika tumorska masa, zahvatanje visceralnih organa) terapiju treba primeniti što pre po protokolu ABVD (12). Bitno je reći da trudnoća ne pogoršava rezultate lečenja HL.

Lečenje Neoćkinskih limfoma u trudnoći

Kod pacijentkinja sa NHL, terapija zavisi od CS bolesti, histološkog podtipa, identifikovanih prognostičkih faktora, kao i starosti trudnoće. Utvrđivanje patohistološkog podtipa NHL je najvažniji inicijalni korak u predstojećoj terapijskoj odluci. U toku trudnoće visoka je incidenca ektranodalnih limfoma, često genitalnog trakta (vagina, dojka, ovarijum), zbog povećane prokrvljenosti navedenih organa.

Kod pacijentkinja sa manje agresivnim histološkim podtipom, odnosno takozvanim indolentnim tipom NHL može se sačekati kraj prvog trimestra kada se uključuje hemoterapija. Međutim, najveći broj NHL koji su otkriveni u trudnoći pripadaju takozvanim agresivnim limfomima (difuzni B-krupnoćelijski limfom, Burkittov limfom, limfoblastni limfom), te se u

slučaju prvog trimestra, predlaže terapijski prekid trudnoće.

Hemioterapijski protokol CHOP (ciklofosfamid, doksorubicin, vinkristin, prednison) predstavlja terapiju izbora u lečenju NHL ne samo u trudnoći već i uopšte. Ova terapija se često kombinuje sa Rituximabom kod CD20 pozitivnih B ćelijskih limfoma. Rituximab kao okosnica terapije B ćelijskih NHL klase je IG1 kappa, i kao takav prolazi placentalnu barijeru pomoću specifičnih receptorskih mehanizama. Trans-placentarni prolaz povećava se sa starošću trudnoće, a njegova primena nije udružena sa povećanom incidencom malformacija. Primećena je prolazna neutropenija, trombocitopenija, anemija i deplecija B-limfocita novorođenčeta (13-16)

Jedana od potencijalnih metoda lečenja je

uzimanje krvi iz pupčane vrpce kao izvor HLA kompatibilnih matičnih ćelija koje se mogu koristiti kao buduća terapija.

Posle lečenja limfoma, predlaže se odlaganje trudnoće tokom prve dve godine, sa obzirom na veći broj recidiva tokom tog perioda.

Najveća serija od 90 trudnica sa dijagnostikovanim NHL (50 bolesnica) i HL (40 bolesnica) sa medijanom dijagnoze limfoma u 24. nedelji gestacije prikazala je da je kod 84 trudnice, trudnoća uspešno završena (6). Hemioterapija u trudnoći je sprovedena kod 67% žena, a najranije od 13. nedelje gestacije. Lečenje je bilo odloženo kod trećine trudnica, a 56% trudnoća je završeno do termina porođaja. Prosečna težina novorođenčadi nije odstupala od uobičajene i iznosila je 2668 g (Figure 1 i 2).

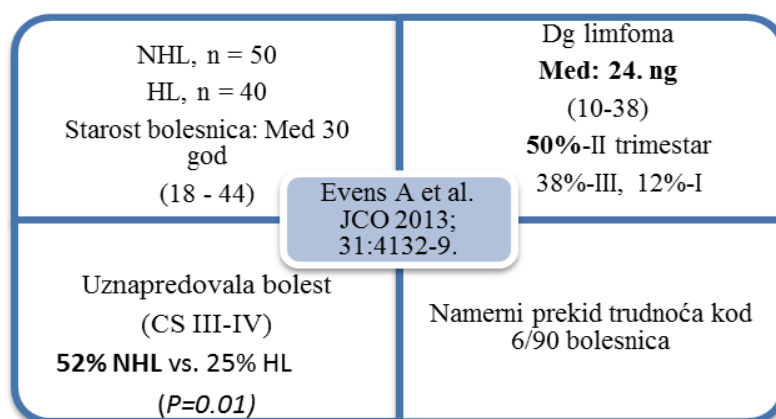


Figura 1. Odlike trudnica sa limfomom, medijana postavljanja dijagnoze i učestalost namernih prekida trudnoće

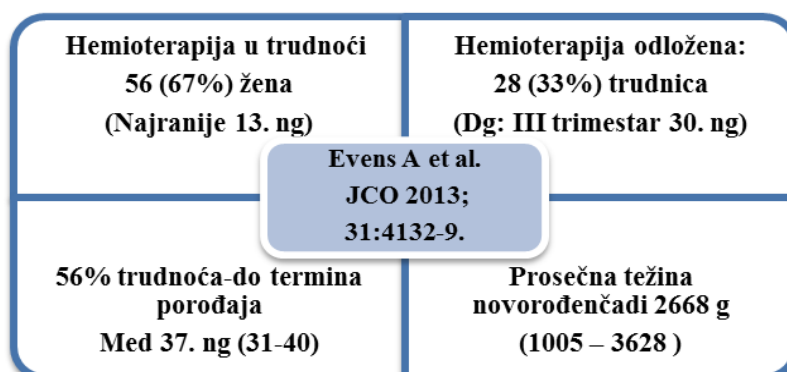


Figura 2. Primena hemioterapije u trudnoći, medijana termina porođaja i prosečna težina novorođenčadi

Pored najvećih komplikacija koje se odnose na povećanje procenta prematurusa i zaostajanje dece u gestacijskom razvoju, rezultati lečenja uz sve bolju dijagnostiku limfoma u trudnoći, dali

su ohrabrujuće rezultate (17-19). To se prevashodno odnosi na visok procenat uspešno završenih trudnoća sa minimalnim komplikacijama, kao i činjenicu da su deca rođena iz ovih

trudnoća u toku školskog perioda imala normalan psihomotorni razvoj kao i i količnik inteligencije (20). U zaključku, standardna hemioterapija, data najranije u 13-oj nedelji gestacije, nije bila udružena sa značajnim komplikacijama i dala je zadovoljavajuće rezultate lečenja kod trudnica sa limfomom.

LITERATURA

- Brenner B, Avivi I, Lishner M: Haematological cancers in pregnancy. *Lancet* 2012; 379:580-7.
- Pereg D, Koren G, Lishner M: The treatment of Hodgkin's and non-Hodgkin's lymphoma in pregnancy. *Haematologica* 2007; 92:1230-7.
- Swerdlow, S.H., Campo, E., Harris, N.L. et al. WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues, Fourth Edition WHO press 2008.
- Draube A, Behringer K, Diehl V. German Hodgkins Lymphoma Study Group Trials, -Lessons from the past and current strategies. *Clin Lymphoma Myeloma*, 2006; 6, 458-68.
- Engert A, Eichenauer DA, Dreyling M. Hodgkin's lymphoma: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol*. 2010; 5:168-71.
- Evens A, Advani R., Press O et al. Lymphoma Occurring During Pregnancy: Antenatal Therapy, Complications, and Maternal Survival in a Multicenter Analysis. *J Clin Oncol* 2013; 31:4132-9.
- Van Calsteren K, Heyns L, De Smet F, et al: Cancer during pregnancy: An analysis of 215 patients emphasizing the obstetrical and the neonatal outcomes. *J Clin Oncol* 2010; 28:683-9.
- Habermann TM, Witzig TE. Management of non-Hodgkin lymphoma during pregnancy. In: Armitage JO, Mauch PM, Harris NL, et al (eds) *Non-Hodgkin Lymphomas* (ed 2). Philadelphia, PA, Kluwer Health/Lippincott Williams & Wilkins, 2010, pp. 501-506.
- Abdel-Hady el-S, Hemida RA, Gamal A, et al. Cancer during pregnancy: Perinatal outcome after in utero exposure to chemotherapy. *Arch Gynecol Obstet* 2012; 286:283-6.
- Gziri MM, Debieve F, De Catte L, et al: Chemotherapy during pregnancy: Effect of anthracyclines on fetal and maternal cardiac function. *Acta Obstet Gynecol Scand* 2012; 91:1465-8.
- Woo SY, Fuller LM, Cundiff JH, et al: Radiotherapy during pregnancy for clinical stages IA-IIA Hodgkin's disease. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1992; 23:407-12.
- Peccatori A, Azim H, Orecchia R et al. Cancer, pregnancy and fertility: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol*. 2013; 24:60-70.
- Mandal P, Dolai K, Bagchi B. et al. B Cell Suppression in Newborn Following Treatment of Pregnant Diffuse Large B-cell Lymphoma Patient with Rituximab Containing Regimen. *Indian J Pediatr* 2014; 81:1092-4.
- Decker M, Rothermundt C, Hollander G, Rituximab plus CHOP for treatment of diffuse large B-cell lymphoma during second trimester of pregnancy, *Lancet Oncol* 2006; 7: 693-4.
- Kimby E, Sverrisdottir A, Elinder G, Safety of rituximab therapy during the first trimester of pregnancy, a case history. *Eur J Haematol* 2004; 72; 292-5.
- Jost LM, Kloke O, Stahel RA. ESMO Minimum Clinical Recommendations for diagnosis, treatment and follow-up of newly diagnosed large cell non-Hodgkin lymphoma, 2005, *Ann Oncol* 2005; 16:58-9.
- Kesic V, Maligne bolesti i trudnoci, Kesic V, Đurđević S eds, U Ginekološkoj Onkologiji, Udruženje za ginekološku onkologiju Srbije, Medicinski fakultet Novi Sad, 2008; 362, pogl, 18.
- Pentheroudakis G, Pavlidis N. Cancer and pregnancy: poena magna, not anymore. *Eur J Cancer*, 2006; 42: 126-140.
- Carbonick E, Iacobucci A. Use of chemotherapy during human pregnancy. *Lancet Oncol* 2004; 5: 283-91.
- Avile's A, Neri N: Hematological malignancies and pregnancy: A final report of 84 children who received chemotherapy in utero. *Clin Lymphoma* 2001; 2:173-7.

TROMBOZNE MIKROANGIOPATIJ E I INDIKACIJE ZA TERAPIJSKU IZMENU PLAZME

**Ivana Urošević^{1,2}, Bela Balint^{3,4,5}, Borivoj Sekulić^{1,2}, Ivana Milošević^{1,2}, Nebojša Rajić¹,
Ivanka Savić¹, Aleksandar Savić^{1,2}, Nada Vlaisavljević¹, Marina Dokić^{1,2}**

¹ Klinika za hematologiju, Klinički centar Vojvodina; ² Medicinski fakultet, Univerzitet u Novom Sadu;

³ Institut za transfuziologiju i hemobiologiju VMA, Beograd; ⁴ Medicinski fakultet VMA, Univerzitet odbrane, Beograd; ⁵ Institut za medicinska istraživanja, Univerzitet u Beogradu.

SAŽETAK

Trombozne mikroangiopatije (TMA) predstavljaju poseban kliničko-patološki entitet koje karakteriše mikroangiopatska hemolizna anemija (MAHA), trombocitopenija i generalizovana mikrovaskularna okluzija. Izuzetno je važno da se brzo otkriju stanja koja mogu da dovedu do nastanka TMA zbog adekvatnog terapijskog pristupa. Dokazivanje postojanja TMA predstavlja izazov za svakog lekara kliničara, jer postoji kako kliničko, tako i laboratorijsko ukrštanje u brojnim stanjima povezanih za nastankom TMA. Trombozna trombocitopenijska purpura (TTP) i hemolizno uremijski sindrom (HUS) predstavljaju najčešće spominjane entitete iz ove grupe bolesti. Iako TTP i HUS imaju slično kliničko i laboratorijsko ispoljavanje, patološki proces koji dovodi do TMA i optimalni terapijski pristup se razlikuju. Visoka stopa mortaliteta i morbiditeta udružena sa oblicima TMA dovela je do primene terapijske izmene plazme u svakodnevnoj kliničkoj praksi. Prednost i uspeh promptnog sprovođenja TIP u pojedinim oblicima TMA, dovela je do značajnog popravljavanja preživljavanja ovih bolesnika. U oblicima TMA nastale u sklopu drugih oboljenja, TIP treba da bude rezervisana za selektivne slučajeve ukoliko se očekuje korist od ove procedure.

Ključne reči: afereza, izmena plazme, trombocitopenijska purpura, hemolizno uremijski sindrom

UVOD

Trombozne mikroangiopatije (TMA) predstavljaju poseban kliničko-patološki entitet i karakteriše ih mikroangiopatska hemolizna anemija (MAHA), trombocitopenija i generalizovana mikrovaskularna okluzija (1). Izuzetno je važno da se brzo otkriju stanja koja mogu da dovedu do nastanka TMA zbog terapijskog pristupa (2,3). Dokazivanje postojanja TMA predstavlja izazov za svakog lekara kliničara, jer je prisutno kako kliničko, tako i laboratorijsko ukrštanje u brojnim stanjima povezanih za nastankom TMA. Sa druge strane, specifični laboratorijski testovi (ADAMTS 13 aktivnost i mutacija gena za alternativni put komplementa) se rade u specijalizovanim referentnim laboratorijama i za dobijanje rezultata potrebno je par dana do nekoliko nedelja. Takođe, postoje stanja koja dovode do TMA, a kod kojih se trigger koji pokreće endotelno oštećenje ne može identifikovati (4). Visoka stopa mortaliteta i morbiditeta udružena sa oblicima TMA dovela je do primene terapijske izmene plazme u svakodnevnoj kliničkoj praksi. Terapijska izmena

plazme (TIP) predstavlja skup aferezni h postupaka vezani h za eksfuziju (tj. privremeno odstranjivanje) dela bolesnikove krvi, njeno razdvajanje na komponente, otklanjanje određenog volumena plazme – koji je u fizikohemijskom pogledu patološki izmenjen i/ili u kome se nalazi specifični "patogeni supstrat" – i reinfuziju preostalog (modifikovanog) dela krvi, uz upotrebu najpogodnije nadoknadne tečnosti. U slučajevima sa TMA opravdano je izvoditi TIP svakodnevno (ili čak dva puta dnevno) do poboljšanja kliničke slike sa većim volumenom odstranjene plazme od 55 – 60 mL po kg telesne mase bolesnika (5,6). TIP je relativno sigurna procedura sa minimalnim blagim i prolaznim nuspojavama.

Opštevažeće (utvrđene i uslovne) indikacije za TIP kod kojih je izvođenje TIP opravdano, a koje je objavilo Američko udruženje za aferezne procedure klasifikovane i prikazane su u tabeli 1 (4).

Trombozna trombocitopenijska purpura

TMA nastala u sklopu trombozne trombocitopenijske purpure (TTP) je retko oboljenje sa incidencom 4 slučaja na milion stanovnika

(7). Iako TTP i HUS imaju slični kliničku i laboratorijsku prezentaciju, i često se opisuju pod „hibridnim“ nazivom TTP/HUS, patološki proces koji izaziva TMA i optimalni terapijski pristup za ova dva entiteta se razlikuju. Moschowitz je opisao prvi slučaj obolelog od TTP, 1924. godine kod šesnaestogodišnje, prethodno zdrave, devojke, koja se prezentovala anemijom, trombocitopenijom, povišenom telesnom temperaturom, neurološkim simptomima i hematurijom. Obdukcijom nalazom su ustanovljeni brojni hijalini, predominantno trombocitni, trombi u terminalnim arteriolama i kapilarima (8). Klinički se karakteriše tzv. pentadom: potrošnom trombocitopenijom, mikroangiopatskom hemoliznom anemijom (MAHA), neurološkim poremećajima, bubrežnim oštećenjem i povišenom telesnom temperaturom. U poslednje vreme, kriterijumi za postavljanje dijagnoze TTP su revidirani i dovoljno je postojanje trombocitopenije i MAHA za postavljanje pomenute dijagnoze. Više od 60% bolesnika ima neurološku simptomatologiju, dok bubrežno oštećenje nije dominantni nalaz. Iskustva Klinike za hematologiju, Kliničkog centra Vojvodine ukazuju da su, pored trombocitopenije i MAHA, svi bolesnici sa postavljenom dijagnozom TTP (12 bolesnika za period 2008-2014. godine) imali neurološku simptomatologiju (glavobolja 65% slučajeva, konfuznost, agitiranost, TIA i IVC u 25%, sopor u 16,7% i EPI napad 8,7% slučajeva). Povišena temperatura je bila prisutna kod polovine bolesnika, a tegobe od strane gastrointestinalnog sistema je imalo 42% bolesnika (9).

Patogeneza TTP

Von Willebrand faktor (vWF), multimerni glikoprotein različite molekulske mase 540-20000 kDa, predstavlja esencijalni medijator u primarnoj hemostazi. Multimere vWF se sintetiše u megakariocitima i endotelnim ćelijama, a nalaze se uskladišteni u alfa granulama trombocita i endotelnim ćelijama (Weibel-Palade telašca). Dužina vWF je kontrolisana enzimom ADAMTS13, koji razgrađuje multimere vWF u manje fragmente koji imaju redukovani trombogeni potencijal. ADAMTS13, metaloproteaza, je član cink i kalcijum zavisnih proteaza, čiji se gen nalazi na hromozomu 9q34 i dominantno se sintetiše u jetri. Primarna uloga ovog enzima je da sprečava prisustvo multimer

vWF u cirkulaciji i njihova razgradnja na poziciji 842-843 (između tirozina i metionina). Teški deficit aktivnosti ADAMTS13 enzima predstavlja uzrok i kongenitalnog i stečenog oblika TTP. Kongenitalni oblik TTP (Upshaw-Schulman sindrom) čini oko 5% svih TTP formi i nastaje zbog mutacije u genu za ADAMTS13 enzim, što vodi ka perzistiranju niskog nivoa ili aktivnosti ovog enzima (10). Stečeni TTP je prototip autoimunog oboljenja, gde se stvaraju autoantitela na ADAMTS 13. U odsustvu ovog enzima, ultravelike vWF multimere se akumuliraju u plazmi, aktiviraju trombocite za formiranje trombocitnih tromba u mikrocirkulaciji, što vodi ka nastanku MAHA, trombocitopenije i ishemije tkiva (11,12).

Generalno, dijagnoza TTP može se postaviti na osnovu niske aktivnosti enzima ADAMTS13 u plazmi (manje od 10%). Esej za određivanje aktivnosti enzima ADAMTS13 se može iskoristiti za razlikovanje TTP od HUS, jer nivo aktivnosti manji od 5% predstavlja 90% specifičnost za postavljanje dijagnoze TTP (11,12). Većina pacijenata sa TTP ima i detektabilna antitela na pomenuti enzim. Tokom epizoda stečenog oblika TTP ili relapsa bolesti, pacijenti obično imaju nedetektabilnu ili smanjenu plazmatsku vrednost ADAMTS13. Vrednost aktivnosti ovog enzima može se popraviti u fazi oporavka bolesti. Klasa autoantitela, koja dovode do smanjenja aktivnosti ADAMTS13, su IgG i otkrivaju se u 40-80% ovih bolesnika. Prisustvo antitela za mesto vezivanja ADAMTS 13 na površini endotelne ćelije takođe može da uzrokuje TTP kod pacijenata sa normalnom aktivnošću ADAMTS13 u plazmi. To su antitela protiv glikoproteina IV (CD36), koji predstavlja trombospondinski receptor (13). Diskretno smanjena aktivnost ADAMT13 se može naći i u drugim stanjima i bolestima, kao npr: jetrene bolesti, metastazama malignih bolesti, hroničnim metaboličkim i inflamatornim stanjima, trudnoći itd.

Lečenje TTP terapijskom izmenom plazme

Zbog visokog stepena mortaliteta vezanog za TTP, započinjanje TIP treba inicirati pre laboratorijske potvrde bolesti. Vodič Američkog udruženja za afereze, TIP svrstava u kategoriju I indikacija kod bolesnika sa TTP (tabela 1)(4). Svakodnevno sprovođenje TIP do normalizaci-

je vrednosti trombocita predstavlja standardni tretman lečenja TTP, što rezultuje smanjenju stope mortaliteta sa 90% na 10-20% (14). Tokom izmene, prosečno se procesira 1-1,5 volumena plazme uz supstituciju sveže smrznutom plazmom ili krioprecipitatom. Benefit TIP je dvostruk, prvo dolazi do otklanjanja antitela na ADAMTS13 i druga korist je infundovanje egzogenog ADAMTS13 enzima donorskom plazmom.

Iskustvo našeg centra je da kod 12 bolesnika dijagnostikovanih u periodu od 2008-2012. godine, prosečno vreme od početka tegoba do započinjanja TIP je bilo 8,5 dana (medijana 7 dana, u rasponu od 3 do 22 dana - bolesnica inicijalno hospitalizovana u regionalnoj bolnici). Po prijemu na Kliniku za hematologiju, TIP je započinjana u roku od 24 h kod bolesnika koji su inicijalno hospitalizovani na našoj Klinici, odnosno od 3. do 14. dana hospitalizacije u slučaju premeštaja iz regionalnih bolnica. Prosečan broj sprovedenih terapijskih izmena plazme u prvom ataku bolesti je 9,3 dana (medijana 8 dana, u rasponu od 4 do 21 TIP). U posmatranom periodu ukupno je urađeno 169 terapijskih izmena plazme, prosečno 8,6 TIP po ataku (medijana 8 TIP).

Kompletni odgovor je postignut u 91% slučajeva, dok kod jedne mlade bolesnice sa idiopatskim TTP nije dolazilo do korekcije trombocitopenije i pored svakodnevnih TIP i primene kortikosteroidne terapije, a tok bolesti se komplikovao epi napadom i infarktom miokarda, koji je doveo do smrtnog ishoda (6,3%). Kod dve bolesnice (16,7%) je zabeležen

hronični, relapsirajući, oblik idiopatskog TTP (9).

Pacijenti sa kongenitalnim oblikom TTP ne zahtevaju TIP, jer kod ovih bolesnika ne postoje antitela na ADAMTS13, već se kod ovih bolesnika infunduje donorska plazma u određenim vremenskim intervalima u cilju nadoknade ADAMTS13 enzima.

Hemolizno-uremijski sindrom

HUS spada u grupu TMA i karakteriše se postojanjem MAHA, trombocitopenije i akutne bubrežne insuficijencije. Najčešći uzrok HUS je infekcija sa Shiga-like toksinom produkujućim bakterijama, *E.coli* O157:H7. U ovom slučaju, tipični HUS se javlja 2-10 dana nakon pojave krvavih dijareja. Incidenca tipičnog HUS je 2 slučaja na 100 000 adultne populacije i 6,1 na 100000 dece mlađe od 5 godina (15). Oko 50% slučajeva sa tipičnim oblikom HUS zahteva dijaliznu proceduru, a oko 25% slučajeva imaju simptomatologiju vezanu za CNS (15). Primarna razlika TTP u odnosu na HUS je postojanje akutne bubrežne insuficijencije u slučajevima HUS. Retka forma HUS je povezana sa infekcijama izazvanih *Streptococcusom pneumoniae*, koji produkuje neurominidazu (p-HUS) i javlja se kod dece mlađe od 2 godine sa mortalitetom od 25% (4). U slučajevima tipičnog HUS, TIP nije indicirana i prema Američkom udruženju za afereze, indikacija za ovu proceduru spada u IV kategoriju (tabela 1)(4).

Tabela 1.

Indikacije za TIP preporučene od strane Američkog udruženja za aferezne procedure

	Kategorija	Gradus
Terapijska izmena plazme je/može biti indikovana		
TTP	I	1A
HUS		
Udružena sa Streptococcus pneumoniae	III	2C
Atipični HUS		
Faktor H antitela	I	2C
Mutacije gena za komplement	II	2C
Lekovima indukovana TMA		
Tiklodipin	I	2B
Clopidrogel	III	1B
Ciklosporin/takrolimus	III	2C
Transplantacijom udružena TMA	III	2C
Terapijska izmena plazme NIJE indikovana		
HUS		
Uzrokovana Shiga toksin produkujućim bakterijama	IV	1C
Atipični HUS		
Mutacija za membranski kofaktor protein	V	1C
Lekovima uzrokovana TMA		
Gemcitabin	IV	2C
Kinin	IV	2C

U slučajevima sa p-HUS, TIP može biti od koristi jer omogućava otklanjanje anti-T antitela i bakterijsku neraminidazu. Za razliku od TIP u drugim indikacijama, u slučaju sprovođenja TIP za p-HUS, preporučuje se 5% albumin, jer plazma sadrži anti T-antitela, što može da dovede do egzacerbacije procesa (4,16).

Atipični HUS

U osnovi atipičnog hemolizno uremijskog sindroma (aHUS) su genetske mutacije za faktore koji učestvuju u regulaciji alternativnog puta komplementa. To su mutacije gena koji kodiraju regulatore komplementa (faktor H, faktor I, membranski kofaktor protein i trombomodulin), aktivatore komplementa (faktor B i C3) i autoantitela na faktor H (17,18). Kao posledica ovih genetskih poremećaja, nastaje preterana aktivacija alternativnog puta komplementa, sa sledstvenim formiranjem MAC kompleksa (membrane attack complex), koji uzrokuje oštećenje membrane endotelnih ćelija, što vodi ka aktivaciji trombocita i mikrovaskularne tromboze (17). aHUS čini približno 10% slučajeva HUS sa

godišnjom incidencom 2 slučaja kod odraslih na milion stanovnika i 3,3 slučaja na milion dece mlađih od 18 godina (19). Većina pacijenata sa aHUS se klinički prezentuje sa postojanjem trijade: MAHA, trombocitopenija i bubrežna insuficijencija, dok je u manjem broju slučajeva prisutna blaga i fluktuirajuća anemija i/ili trombocitopenija bez postojanja bubrežne insuficijencije. aHUS je udružen sa značajnim postojanjem morbiditeta i mortaliteta: 65% pacijenata ima terminalni stadijum bubrežne insuficijencije ili umire unutar godinu dana od postavljanja dijagnoze. Genetski ili stečeni deficiti koji vode ka nekontrolisanoj aktivaciji alternativnog puta komplementa se otkrivaju u oko 60% slučajeva aHUS (20).

Patogeneza i dijagnoza aHUS

Ćelije endotela glomerula su vulnerabilne na disregulaciju komplementa zbog čega je klinička prezentacija sa postojanjem TMA primarno ispoljena u bubrežima (19). Postoji više od 120 identifikovanih mutacija gena za proteine alternativnog puta komplementa (4). Komplement faktor H (CFH) je jedan od bitnijih

faktora u alternativnom putu i mutacije gena za ovaj faktor vode ka gubitku ili deficitu njegove funkcije. Stečeni deficit CFH uzrokovan je postojanjem anti-CFH antitela (17,20). Gubitak funkcije zbog mutacije gena takođe je dokazan za komplement faktor I (I), mebranski kofaktor protein (MCP), komplement faktor B (CFB) i komponentu komplementa 3 (C3) (17). Trigger za nastanak aHUS može biti bilo koji precipitirajući faktor kod genetski vulnerabilnih osoba (respiratorne ili gastrointestinalne infekcije su prisutne u oko 50% slučajeva) (20). Interesanto je da su mutacije gena za komplement nađene i kod pacijenata sa drugim oblicima TMA, uključujući i p-HUS i preeklampsiju (4,21).

Dijagnoza aHUS podrazumeva određivanje serumskog nivoa C3, C4, CFH i CFI, ali i postojanje anti-CFH antitela. Iako je vrednost C3 snižena kod bolesnika sa defektom puta komplementa, njegove normalne vrednosti ne isključuju dijagnozu aHUS (22). Deficit MCP može se dokazati primenom fluorescentog-aktivisanog ćelijskog sortera za analizu mononuklearnih ćelija (4).

Specijalizovane referentne laboratorije mogu da detektuju mutacije gena za komponente komplementa. Laboratorijske vrednosti hemoglobina, trombocita, LDH, kreatinina ne moraju abnormalno odstupati od referentnih vrednosti. ADAMTS 13 aktivnost je normalna u slučajevima aHUS.

Primena TIP u aHUS bazirana je na racionalnom pristupu mogućeg uklanjanja defektnih proteina komplementa i autoantitela na CFH. Vodič Američkog udruženja za aferezne

procedure ukazuje da je indikacija za TIP u prvom redu kod bolesnika sa potvrđenim anti-CFH antitelima (kategorija I, gradus 2c) i druga terapijska linija za postojanje mutacija na druge komponente komplementa (kategorija II, gradus 2c) (tabela 1)(4). U slučajevima postojanja mutacije za MCP, TIP nije indikovana, jer je pomenuti protein vezan za ćelijsku membranu i ne nalazi se u cirkulišućoj plazmi (kategorija IV). (tabela1).

Odgovor na TIP kod bolesnika sa aHUS je sličan u situacijama sa ili bez identifikovane mutacije komplementa i zbog toga TIP treba započeti rano, svakodnevno do kliničkog ili laboratorijskog poboljšanja. Hematološka remisija kod bolesnika sa aHUS je definisana normalizacijom vrednosti trombocita u trajanju dužem od 14 dana, kao i nepostojanjem laboratorijskih parametara hemolize. Lečenje Eculizumabom, humanizovanim monoklonskim antitelom na komponentu komplementa C5 dozvoljeno je od strane FDA u Americi (4).

TIP za sekundarne TMA u sklopu drugih oboljenja

TMA se može biti povezana sa drugim oboljenjima (tabela 2), koja dovode do endotelnog oštećenja u mikrocirkulaciji različitim mehanizmima. Otklanjanjem trigera za nastanak TMA u ovim situacijama, predstavlja ključ lečenja ovih oblika TMA, i primena TIP bi trebala da bude strogo selektivna i samo u onim situacijama gde se očekuje da postoji benefit primenom ove procedure.

Tabela 2.

Stanja povezana sa nastankom TMA

Autoimune bolesti

- Katastrofični antifosfolipidni sindrom
- Sistemički lupus eritematosus
- Skleroderma
- Vaskulitis

Maligniteti

Diseminovana intravaskularna koagulacija (DIK)

HIV

Infekcije/sepsa

Maligna hipertenzija

Trudnoća

- Eklampsija
- HELLP sindrom

ZAKLJUČAK

Napredak u razumevanju etiopatogeneze TTP i aHUS je značajno poboljšalo ishod ovih bolesnika, kako u osavremenjavanju dijagnostičkih procedura, tako i racionalno dizajniranom terapijskom pristupu. Prednost i uspeh promptnog sprovođenja TIP u pojedinim oblicima TMA, dovela je do značajnog popravljavanja preživljavanja ovih bolesnika. U oblicima TMA nastale u sklopu drugih oboljenja, TIP treba da bude rezervisana za selektivne slučajeve ukoliko se očekuje korist od ove procedure.

LITERATURA

- Motto D. Endothelial cells and thrombotic microangiopathy. *Semin nephrol* 2012;32(2):208-14.
- Scully M., Hunt BJ., Benjamin S et al. Guidelines on the diagnosis and management of thrombotic thrombocytopenic purpura and other thrombotic microangiopathies. *Br J Haematol.* 2012;158(3): 3213-35.
- George JN and Charania RS. Evaluation of patients with microangiopathic hemolytic anemia and thrombocytopenia. *Semin Thromb Hemost.* 2013; 39(2): 153-160.
- Adamski J. Thrombotic microangiopathy and indications for therapeutic plasma exchange. *Hematology 2014 education book*: 444-9.
- Williams ME, Balogun RA. Principles of separation: indications and therapeutic targets for plasma exchange. *Clin J Am Soc Nephrol* 2014; 9: 181-90.
- Balint B, Jovičić A, Taseski J, Malešević M, Mitrović D. Primena afereznih procedura u lečenju bolesnika sa hemobiološkim poremećajima. *Vojnosanit Pregl* 1999; 56: 45-55.
- Terrell DR., Williams LA., Vesely SK et al. The incidence of thrombotic-thrombocytopenic purpura-hemolytic uremic syndrome: all patients, idiopathic patients and patients with severe ADAMTS13 deficiency. *J Thromb Haemost* 2005;3(7):1432-6.
- Moschowitz E. An acute febrile pleiochromic anemia with hyaline thrombosis of the terminal arteriole and capillaries. *Arch Intern Med* 1925; 36:89-93.
- Sekulić B. Subspecijalistički rad 2014.
- Levy GG., Nichols WC., Lian EC et al. Mutations in a member of the ADAMTS gene family cause thrombotic thrombocytopenic purpura. *Nature* 2001;413(6855):488-94.
- Furlan M., Robles R., Galbusera M et al. Von Willebrand factor-cleaving protease in thrombotic thrombocytopenic purpura and the hemolytic-uremic syndrome. *N Engl J Med* 1998;339(22):1578-84.
- Tsai HM, Lian EC. Antibodies to von Willebrand factor-cleaving protease in acute thrombotic thrombocytopenic purpura. *N Engl J Med* 1998;339:1585-94.
- Moake JL. Thrombotic microangiopathies. *N Engl J Med* 2002; 347(8):589-600.
- Levy GG., Motto DG., Ginsburg D. ADAMTS13 turns 3. *Blood* 2005;106(1):11-7.
- Menne J., Nitschenke M., Stengele R et al. Validation of treatment strategies for enterohaemorrhagic E.coli 0104:H4 induced haemolytic uraemic syndrome: case control study. *BMJ* 2012;345:e4565.
- Schwartz J., Winters JL., Padmanabhan A et al. Guidelines on the use of therapeutic apheresis in clinical practice-evidence based approach from the Writing Committee of the American Society for Apheresis: the sixth special issue. *J Clin Apher* 2013;28(3):145-284.
- Kavanagh D and Goodship T. Atypical hemolytic uremic syndrome, genetic basis and clinical manifestations. *Hematology education book* 2011; 15-20.
- Fang C., Fremeaux-Bacchi V., Liszewski K et al. Membrane cofactor protein mutations in aHUS, fatal Stx-HUS, C3 glomerulonephritis and the HELLP syndrome. *Blood* 2008;111:624-32.
- Mele C., Remuzzi G., Noris M. Haemolytic uraemic syndrome. *Semin Immunopathol* in press.
- Noris M., Caprioli J., Bresin E et al. Relative role of genetic complement abnormalities in sporadic and familial aHUS and their impact on clinical phenotype. *Clin J Am Soc Nephrol.* 2010;5(10):1844-59.
- Szilagyi A., Kiss N., Bereczki C et al. The role of complement in Streptococcus pneumoniae-associated hemolytic uremic syndrome. *Nephrol Dial Transplant* 2013;28(9):2237-45.
- Kavanagh D., Richards A., Fremeaux-Bacchi V et al. Screening for complement system abnormalities in patients with atypical haemolytic uraemic syndrome. *Clin J Am Soc Nephrol* 2007;2(3):591-6.



INOVATIVNO ZBRINJAVANJE TRUDNICE SA HIPERLIPIDEMIJOM UPOTREBOM APARATURE ZA SPAŠAVANJE KRV I – PRIKAZ SLUČAJA

Marija Vraneš¹, Gordana Ostojić^{2,3}, Zvezdana Lojpur¹, Bela Balint^{2,3,4}

¹Klinički Centar Kragujevac; ²Institut za transfuziologiju i hemobiologiju VMA;

³Medicinski fakultet VMA, Univerzitet odbrane, Beograd;

⁴Institut za medicinska istraživanja, Univerzitet u Beogradu;

SAŽETAK

Uvod: Hiperlipidemija spada u dislipidemije sa povišenim vrednostima holesterola i/ili triglicerida sa niskim vrednostima HDL (high density lipoproteins) u plazmi. Primarni uzrok je pojedinačna ili multipla genska mutacija.

Cilj rada: je da se prikaže nekonvencionalna upotreba aparata za intraoperativno spašavanje krvi za smanjenje vrednosti lipida pri urgentnom zbrinjavanju porodilje.

Materijal i metodi: Koristili smo aparat za intraoperativno spašavanje krvi (Haemonetics cell saver), procesirali 2500 mL krvi, odstranili 1300 mL hlozne plazme, a infundovali 1200 mL opranih eritrocita i 300 mL sveže zamrznute plazme (SZP), 2000 mL kristaloidnih rastvora i 100 mL 20% rastvora albumina.

Prikaz slučaja: trudnica L.R. starosti 33 godine, sa dijagnozama - Graviditas ml VIII, Diabetes mellitus typ II, Ketoacidosis, Hypertrigliceridaemia, HLP typ IIb, St. post pancreatitidem aa, Struma nodosa gl. thyreoideae, nakon operativnog završetka trudnoće zapada u teško, životno ugrožavajuće stanje. S obzirom da se radilo o životno ugroženoj, hemodinamski nestabilnoj bolesnici, konzilijarno je doneta odluka da se pokuša sa modifikovanom metodom autologne transfuzije krvi pomoću aparata za intraoperativno spašavanje krvi. Procedura je trajala četiri sata, nakon koje su kontrolni laboratorijski nalazi pokazivali smanjenje početnih vrednosti lipida za oko 50%.

Zaključak: primena ovakve iznuđene procedure, u hitnim slučajevima, gde ne postoje standardne operativne procedure, kao ni odgovarajuća aparatura, može biti opravdana u cilju spasavanja života bolesnika.

Ključne reči: hiperlipidemija, deplecija plazmatskih lipida, afereza, cell saver.

Uvod i opšti pristupi lečenju

Hiperlipidemija spada u dislipidemije i označava povišene vrednosti holesterola i/ili triglicerida sa niskim vrednostima HDL (High Density Lipoproteins) u plazmi, što doprinosi bržem nastanku ateroskleroze. Osnovna klasifikacija dislipidemija deli ih na primarne i sekundarne, a pojedine karakteriše porast samo holesterola (izolovana hiperlipidemija), samo triglicerida (izolovana hipertrigliceridemija) ili porast vrednosti i jedne i druge komponente (kombinovana hiperlipidemija). Primarni uzrok je pojedinačna ili multipla genska mutacija što rezultira povećanim stvaranjem ili smanjenim razlaganjem triglicerida i LDL (Low Density Lipoproteins) holesterola kao i povećanom produkcijom ili defektnim razlaga-

njem HDL (1–3). Sekundarni uzroci doprinose pojavi dislipidemije kod starijih. Najznačajniji razlozi su stil života bez fizičke aktivnosti sa prekomernim unosom zasićenih masti, holesterola i polu-nezasićenih masnih kiselina. Ostali česti sekundarni uzroci su diabetes melitus, prekomerna upotreba alkohola, hronična bubrežna insuficijencija, hipotiroidizam, primarna bilijarna ciroza kao i konzumiranje nekih lekova (tiazidi, β -bloktori, estrogen, glukokortikoidi).

Hiperlipidemija je sama za sebe asimptomatska, ali može da vodi simptomatskim vaskularnim oboljenjima, uključujući koronarnu i bolest perifernih arterija. Visoke vrednosti triglicerida mogu izazvati akutni pankreatitis (1–7).

Metabolički sindrom je kombinacija povišenog krvnog pritiska, povišenog nivoa šećera u krvi, povećane količine masnih naslaga u predelu struka, niskog nivoa HDL holesterola i visokog nivoa triglicerida u krvi. Ovaj sindrom povećava šanse za nastanak srčanih oboljenja, dijabetesa i moždanog udara (3–7).

Dijagnoza se postavlja merenjem serumskih lipida. Rutinske provjere (lipidni status) uključuje totalni holesterol, trigliceride, LDL i

HDL. Povišenim se smatraju vrednosti za totalni holesterol > 6.20 mmol/L, za trigliceride > 2.30 mmol/L i za LDL holesterol > 4.11 mmol/L. Patološkim se smatraju vrednosti van 1.03-1.55 mmol/L za HDL.

Lečenje je indikovano kod svih bolesnika i cilj terapije je smanjenje povećanih vrednosti triglicerida, LDL i normalizovanje HDL (tabela 1).

Tabela 1.

Lipidski status u odraslih osoba sa poželjnim i rizičnim vrednostima

Parametar	Poželjno	Granično povišen rizik	Visoko rizično
Ukupni holesterol:	do 5,20	5,20–6,19	$\geq 6,20$
Trigliceridi:	do 1,70	1,70–2,29	$\geq 2,30$
HDL-holesterol:	$\geq 1,60$	1,00–1,60	$\leq 1,00$
LDL-holesterol:	do 3,40	3,40–4,10	$\geq 4,10$
„Non“-HDL-holesterol:	do 3,40	3,40–4,10	$\geq 4,90$

Tretman podrazumeva promenu režima života uključujući dijetu sa smanjenim unosom zasićenih masti, kao i primenu lipostatina - lekova izbora, čije se dejstvo bazira na inhibiciji hidroxymethylglutaryl CoA reduktaze (1–3).

Lipidski poremećaji sa istovremenim porastom i holesterola i triglicerida mogu biti terapijski problem. Takvi poremećaji su česti u sekundarnim lipidnim poremećajima (dijabetes, renalna insuficijencija i sl.), a kao primarni poremećaji u porodičnoj kombinovanoj hiperlipoproteinemiji i u dosta retkoj porodičnoj disbetilipoproteinemiji. Kod kombinovanih lipidnih poremećaja mogu se primenjivati različiti hipolipemici kao monoterapija, ali je najčešće potrebna i kombinovana terapija. Pokušaj uspostavljen veza između gojaznosti, lipidnog statusa, povišenog krvnog pritiska i vrednosti glukoze u plazmi, je u nastojanju da se utvrdi njihova povezanost sa insulinskom rezistencijom (3).

Cilj rada bio je da se prikaže nekonvencionalna upotreba aparata za intraoperativno spasavanje krvi za smanjenje vrednosti triglicerida i holesterola porodilje. Korišćen je aparat za intraoperativno spasavanje krvi (Cell saver; Haemonetics, USA). Procedura je trajala oko četiri sata i pri tome je porodici eksfundovano 2500 mL krvi i reinfundovano 1200 mL ispranih autologih eritrocita, uz nadoknadu plazme sa 20% rastvorom albumina u kombinaciji sa fiziološkim rastvorom NaCl i svežom zamrznutom plazmom (ZSP).

Prikaz slučaja

Trudnica L.R. starosti 33 godine, sa dijagnozama – Graviditas (VIII lunarni mesec), Diabetes mellitus (type II), Ketoacidosis, Hypertrigliceridaemia, HLP (type IIb), St. post pancreatitidem, Struma nodosa glandulae thyroideae, Obesitas – upućena je iz ZC Kosovska Mitrovica u GAK Narodni front; KCS; Beograd zbog pogoršanja opšteg stanja praćenog gušenjem, mučninom, povraćanjem, bolom u grudima, radi daljeg ispitivanja i lečenja. Tokom transporta dolazi do pogoršanja opšteg stanja, te se trudnica transportuje u KC Kragujevac.

Prema anamnestičkim podacima pre godinu dana lečena zbog akutnog pankreatitisa, neposredno pred trudnoću. Do trećeg meseca uzimala Gluformin, Omakor i Holestipol. Na prijemu bolesnica svesna, orjentisana, blago dispnoična, TA 120/80 mmHG, fr 126/min, SpO2 95%, afebrilna, glikemija 23,3 mmol/L, ketonurija 3+. Inicijalno je hospitalizovana u metaboličkoj jedinici Centra za endokrinologiju, a prema nalogu ginekologa premeštena se u Porodilište. Istog dana u popodnevrim časovima urađeno je operativno završavanje trudnoće, nakon čega je porodilja sedirana, intubirana, na asistiranju mehaničkoj ventilaciji, febrilna, anurična, hemodinamski nestabilna, prevedena u stacionarni deo Urgentnog Centra. Započeta je intezivna terapija i mere reanimacije. Plasiran je CVK (centralno venski kateter), sproveden intezivan monitoring vitalnih parametara, uzete komple-

tne laboratorijske analize, kao i materijal za mikrobiološke analize. Zbog hiperlipemičnog seruma, nije bilo moguće uraditi biohemiju, hemostazni status u više navrata. (Centralna laboratorija KC Kragujevac od 2013. godine ima sertifikat od strane RIQAS (Randox International Quality Assessment Scheme) i dva puta mesečno se radi spoljašnja kontrola u Londonu, dok se unutrašnja kontrola radi tri puta dnevno). Narednog dana, u Centralnoj Laboratoriji su odstranili lipemičnu plazmu porodilje i razblažili uzorak sa 0,9% NaCl-om i došli do sledećih rezultata: holesterol 53,76 mmol/L, trigliceridi 137,97 mmol/L, leukociti $18,8 \times 10^9/L$, eritrociti $3,6 \times 10^{12}/L$, hemoglobin 122 g/L, trombociti $240 \times 10^9/L$, fibrinogen 9,5 g/L, glukoza 11,7 mmol/L, urea 2,8 mmol/L, kreatinin 84 mmol/L, lipaza 350 U/L.

Zbog izrazito lipemičnog seruma i sumnje na razvoj difuzne masne embolije, kod bolesnice je bila indikovana lipofereza, za koju u našoj ustanovi ne postoje tehničke mogućnosti, te su kontaktirane druge referentne ustanove koje u tom trenutku takođe nisu mogle da ponude rešenje za ovakvo stanje.

S obzirom da se radilo o životno ugroženoj, hemodinamski nestabilnoj bolesnici, sa ograničenim terapijskim mogućnostima, konzilijarno je doneta odluka da se pokuša sa modifikovanom metodom autologne transfuzije krvi pomoću aparata za intraoperativno spasavanje krvi (Cell saver; firme Haemonetics, USA), uz pranje eritrocita i vraćanje istih, transfuziju zamrznute sveže plazme (ZSP), kristaloidnih rastvora i 20% rastvora albumina.

Kako u našoj ustanovi nismo imali separator i setove za izvođenje procedure koja bi trebalo da se izvede po standardima, morali smo u datom trenutku da hitno i efikasno reagujemo uz maksimalnu improvizaciju onoga sa čime i raspolazemo.

Došli smo na ideju, da aparat za intraoperativno spasavanje krvi iskoristimo i pokušamo da pomoću njega smanjimo vrednosti triglicerida i holesterola, naravno uz maksimalno poštovanje procedure asepse, antiseptike. Da bi obezbedili što veću efikasnost i neophodnu sigurnost takvog inovativnog afereznog tretmana/protokola, konsultovali smo i stručnjake Odeljenja za aferezno lečenje i hemoterapiju Instituta za transfuziologiju i hemobiologiju VMA. Kako nismo imali operativno polje iz koga bismo aspirirali krv bolesnice, doneli smo odluku da na centralni venski kateter konektujemo sterilnu kesu koja služi za grudnu drenažu. Potom smo putem sterilnog šprica više puta uzimali krv sa kojim smo punili kesu, a nakon toga sa sterilnom sukcionom linijom iz te iste kese uspevali da dopremimo krv do kardiotoma, a potom nastavili sa pranjem eritrocita i ujedno odstranjivanjem lipemične plazme u više navrata.

Procesirali smo ukupno 2500 mL krvi (prvi put smo izdvojili 800 mL krvi špricima od 20 mL, sledeći put isto 800 mL, a treći put 900 mL i praktično oprali eritrocite od masnoće, te vraćali oprane eritrocite). Procedurom smo odstranili 1300 mL hlozne plazme, a infundovali 1200 mL autolognih opranih eritrocita i kao nadoknadu ukupno dali 300 mL (SZP), 2000 mL 0,9 % rastvora NaCl-a i 100 mL 20% rastvora albumina (slike 1 – 4).

Nakon odrađene improvizovane procedure, kontrolni laboratorijski nalazi su pokazivali smanjenje početnih vrednosti za oko 50% (Tabela 1). Vrednost triglicerida od 137,97 mmol/L pali su na 68,04 mmol/L, holesterola sa 53,76 mmol/L. na 31,50 mmol/L. Sledeća kontrola je pokazala još niže vrednosti, triglicerida 21,89 mmol/L, a holesterola 21, 89 mmol/L (tabela 2).

Tabela 2.

Vrednosti lipida bolesnice pre i posle tretmana, sledeća kontrola

	pre tretmana	posle tretmana	sledeća kontrola
Holesterol	53,76 mmol/L	31,50 mmol/L	21,89 mmol/L,
trigliceridi	137,97 mmol/L	68,04 mmol/L	21,89 mmol/L,

Narednih dana te su se vrednosti polako smanjivale i bolesnica je vremenom ekstubirana i respiratorno stabilna, dalja terapija je bila us-

merena na uspostavljanje adekvatne glikoregulacije i praćenja metaboličkog statusa uz upotrebu adekvatne medikamentozne terapije.

ZAKLJUČAK

Primena ove iznuđene procedure, u ovakvim hitnim slučajevima, gde ne postoje standardne operativne procedure, kao ni odgovarajuća aparatura, može biti opravdana, jer je njenom primenom došlo do poboljšanja i stabilizacije opšteg stanja bolesnice. Takođe, treba naglasiti

da je trudnica sa ovakvim dijagnozama i sa prethodnim bolestima trebala ranije biti upućena u za to nadležnu ustanovu na adekvatno i propisno zbrinjavanje. Neki od detalja same procedura mogu se videti na slikama 1 – 4.



Slike 1 – 4.

LITERATURA

1. Nacionalni vodič dobre kliničke prakse za dijagnostikovanje i lečenje lipidskih poremećaja Ministarstvo zdravlja Republike Srbije; Beograd: Agencija za akreditaciju zdravstvenih ustanova, 2012.
2. Medić Zamaklar M, Lalić K. Priručnik za dijagnostiku i lečenje lipidskih poremećaja. Reprograf Beograd, 2004.
3. Aleksandra Nikolić, Dejan Nikolić, Violeta Stanimirović. Metabolički sindrom X ili sindrom insulinske rezistencije. Vojnosanit Pregl 2007; 64(1): 45–51.
4. Al-Humoud H, Alhumoud E, Al-Hilali N. Therapeutic plasma exchange for acute hyperlipidemic pancreatitis: a case series. Ther Apher Dial. 2008 Jun;12(3):202-4.
5. Kadikoylu G¹, Yukselen V, Yavasoglu I, Coşkun A, Karaoglu AO, Bolaman Z.
6. Emergent therapy with therapeutic plasma exchange in acute recurrent pancreatitis due to severe hypertriglyceridemia. Transfus Apher Sci. 2010 Dec;43(3):285-9.
7. Koike M¹, Nitta K. Treatment of hypertriglyceridemia: plasma exchange. Nihon Rinsho. 2013 Sep;71(9):1667-9.

INTRAOSEALNA INFUZIJA KOD ODRASLIH

Milić Veljović, Ivo Udovičić, Ana Popadić, Ivana Krstić Lečić, Miodrag Stevović

Klinika za anesteziologiju i intenzivnu terapiju, Vojnomedicinska akademija, Beograd

SAŽETAK

Plasiranje intraosealne igle se koristi kao privremena mera kada se intravaskularni pristup ne može postići putem perifernog ili centralnog venskog puta. Intraosealni put obezbeđuje brz i pouzdan vaskularni pristup u hitnim slučajevima. Iako je plasiranje intraosealne igle prvobitno izvedeno u reanimaciji pedijatrijskih pacijenata, ona je prihvaćena za upotrebu i kod odraslih, pogotovo od pojave mehaničkih uređaja za plasiranje. Upotreba odgovarajuće tehnike obezbeđuje da se postupak obavlja bezbedno i efikasno.

Ključne reči: intraosealna infuzija, intraosealna igla

UVOD

Obezbeđenje vaskularnog pristupa je bitan korak u tretmanu kritično obolelih pacijenata. Periferni ili centralni intravenski pristup može biti veliki problem kod ovih pacijenata, posebno kod dece i novorođenčadi ali i kod odraslih. Periferni intravenski pristup je poseban izazov kada su nepovoljni uslovi sredine (npr, pre dolaska pacijenta u bolnici, tokom masovnih povreda ili tokom vojnih operacija)¹⁻³. Centralni intravenski pristup nosi rizik od pneumotoraksa, arterijske povrede i zahteva visok stepen stručnosti. U većini slučajeva, nije moguće izvršiti ovu proceduru u prehospitalnim uslovima¹. Plasiranje intraosealne igle daje alternativni put za vaskularni pristup u ovim okolnostima. Iako je plasiranje intraosealne igle prvobitno izvedeno u reanimaciji pedijatrijskih pacijenata, ona je prihvaćena za upotrebu i kod odraslih, pogotovo od pojave mehaničkih uređaja za plasiranje^{1,3-9}.

Najnovije smernice iz ACLS (Advanced Cardiac Life Support), objavljene 2010. godine, preporučuju intraosealni pre endotrahealnog puta za administraciju tečnosti i lekova kod odraslih pacijenata kod kojih intravaskularni pristup nije dostupan⁶. Osnovne prednosti intraosealnog puta su brzina pristupa i pouzdanost³.

Indikacije

Intraosealna infuzija je indikovana za pacijente kod kojih postoji hitna potreba za vaskularni pristup radi pružanja nadoknade tečnosti ili lekova kada konvencionalni venski pristup nije

lako dostupan. Zastoj srca, šok, trauma, opsežne opekotine, teška dehidracija i status epilepticus su mogući klinički scenariji u kojima intraosealni pristup može biti potreban². Intraosealna infuzija se uspešno koristi za situacije u kojima štetni uslovi sredine čine da se vrlo teško obezbeđuje intravenski pristup (npr, službe pretrage i spašavanja i vojne operacije)^{1,2}. Ova tehnika je takođe korisna kada centralni venski pristup nije izvodljiv zbog nedostatka bilo stručnih osoba ili nedostatka opreme (npr, u prehospitalnom uslovima)¹.

Kristaloidi, koloidi, krvni derivati i mnogi lekovi uključujući lekove koji se koriste za reanimaciju mogu se davati intraosealnom infuzijom³, i doze su iste kao i kod intravenskog pristupa⁶. Pored toga, kod kritično obolelih pacijenata, uzorak se može izvući iz intraosealnog prostora za laboratorijska ispitivanja (npr, određivanje krvne grupe, merenje nivoa hemoglobina, hemijske analize u serumu i analizu gasova u krvi).

Uzorak za analizu gasova u krvi iz intraosealnog pristupa predstavlja srednji nivo između arterijske i venske vrednosti¹⁰. Neka neslaganja između intraosealnog i venskog uzorka su pronađena kod alkalne fosfataze, laktat dehidrogenaze i nivoa hemoglobina.

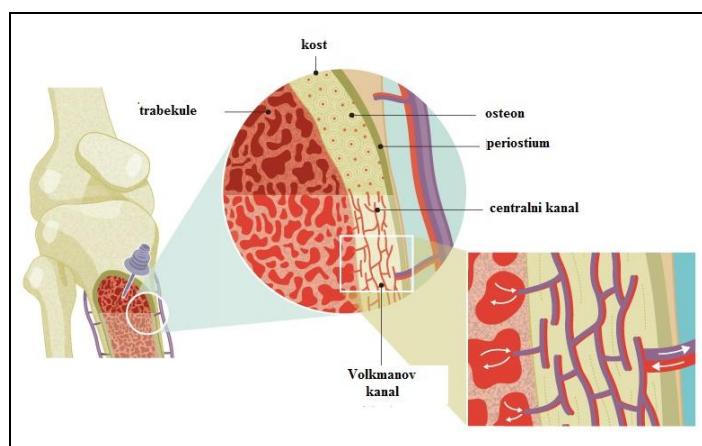
Kontraindikacije

Pošto se intraosealno plasiranje koristi samo u hitnim slučajevima, postoji nekoliko kontraindikacija za plasman. Kontraindikacije su ipsilateralni prelomi, prethodni pokušaji na istoj

strani, lokalne vaskularne povrede, celulitisi i opekotine^{2,3}. Ipsilateralni prelomi ili prethodni pokušaji za intraosealni pristup mogu dovesti do ekstrasvazacije tečnosti i kompartment sindroma tako da ih treba izbegavati^{2,3}. Intraosealnu infuziju treba izbegavati kod pacijenata sa visokim rizikom za prelome (npr, pacijenti sa osteogenezis imperfekta, teškom osteoporozom ili koagulopatijama)².

Anatomija

Koštana srž je veoma vaskularizovana struktura koja funkcioniše kao nekolapsibilna vena sposobna prihvatiti veliki volumen tečnosti i lekova i brzo ih dostavljanja centralnoj cirkulaciji (Slika 1.). Venski sinusoidi u kostima se dreniraju u centralnu venu u kanalu. Volumen infuzije je ograničena veličinom medularne šupljine i prečnikom intraosealne igle.



Slika 1. Anatomija koštane srži

Izbor mesta uboda

Brojna su mesta koja se mogu koristiti za plasiranje intraosealne igle kod odraslih. To su proksimalna tibija, distalna tibija, humerus, distalna butna kost, grudna kost, petne kosti i stiloidni nastavak na radijusu¹⁻³. Kada se koristi mehanički uređaj za plasiranje, anteromedijalna površina proksimalne tibije je mesto koje se lako može locirati, predstavlja ravnu površinu i širok prostor za plasiranje i ima minimalne subkutane slojeve koje se nalazi iznad kosti³. Pored toga, ovo mesto je korisno jer je udaljeno od grudi pacijenta i time predstavljaju minimalnu smetnju za kardiopulmonalnu reanimaciju. Ako nije moguće plasirati intraosealnu iglu kroz proksimalnu tibiju, humeralna glava i distalna tibija su alternativna mesta. Ukoliko se intraosealna igla ručno plasira, medijalni prostor distalne tibije je mesto za plasiranje kod odraslih pacijenata zbog tanke koštane kore i potkožnog tkiva². Velika sila i velika rupa je potrebna da se ručno prodre u kost. Grudna kost je drugo alternativno mesto³. Poseban mehanički sistem za intraosealno plasiranje

olakšava plasiranje igle sa minimalnim rizikom od perforacije ili infekcije medijastinalnih struktura. Iako tanki korteks čini ovo mesto za najlakše ručno plasiranje igle kod odraslih, mali rizik od perforacije medijastinalnih struktura ga ne favorizuje. Dodatne prepreke za upotrebu ovog mesta uključuje rizik od pomeranja igle i ometanje tokom kardiopulmonalne reanimacije.

Priprema za mehaničko plasiranje

Sledeće stavke treba spojiti u pripremi za plasiranje: hlorheksidin ili jodni rastvor za pripremu terena, sterilne rukavice, sterilne komprese, komplet za mehaničko plasiranje, špric za aspiraciju i infiltraciju, rastvor 1% lidokaina za analgeziju ukoliko je pacijent svestan, standardna Luer - Lok cev za davanje tečnosti ili lekova, kesa pod pritiskom ako treba davati velike količine tečnosti. Mehanički uređaji za intraosealno plasiranje su: FAST-1 Intraosealni infuzioni sistem (Pyng Medical) za sternalni intraosealni pristup, EZ-IO bušilica (Vidacare) (Slika. 2), pištolj za plasiranje (Vaismed)⁹.



Slika 2. Bušilica za intraosealno plasiranje igle

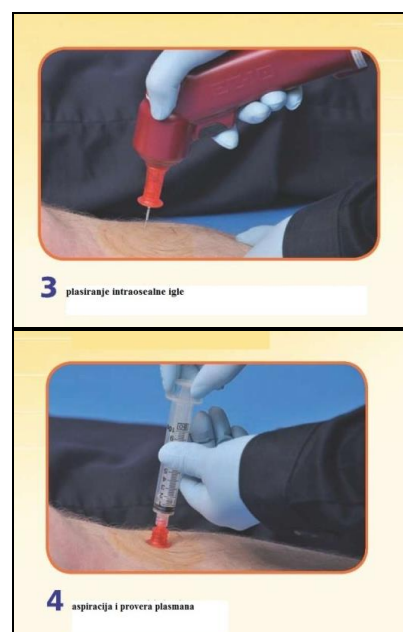
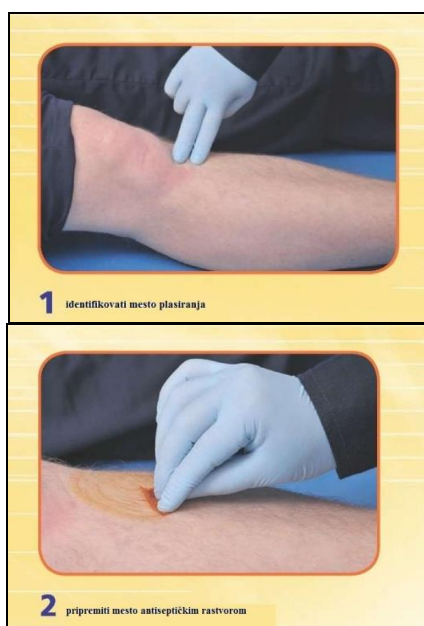
Intraosealno plasiranje sa mehaničkim uređajima

Obezbeđenje intraosealnog pristupa je hitna procedura. Zbog toga je retko moguće dobiti pristanak pacijenta pre izvođenja postupka. Ako je moguće, objasniti rizike i koristi od postupka pacijentu ili rodbini. Kada se koristi mehanički uređaj, proksimalna tibija je poželjano mesto kod odraslih. Alternativna mesta su distalna potkolenica i glava nadlaktice. Postavite nogu pacijenta u blagoj fleksiji postavljanjem smotuljka ispod kolena. Očistite mesto sa hlorheksidina ili jodnim rastvorom, a zatim pokriti mesto uz poštovanje principa

asepse. Ako je pacijent pri svesti, infiltrirati lokalni anestetik u kožu i potkožnom tkivu iznad periosta sa 1% lidokainom.

Identifikovati tuberozitas tibije. Željeno mesto za plasiranje je ravna površina unutaršnje strane tibije, medijalno širinom jednog prsta od tuberozitas tibije (Slika 3.). Fiksirajte nogu sa svojom nedominantnom rukom.

Držati bušilicu u vašoj dominantnoj ruci, postavite igle pod uglom od 90 stepeni na površinu kosti. Pritiskom na obarač nežno voditi iglu kroz tkiva, izbegavajući veliki pritisk. Iznenadni gubitak otpora pokazuje da igla prodrla korteks i dostigla među larnu šupljinu.



Slika 3. Mehaničko plasiranje intraosealne igle

Priključite iglu sa špricom od 10 ml sa standardom Luer - Lok cevi.

Ako je igla pravilno postavljena u srži šupljine, treba da stoji uspravno bez podrške. Aspiracija krvi iz srži potvrđuje adekvatno postavljanje igle, ali to nije uvek moguće, čak i sa adekvatnim plasmanom. Dobijne potvrde postiže se plasmanom infuzije bolusa 10ml slanog rastvora, tečnost treba lako teći, bez otpora. Ako tečnost ne teče, izaberati neko drugo mesto za plasiranje.

Nakon uspešne potvrde plasiranja, intraosealna igla može biti povezan sa sistemom za infuziju. Tečnost može biti ubrizgana pomoću gravitacije, ali infuzija tečnosti pritiskom daje bolji protok. Ako je pacijent svestan, anestezirati koštanu šupljinu infuzijom 20 do 40 mg 1% lidokaina pre započinjanja infuzije. Pažljivo pratiti infuziju tečnosti zbog moguće ekstrasvazacije. Igla i sistem treba da budu osigurani sa flasterom, a noga treba da bude imobilisan da spreči pomeranje igle.

Kod uklanjanja igle, isključiti infuzioni sistem i postaviti sterilni špric na iglu. Fiksirati nogu, i nežno povucite špric unazad rotirajući iglu u smeru kazaljke na satu.

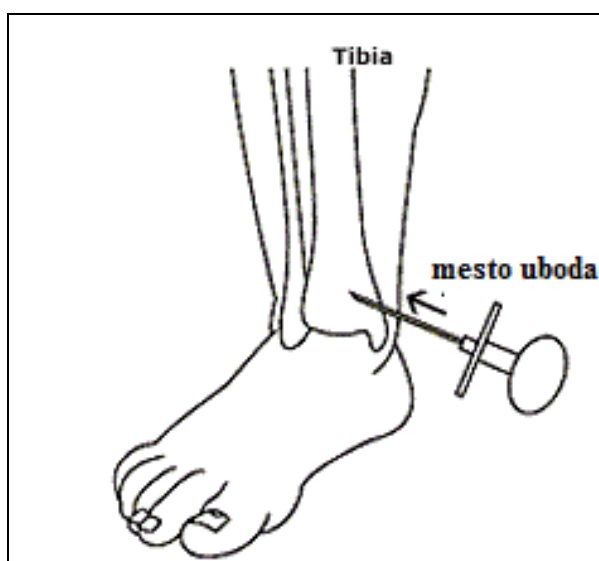
Priprema za ručno plasiranje

Sledeće stavke treba spojiti u pripremi za plasiranje: hlorheksidin ili jodni rastvor za pripremu terena, sterilne rukavice, sterilne komprese,

komplet za mehaničko plasiranje, špric za aspiraciju i infiltraciju, rastvor 1% lidokaina za analgeziju ukoliko je pacijent svestan, standardna Luer - Lok cev za davanje tečnosti ili lekova, kesa pod pritiskom ako treba davati velike količine tečnosti. Nekoliko različitih tipova igala mogu se koristiti pri ručnom intraosealnom plasiranju. Sve one imaju zajedničko prisustvo stileta, što povećava verovatnoću za kortikalnu penetraciju i sprečava zapušanje igle delovima kostiju tokom plasiranja¹². Igle se kreću u veličini od 13G do 20G i imaju promenljivu dužinu².

Ručno plasiranje intraosealne igle

Poželjna lokacija za ručno intraosealno postavljanje kod odraslih je medijalna strana distalne tibije, malo iznad medijalnog maleolusa (Slika 4.). Postavite nogu, tako da se blago savije i eksterno rotira na kuku. Kako je ranije opisano za mehaničko plasiranje, koristite sterilnu tehniku i odgovarajuću analgeziju. Fiksirajte nogu sa nedominantnom rukom. Držite iglu na dlanu dominantnom rukom i pod uglom od 90 stepeni plasirati u kost. Nagli gubitak otpora ukazuje da igla je prodršla korteks i stigla do medularne šupljine. Uklonite stilet i spojite iglu sa špricom. Dobijanje potvrde postiže se plasmanom infuzije bolusa 10ml slanog rastvora, tečnost treba lako teći, bez otpora.



Slika 4. Mesto plasiranja intraosealne igle

Komplikacije

Komplikacije mogu nastati u toku postupka ili čak nakon uspešnog plasmana intraosealne igle⁴. Najčešća komplikacija od intraosealnog plasiranja igle je ekstravazacija tečnosti kao rezultat nepotpunog plasiranja igle. Ako se ekstravazacija dogodi, iglu treba ukloniti i treba primeniti pritisak na mesto. Kompartment sindrom je retka ali moguća komplikacija ekstravazacije tečnosti kada se igla postavi pogrešno. Delići kosti mogu izazvati blokadu igle. Da se spreči blokada, infuziona linija treba biti isprana sa 3 do 5 ml fiziološkog rastvora svakih 15 minuta.

Ostale komplikacije tokom plasiranja intraosealne igle su subkutana ili subperiostalna infiltracija zbog nepotpunog plasiranja. Prelom dugih kostiju je takođe opisan posle intraosealnog plasiranja igle, rizik je veći ukoliko pacijent ima predispoziciju za osetljivost kostiju⁴. Uprkos adekvatnog postavljanja igle, sledeće se komplikacije mogu takođe javiti: infekcije (celulitis ili osteomijelitis), masna embolija (objavljena u životinjskim modelima), lokalni hematomi i bol^{4,11}. Stopa infekcije je manja od 3%, a literatura pokazuje da je učestalost osteomielitisa 0,6%¹².

ZAKLJUČAK

Plasiranje intraosealne igle se koristi kao privremena mera kada se intravaskularni pristup ne može postići putem perifernog ili centralnog venskog puta. Intraosealna igla može ostati na mestu 72 do 96 sati, ali je najbolje ukloniti je u roku od 6 do 12 časova, čim se uspostavi alternativni intravaskularni pristup. Intraosealni put obezbeđuje brz i pouzdan vaskularni pristup u hitnim slučajevima. Upotreba odgovarajuće tehnike će obezbediti da se postupak obavlja bezbedno i efikasno.

LITERATURA

1. Schwartz D, Amir L, Dichter R, et al. The use of a powered device for intraosseous drug and fluid administration in a national EMS: a 4-year experience. *J Trauma* 2008;64:650-4.
2. Stanley R. Intraosseous infusion. In: Roberts JR, Hedges JR, Chanmugam AS, Chudnofsky CR, Custalow CB, Dronen SC, eds. *Clinical procedures in emergency medicine*. 4th ed. Philadelphia: Saunders, 2004:475-85.
3. Fowler R, Gallagher JV, Isaacs SM, et al. The role of intraosseous vascular access in the out-of-hospital environment (resource document to NAEMSP position statement). *Prehosp Emerg Care* 2007;11:63-6.
4. Blumberg SM, Gorn M, Crain EF. Intraosseous infusion: a review of methods and novel devices. *Pediatr Emerg Care* 2008;24:50-6.
5. Horton MA, Beamer C. Powered intraosseous insertion provides safe and effective vascular access for pediatric emergency patients. *Pediatr Emerg Care* 2008;24: 347-50.
6. Neumar RW, Otto CW, Link MS, et al. Part 8: adult advanced cardiovascular life support — 2010 American Heart Association guidelines for cardiopulmonary resuscitation and emergency cardiovascular care science. *Circulation* 2010;122:Suppl 3: S729-S767.
7. Davidoff J, Fowler R, Gordon D, et al. Clinical evaluation of a novel intraosseous device for adults: prospective, 250-patient, multi-center trial. *JEMS* 2005;30:Suppl:20-3.
8. Olasussen A, Williams B. Intraosseous access in the prehospital setting: literature review. *Prehosp Disaster Med* 2012;27:468-72.
9. Leidel BA, Kirchhoff C, Braunstein V, et al. Comparison of two intraosseous access devices in adult patients under resuscitation in the emergency department: a prospective, randomized study. *Resuscitation* 2010;81:994-9.
10. Orłowski JP, Porembka DT, Gallagher JM, et al. The bone marrow as a source of laboratory studies. *Ann Emerg Med* 1989;18:1348-51.
11. Buck ML, Wiggins BS, Sesler JM. Intraosseous drug administration in children and adults during cardiopulmonary resuscitation. *Ann Pharmacother* 2007;41:1679-86.
12. Rosetti VA, Thompson BM, Miller J, et al. Intraosseous infusion: an alternative route of pediatric intravascular access. *Ann Emerg Med* 1985; 14:885-8.



Terumo

PERKUTANA TRAHEOTOMIJA

Uroš Petrović, Milić Veljović, Igor Vasković, Nevena Radović, Goran Rondović

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

SAŽETAK

Traheotomija je jedna od najstarijih hirurških procedura, čija istorija seže u vreme pre Hrista, a u modernim vremenima je jedna od najčešćih intervencija kod kritično obolelih pacijenata. U poređenju sa orotrahealnom intubacijom je komotnija za pacijenta, omogućava bolju negu respiratornih puteva i usne duplje i značajno smanjuje respiratorne komplikacije. Perkutana traheotomija je lako izvodljiva u krevetu pacijenta, tako da se može smanjiti rizik transporta u operacionu salu i nazad. U poređenju sa hirurškom traheotomijom trebalo bi da perkutana traheotomija bude nekoliko puta brže izvodljiva i prema nekim proračunima upola jeftinija.

UVOD

Traheotomija je hirurški postupak kojim se pravi otvor (traheostoma) na prednjem zidu vratnog dela traheje. To jedan od najstarijih hirurških zahvata a, prve istorijske zapise o njenom izvođenju nalazimo već u ranim Egipatskim tekstovima iz 3600. godine p.n.e¹. Temelje otvorene hirurške traheostomije je postavio Jackson (1909)². Shelden je 1957.god. opisao tehniku perkutane traheostomije (PCT)³, koja je zaživela nakon 1985. god., kada je Ciaglia ustanovio prvi komercijalni set sa vodičem i dilatatorima (Ciaglia Blue Rhino, CBR)⁴. Grigs 1990 godine, opisuje tehniku širenja mesta za traheostomsku kanilu sa posebnim forcepsom (Griggs Guide Wire Dilating Forceps, GWDF)⁵. Rusch (Kernen, Nemačka) 2001.god. je predstavio set PercuTwist TM koji za širenje mesta za traheostomsku kanilu koristi poseban zavrtanj⁶. Fantoni je 1997. god., opisao tehniku translaringealne traheostomije (TLT)⁷. Traheotomija je jedna od najčešćih hirurških procedura u HIN koja se koristi za zaštitu disajnog puta tokom prolongirane mehaničke ventilacije kao i tokom odvikavanja od mehaničke ventilacije. Zna se da produžena intubacija u jedinici intenzivne nege dovodi do povećanja učestalosti infekcija disajnih puteva, otežava negu i toaletu usne duplje, povećava mrtvi prostor u disajnom putu što dovodi do ponovnog udisanja izdahnutog vazduha, povećanja koncentracije ugljen dioksida a, kao posledica javlja se hiperventilacija. Svi ovi procesi koji se javljaju usled produženog vremena intubacije pacijenta

dovode do prolongiranja perioda odvajanja od mehaničke ventilacije a, samim tim i produženog boravka pacijenata u jedinici intenzivnog lečenja⁸.

U načelu postoje dve vrste traheotomije: hirurška i perkutana (PCT).

Prednosti PCT u odnosu na hiruršku traheotomiju ogledaju se u manjoj traumi tkiva na mestu plasiranja kanile, boljem odnosu između kanile i tkiva na mestu otvora, manjeg krvarenja tokom izvođenja procedure, angažovanju manjeg broja osoblja, mogućnost izvođenja pored kreveta bolesnika bez korišćenja operacione sale, manjoj incidenciji infekcije i stenoze kao i smanjenju troškova lečenja bolesnika⁹.

Nedostaci procedure se ogledaju u nepostojanju adekvatnih statističkih podataka jer se ova procedura izvodi nekih 35-40 godina dok se klasična hirurška traheostomija izvodi preko 95 godina.

Indikacije i kontraindikacije za perkutanu traheotomiju

Indikacije za izvođenje PCT su¹⁰:

- dugotrajna intubacija,
- prolongirano odvajanje od mehaničke ventilacije
- premošćavanje disajnih puteva.

Kontraindikacije se mogu podeliti na apasolutne i relativne¹⁰. U grupu apasolutnih kontraindikacija spadaju:

- hitnost u obezbeđenju disajnog puta,
- pacijenti mlađi od 15 godina života,

- nemogućnost definisanja anatomskih struktura,
- upalni procesu na mestu kanulacije kao i maligna oboljenja u toj regiji.

A u relativne kontraindikacije ubrajaju se predhodne operacije i ožiljci na mestu planirane traheotomije i uvećanje štitaste žlezde.

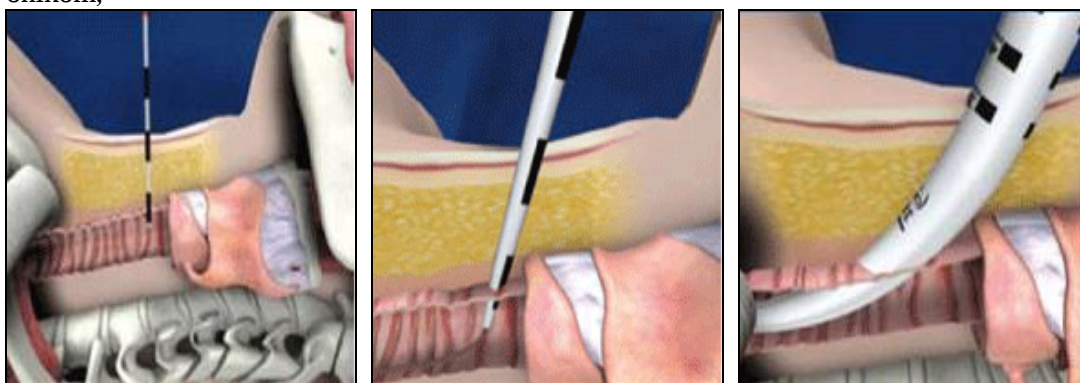
Tehnika izvođenja perkutane traheotomije

Procedure se sastoji u predhodnoj pripremi osoblja i bolesnika za izvođenje procedure kao i izvođenje same procedure što podrazumeva:

- Postavljanje osoblja tako što je operator sa desne ili leve strane pacijenta, asistent je nasuprot operatora a, anestetičar se nalazi iznad glave pacijenta,
- Kontinuirani monitoring vitalnih parametara,
- Preoksigenaciju pacijenta sa 100% kiseonikom,

- Sedaciju i relaksaciju bolesnika,
- Ekstenziju glave i vrata tako da dođe do otvaranja trahealnih međuprostora što se dodatno može postići postavljanjem smotuljka ispod ramena bolesnika,
- Preoperativno čišćenje regije planirane traheostome,
- Orjentacija u odnosu na anatomske strukture (palpacija tireoidne hrskavice zatim niže krikoidne kao i određivanje porstora plasiranja kanile između drugog i trećeg trahealnog prstena ispod ove dve predhodno navedene strukture).
- Aplikovanje lokalnog anestetika pod kožu na mestu pravljenja reza.
- Provera seta za traheostomiju kao i provera balončića na samoj kanili.

Nakon svih ovih pripremnih radnji izvodi se sama procedura na sledeći način (Slika 1):



Slika 1. Osnovni postupci u toku izvođenja perkutane traheotomije

- Pravi se uzdužni rez u dužini od oko 2 cm iznad prvog i drugog trahealnog prstena,
- Endotrahealni tubus se izvlači do nivoa prvog trahealnog prstena (približno dok balončić tubusa ne bude skoro među glasnicama)
- Plasira se 14-G kanila kroz inciziju na koži između drugog i trećeg trahealnog prst na i vrši se aspiracija. Dobijanje mehurića vazduha u špricu je znak da je kanila u traheji.
- Plasira se kanila dok se igla izvlači napolje,
- Vrš se plasiranje sajle vodilice kroz plastičnu kanilu,
- Izvodi se dilatacija sa manjim dilatatorom koji se niže preko sajle vodilice,
- Nakon ove prve dilatacije vrši se dilatacija sa glavnim dilatatorom u zavisnosti od

seta koji se koristi za PCT (može biti više dilatatora ili jedan dilatator koji se postepeno širi-*Ciaglia method*, vijak sa navojem-*PercuTwist* ili dilatacija peanom-*Griggs metoda*),

- Posle dilatacije traheje vrši se izvlačenje endotrahealnog tubusa zatim plasiranje kanile, a potom izvlačenje sajle vodilice,
- Vrš se provera pozicije kanile (auskult torno ili pomoću fiberoptičkog bronhoskopa),
- Kanila se fiksira posebnom trakom i bolesnik se povezuje sa aparatom za MV.

Komplikacije perkutane traheotomije

Za vreme izvođenja a takođe i nakon izvođenja ove procedure moguća je pojava kom-

plikacija koje se mogu podeliti na rane i kasne u zavisnosti od vremena kada se javljaju¹¹⁻¹³. Rane komplikacije su one koje se javljaju u prvih sedam dana od izvođenja PCT i to su:

- Nemogućnost postavljanje kanile,
- Opstrukcija kanile sekretom ili ugrušcima,
- Pneumotoraks ili pneumomediastinum,
- Podkožni emfizem,
- Krvarenje,
- Infekcija stome.

Sve rane komplikacije koje ugrožavaju disajni put bolesnika neophodno je odmah prepoznati i rešavati ih ili brzim otklanjanjem uzroka koji je doveo do njihove pojave ili oralnom reintubacijom bolesnika ukoliko je nemoguće trenutno otkloniti uzrok nasranka problema.

Kasne komplikacije se javljaju nakon sedam dana od izvođenja procedure i tu spadaju:

- Traheoarterijalna fistula,
- Disfagija i aspiracija sadržaja,
- Trahealna stenoza,
- Traheozofagealna fistula,
- Traheokutana fistula,
- Traheomalacija.

U Klinici za anesteziju i intenzivnu terapiju Vojnomedicinske Akademije perkutanatraheotomija se izvodi od 2009. godine. Do sada je urađeno preko 300 PCT sa pojavom svega tri rane komplikacije i to u vidu krvavljenja na mestu kanile i pojava potkožnog emfizema kod dva pacijenta.

Uz adekvatnu negu, održavanje i po potrebi zamena kanila kod bolesnika koji su duže vremena proveli na MV (preko šest meseci), kanile sa balončićem su zamenjene metalnim kanilama što je omogućilo premeštanje pacijenata na matično odeljenje a, kasnije i otpust iz bolnice.

ZAKLJUČAK

Podaci iz stručne literature podržavaju ovu tehniku i treba imati u vidu da su komplikacije veoma retke, ali mogu biti životno ugrožavajuće te je obučenosť i iskustvo tima koji izvodi ovu proceduru neophodno da bude na visokom nivou da može na vreme prepoznati i adekvatno reagovati na pojavu komplikacija koje u nekoliko minuta mogu ugroziti život bolesnika.

Cena perkutane traheotomije u krevetu u odnosu na traheotomiju u operacionoj sali je znatno manja ali kada se pravilno izvede perkutana traheotomija je bezbedna i korisna metoda za obezbeđenje disajnog puta.

LITERATURA

1. Frost EA. Tracing the tracheostomy. *Ann Otolaryngol* 1976; 85: 618–24.
2. Jackson C. Tracheostomy. *Laryngoscope* 1909; 19: 285–90.
3. Shelden CH, Pudenz RH, Tichy FY. Percutaneous tracheostomy. *JAMA* 1957; 165: 2068–70.
4. Ciaglia P, Firsching R, Syniec C. Elective percutaneous dilatational tracheostomy: a new simple bedside procedure: preliminary report. *Chest* 1985; 87: 715–9.
5. Griggs WM, Worthley LIG, Gilligan JE, et al. A simple percutaneous tracheostomy technique. *Surgery* 1990; 170: 543–5.
6. Westphal K, Maeser D, Scheifler G, et al. Percu Twist. A new single-dilator technique for percutaneous tracheostomy. *Anesth Analg* 2003; 96: 229–32.
7. Fantoni A, Ripamonti D. A non derivative, non-surgical tracheostomy: the translaryngeal method. *Intensive Care Med* 1997; 23: 386–92.
8. Delaney A, Bagshaw SM, Nalos M. Percutaneous dilatational tracheostomy versus surgical tracheostomy in critically ill patients: a systematic review and meta-analysis. *Crit Care* 2006; 10: R55.
9. Friedman Y, Fildes J, Mizcock B, et al. Comparison of percutaneous and surgical tracheostomies. *Chest* 1996; 110: 480–5.
10. Al-Ansari MA, Hijazi MH. Clinical review: percutaneous dilatational tracheostomy. *Crit Care* 2006; 10: 202.
11. Jones JW, Reynolds M, Hewitt RL, Drapanas T. Tracheo-innominate artery erosion: Successful surgical management of a devastating complication. *Ann Surg* 1976; 184: 194–204.
12. Byhahn C, Lischke V, Meininger D, Halbig S, Westphal K. Perioperative complications during percutaneous tracheostomy in obese patients. *Anaesthesia* 2005; 60: 12–5.
13. Fikkers BG, van Veen JA, Kooloos JG, et al. Emphysema and pneumothorax after percutaneous tracheostomy. *Chest* 2004; 125: 1805–14.



B I O M É R I E U X

SEROTONINSKI SINDROM I ANESTEZIJA

Goran Rondović, Ana Popadić, Milić Veljović, Uroš Petrović, Igor Vasković, Nevena Radović

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

SAŽETAK

Serotoninski sindrom predstavlja jedno od potencijalno životno ugrožavajućih stanja koje nastaje kao neželjena reakcija na lek, kombinaciju lekova ili neželjenu interakciju različitih lekova. Ovo stanje je reverzibilno i može se prevenirati. Zahteva veliki oprez u radu sa pacijentima koji upotrebljavaju lekove iz grupe serotoninskih agonista. U današnjoj anesteziološkoj praksi svakodnevno se susrećemo sa pacijentima koji u svojoj hroničnoj terapiji imaju neke od antidepresiva iz grupe serotoninskih agonista, a pokazalo se da ovi lekovi u kombinaciji sa različitim sredstvima iz anesteziološke palete mogu dovesti do nastanka ovog potencijalno letalnog sindroma.

Ključne reči: serotonin, serotoninski sindrom, inhibitori monoaminoooksidaze, fentanil, anestezija

UVOD

Serotonin je monoaminski neurotransmiter koji se sintetiše kako u centralnom nervnom sistemu tako i u enterohromatofinim ćelijama gastrointestinalnog trakta i u trombocitima. Opšte je poznat kao hormon sreće i jedan je od glavnih medijatora raspoloženja i promena raspoloženja. Ovaj hormon je uključen i u rad brojnih drugih sistema, pa samim tim je i važan za svakodnevni rad anesteziologa. Serotonin direktno moduliše bronhomotorni tonus, agregaciju trombocita, bol, ali i muku, gađenje i povraćanje¹.

Danas je sve više pacijenata koji u svojoj svakodnevnoj terapiji uzimaju neke od lekova koji menjaju aktivnost ovog hormona. Ti lekovi uglavnom pojačavaju efekat serotonina na svojim receptorima, smanjivanjem njegovog preuzimanja ili amplifikacijom oslobađanja serotonina².

Nagomilavanje serotonina na receptorskom mestu kao krajnji efekat, osim dobrobiti može imati i neželjenu reakciju koja će se manifestovati u vidu serotoninskog sindroma. Pored toga što se ovaj sindrom javlja kod pacijenata na kontinuiranoj antidepresivnoj terapiji serotoninergičkim sredstvima, kod istih pacijenata može biti iniciran i primenom nekih od anestetičkih sredstava³. Dokazano je da neki opioidi mogu inicirati njegov nastanak, ali i neki antibiotici, kao i brojna druga sredstva. Simptomi ovog sindroma mogu ići od veoma blagih do životno ugrožavajućih, stoga

je neophodno prepoznavanje simptoma ovog sindroma ali i veliki oprez u svakodnevnom radu anesteziologa sa pacijentima na hroničnoj antidepresivnoj terapiji.

Fiziologija serotonina

Serotonin je monoaminski neurotransmiter (5-hidrokitriptain, 5-HT), koji se sintetiše u nervnim završetcima serotonergičnih neurona centralnog nervnog sistema (CNS). 5-HT se sintetiše iz L-triptofana, esencijalne aminokiseline, putem hidroksilacije i dekarboksilacije. Ova sinteza odvija se u nervnim završetcima i odmah po sintetisanju novonastali neurotransmiter se deponuje u vezikule. Serotonin ne prolazi krvno moždanu barijeru zbog veličine svog molekula. Ali, ipak se nalazi i na periferiji, gde nastaje nakon sinteze u enterohromatofinim ćelijama gastrointestinalnog trakta (GIT) i deponuje se u trombocitima⁴. Ovaj hormon, označen i kao hormone sreće, ispoljava niz akcija na brojnim fiziološkim sistemima i veoma je značajan za svakodnevni rad anesteziologa³. 5-HT putem svojih receptora ispoljava dejstvo na CNS, utiče na vaskularnu reaktivnost, bronhomotorni tonus, agregaciju trombocita, modulaciju bola kao i muku i povraćanje.

Svoje dejstvo serotonin stvara preko sedam tipova serotoninskih receptora⁵. Ovaj receptorski sistem je potom podeljen na 15 podti-

pova. Svi receptori serotoniniskog sistema deluju preko G proteina. Jedini izuzetak u ovom receptorskom sistemu jeste 5-HT₃ receptor koji je ligandno zavisni Na⁺/K⁺ jonski kanal. Sistem drugog glasnika udružen sa aktivacijom G proteina uključuje cAMP i fosfatidil inozitol. Klasifikacija serotoniniskih receptora na podtipove je napravljena prema ligandnoj specifičnosti i prema distribuciji unutar organizma^{4,5}.

Ključna akcija serotoninina se odvija unutar CNS-a. Ovde serotonin, preko svojih receptora modulira veoma važne funkcije kao što su: raspoloženje, budnost, regulaciju sna i termoregulaciju. Dokazano je da su pojava depresije, opsesivno kompulsivnog poremećaja, agresije, anoreksije i poremećaja sna tesno povezani sa niskim nivoom serotoninina u CNS-u. Nakon otpuštanja serotoninina u sinaptičku pukotinu njegova dalja sudbina obuhvata ponovno preuzimanje i deponovanje od strane presinaptičke membrane ili razgradnju putem monoaminoooksidaza (MAO). Glavni metabolit je 5-hidroksiindolacetična kiselina (5-HIAA) koja se izlučuje dalje putem bubrega^{4,5}.

Simptomi

Simptomi serotoniniskog sindroma se mogu svrstati u tri grupe⁶:

1. Izmena stanja svesti: agitacija, delirijum, nemir, uznemorenost, halucinacije.
2. Disfunkcija autonomnog nervnog sistema: diaforeza, hipertenzija, hipertermija, povraćanje, tahikardija.
3. Promena neuromuskularnog statusa: mioklonus, tremor, mišićni rigiditet, nistagmus.

Postoje i brojne druge manifestacije kao što su (rabdomioliza, bubrežna insuficijencija, DIK, itd.), koje zavise od stadijuma ispoljavanja sindroma.

Postavljanje dijagnoze je čisto kliničko. Na osnovu ispoljenih simptoma i vremena njihovog pojavljivanja. Postoje Hanterovi kriterijumi⁷ radi lakše orijentacije i preciznijeg postavljanja dijagnoze. Diferencijalno dijagnostički se mora misliti o malignom neurolept sindromu, malignoj hipertermiji, trovanju antiholinergicima^{6,8}.

Tabela 1.

Hanterovi kriterijumi za dokazivanje serotoniniskog sindroma

Hanterovi kriterijumi
• Spontani klonus • Indukovani klonus + uznemirenost ili preznjavanje • Okularni klonus + uznemirenost ili preznjavanje • Tremor + hiperrefleksija • Hipertonus + temperatura iznad 38°C + okularni klonus ili indukovani klonus

Terapija

Terapija se zasniva na hitnom obustavljanju primene svih lekova koji direktno ili indirektno mogu povećavati nivo serotoninina. Primenu suportivne terapije kako bi se održala oksigenacija i hemodinamska stabilnost. Kontrolu agitiranosti i mioklonusa sprovoditi nekim od benzodiazepinskih sredstava⁹. Neke od simptoma autonomnog nervnog sistema tipa tahikardije možemo kontrolisati nekim od kratkodelujućih beta blokatora. Svim dostupnim merama kontrolisati hipertermiju. A ukoliko su dostupni primenjuju i antagonisti serotoninina⁹.

Serotoniniski sindrom i anestezija

Spisak lekova, iz svakodnevne anesteziološke prakse^{3,10}, koji mogu podstaknuti nastajanje serotoniniskog sindroma je dugačak. Sam sindrom nastaje u situacijama upotrebe dva leka iz grupe lekova koji povećavaju nivo serotoninina. Pogotovo ako se upotrebljavaju veće doze jednog od tih lekova. Naravno sam sindrom može nastati kod pacijenata na monoterapiji serotoninergičnim agentima kod predoziranja ili dugotrajne upotrebe visokih doza. Dok sa druge strane, lekovi iz svakodnevne anesteziološke prakse ne izazivaju ovaj sindrom samostalno već isključivo udruženo sa nekim od primarno serotoninergičnih lekova^{3,10}.

ZAKLJUČAK

Poslednjih deset godina značajno se povećala upotreba serotonergičnih sredstava u svakodnevnoj praksi, kako u psihijatriji tako i u različitim oblastima medicine. Osim primarno serotonergičnih sredstava na povećanje nivoa serotonina mogu uticati i brojna druga sredstva iz našeg svakodnevnog rada. Primer su opioidni analgetik fentanil kao i neki antiemetici i neki antibiotici. Konkretnog saveta nema kojim bi se preporučilo izbegavanje upotrebe ovih lekova ili izmena njihove doze. Nije dokazana veza između malih doza fentanila upotrebljavanog u malim intervencijama i nastajanja serotoniniskog sindroma. Svakako je neophodna veća mera opreza pri radu sa pacijentima koji u svojoj terapiji upotrebljavaju neka od serotoniniskih sredstava. Pravilno postavljanje dijagnoze i sagledavanje simptoma kod pacijenata u neposrednom postoperativnom toku.

LITERATURA

1. Birmes P, Coppin D, Schmitt L, et al. Serotonin syndrome: a brief review. *CMAJ*. 2003; 168:1439-1442.
2. Boyer EW, Shannon M. The serotonin syndrome. *N Engl J Med*. 2005;352:1112-1120.
- 3.
4. Jones D, Story DA. Serotonin syndrome and the anaesthetist. *Anaesth Intensive Care*. 2005;33:181-187.
5. Glennon RA, Dukat M, Westkaemper RB. Serotonin receptor subtypes and ligands. In: Bloom FE, Kupfer DJ, eds. *Psychopharmacology: the fourth generation of progress*. New York, NY: Raven Press, Ltd; 1995. The Serotonin Syndrome, Edward W.
6. Glennon RA. Serotonin receptors: clinical implications. *Neurosci Biobehav Rev*. 1990;14:35-47.
7. D'Esposito M. Serotonin neurotoxicity: implications for cognitive neuroscience and neurology. *Neurology*. 1998; 51: 1529 -1530.
8. Dunkley EJ, Isbister GK, Sibbritt D, et al. The Hunter Serotonin Toxicity Criteria: simple and accurate diagnostic decision rules for serotonin toxicity. *QJM* 2003; 96:635.
9. Adnet P, Lestavel P, Krivosic-Horber R. Neuroleptic malignant syndrome. *Br J Anaesth*. 2000;85:129-135.
10. Isbister GK, Buckley NA. The pathophysiology of serotonin toxicity in animals and humans: implications for diagnosis and treatment. *Clin Neuropharmacol*. 2005;28:205-214.
11. Walsh J. Serotonin syndrome. *Anaesthesia Tutorial of the Week*. 2010;1-5.



abbvie

APTUS d.o.o.



ULOGA ANESTEZIOLOŠKOG TIMA U SPREČAVANJU BOLNIČKIH INFEKCIJA

Igor Vasković, Milić Veljović, Nevena Radović, Uroš Petrović

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

SAŽETAK

Svakodnevna anesteziološka praksa podrazumeva čestu primenu poluinvanzivnih i invanzivnih procedura, primenu aparata za anesteziju, kontinuiranu ili intermitentnu primenu parenteralnih anestezioloških agenasa, infuzione i transfuzione terapije, kao i kontakt sa sekretima, ekskretima i krvlju. Svaka od ovih procedura nosi sa sobom rizik od mikrobiološke kontaminacije pacijenta, koji se značajno uvećava u hitnim stanjima.

Uloga anesteziološkog tima u sprečavanju nastanka bolničkih infekcija ogleda se kroz sprovođenje mera higijene ruku, prevenciju kontaminacije medikamentima, učešće u prevenciji infekcije operativnog polja, sprečavanje nastanka infekcija vezanih za intravaskularne katetere i neuroaksijalne procedure, adekvatnu dezinfekciju anesteziološke opreme kao i prevenciju nastanka profesionalnih infektivnih oboljenja kod medicinskog osoblja.

Ključne reči: nozokomijalne infekcije, procedure u anesteziji, prevencija infekcije

UVOD

Bolničkim ili nozokomijalnim infekcijama nazivaju se infekcije koje se javljaju kod pacijenata tokom boravka u bolnicama ili drugim zdravstvenim ustanovama, ukoliko u momentu prijema u zdravstvenu ustanovu pacijent nije bio u inkubacionoj fazi ili sa već razvijenom kliničkom slikom infekcije. U ovu grupu infekcija spadaju i one koje nastaju tokom boravka u zdravstvenoj ustanovi ali se klinička slika razvija nakon otpusta pacijenta. Treća nacionalna studija prevalencije bolničkih infekcija u Srbiji iz 2010.godine pokazala je da je učestalost ovih infekcija 5,3% od čega najveći broj nastaje u jedinicama za intenzivno lečenje (JIL). Urinarne infekcije, infekcije operativnog mesta, pneumonije i infekcije krvi su bile najčešće zastupljene. Veliki procenat mikroorganizama odgovornih za nastanak bolničkih infekcija danas je rezistentan na jedan ili više antibiotika, a JIL predstavljaju epicentre antiobiotске rezistencije¹.

Faktori rizika za nastanak bolničkih infekcija su: produžena i neadekvatna upotreba invanzivnih sredstava, loša primena standarda i mera izolacije, neadekvatni higijenski uslovi, loša infrastruktura i oprema, nedostatak osoblja, nedovoljno poznavanje i loša primena osnovnih mera za kontrolu infekcija,

nedostatak protokola kao i nedovoljno znanje o bezbednoj primeni injekcija i transfuzije².

Higijena ruku, noktiju i nošenje nakita

Zdravstveni radnici mogu kontaminirati ruke najrazličitijim patogenima čak i kada izvedu "čiste procedure" (podizanje pacijenata) ili pri dodirivanju intaktnih regiona kože pacijenta (merenje pulsa). Potencijalni patogeni mogu se, s druge strane, preneti sa ruku zdravstvenih radnika na pacijenta tokom administracije lekova.

Dvogodišnja prospektivna studija sprovedena u JIL u Americi pokazala je povećanje procenta bakterija na noktima dužim od 2mm. Dugački nokti bili su povezani sa lošijim obavljanjem higijene ruku kao i većim procentom pojave mikropora na rukavicama, dovodeći čak i do cepanja rukavica³.

Prema tome, u cilju prevencije infekcije treba:

- higijenu ruku sprovesti pre i posle kontakta sa pacijentom
- održavati dužinu prirodnih noktiju na prosečnu dužinu od 2mm
- medicinsko osoblje ne bi trebalo da ima veštačke nokte
- koristiti četku za čišćenje površine ispod noktiju nakon pranja ruku.

Upotreba nesterilnih rukavica

Nošenje nesterilnih rukavica tokom rutinske nege pacijenta redukuje prenošenje patogena sa pacijenta, ali rukavice ne mogu potpuno sprečiti kontaminaciju ruku. Pranje ruku je neophodno pre i posle korišćenja sterilnih i nesterilnih rukavica zbog potencijalne kontaminacije kroz pukotinu na rukavici ili kontaminacije prilikom skidanja rukavica⁴.

Upotreba nesterilnih rukavica je obavezna:

- kada postoji verovatnoća da će se doći u direktan kontakt sa pacijentovom krvlju ili drugim potencijalno infektivnim materijalom (telesne tečnosti, sluzokože)
- kod punktiranja vene ili intravenoznog davanja injekcija zbog potencijalnog izlaganja krvi na mestu uboda (moguće korišćenje samo jedne rukavice)
- ukoliko koža medicinskog osoblja nije intaktna (ukoliko postoji ekcem ili je koža suva i ispucala)
- ukoliko koža pacijenta, takodje, nije intaktna (ekcem, opekotine, infekcija kože)
- rukavice se ne koriste pri rutinskom davanju potkožnih ili intramuskularnih injekcija ukoliko je koža na rukama medicinskog osoblja i pacijenta intaktna.

Upotreba špriceva i igala

Preko 130 000 pacijenata godišnje u USA je izloženo infekciji virusom hepatitisa B ili C zbog nepravilne upotrebe špriceva i igala. Transmisija infektivnog oboljenja može nastati višekratnom upotrebom iste igle ili šprica za više pacijenata kao i nepravilnom upotrebom ampula ili bočica sa lekovima⁵.

Kod upotrebe špriceva i igala postoje pravila koja se moraju poštovati, a ona su:

- špricevi i igle moraju biti upotrebljeni samo jednom.
- lek iz istog šprica davati samo jednom pacijentu čak i kada se igla promeni.
- nikada ne navlačiti lek u isti špric koji se već jednom upotrebi, čak i kada se radi o istom pacijentu.
- koristiti 70% alkohol za čišćenje gume na bočicama sa lekovima pre navlačenja leka u špric.
- nikada ne vraćati poklopac na korišćenu iglu

- upotrebljenu iglu uvek odložiti jednom rukom u kontejner za odlaganje oštih predmeta

Centralni venski kateter

Stopa mortaliteta od infekcija koje su nastale kontaminacijom centralnog venskog katetera (CVK) iznosi između 12 i 25% po infekciji⁶. Najčešći način kontaminacije je:

- ekstraluminalni kontakt katetera sa bakterijskom florom na koži; ovi mikroorganizmi zatim kroz lumen dolaze do vrha katetera gde dovode do kolonizacije.
- preko kontaminiranih ruku medicinskog osoblja ili kontaminiranih špriceva i druge opreme ili infuzionih sistema.
- intraluminalno zbog hematogenog širenja infekcija iz drugih žarišta (pluća, urinarne infekcije).

Smatra se da su kratkotrajne infekcije ekstraluminalnog, a dugotrajne infekcije intraluminalnog porekla⁷.

Postupci koji se moraju sprovesti kod plasiranja CVK su:

- higijena ruku treba biti sprovedena pre i posle palpacije mesta insercije kao i pre plasiranja ili bilo kakve manipulacije kateterom.
- koristiti maksimalno sterilne uslove pre plasiranja ili zamene CVK što podrazumeva upotrebu kape, maske, sterilnih rukavica i sterilnog mantila
- koristiti CVK koji je impregniran antiseptikom ili antibiotikom kod onih pacijenata kod kojih se očekuje da će kateter ostati duže od pet dana.
- CVK plasirati predominantno u a.subclaviu, a zatim u v.jugularis internu ili v.femoralis kako bi se minimizirala mogućnost infekcije.
- izbegavati v.femoralis, ako je moguće
- kada nije moguće plasirati u aseptičnim uslovima (hitna stanja), zameniti kateter što je pre moguće (unutar 48 sati).
- koristiti ultrazvuk za navođenje pri plasiranju katetera (ako je to tehnički izvodljivo) kako bi se smanjio broj pokušaja prilikom plasiranja i mehaničke komplikacije.
- nepotrebne katetere treba što pre ukloniti.
- kada je suspektna infekcija potrebno je zaminiti CVK.

Arterijski kateter

Arterijski kateteri omogućavaju kontinuirani monitoring krvnog pritiska, kao i uzimanje uzoraka krvi za gasne analize. Rizik za nastanak infekcija uzrokovanih kateterom je niži kod arterijskih u odnosu na CVK⁸.

Postupci za izvođenje ove procedure su:

- radijalna ili brahijalna arterija imaju prednost u odnosu na femoralnu arteriju zbog smanjenja rizika od infekcije.
- minimum opreme podrazumeva kapu, masku, sterilne rukavice i fenestriranu kompresu za kanulaciju radijalne i brahijalne arterije, dok je za kanulaciju femoralne arterije potreban i sterilan mantil
- minimizirati manipulisanje sistemom za merenje pritiska; koristiti zatvoren sistem (kontinuirani protok tečnosti kroz sistem) umesto otvorenog (onaj koji zahteva špric) za održavanje prohodnosti sistema.
- sve portove na sistemu treba održavati sterilnim, a kada se upotrebljavaju primeniti odgovarajuće mere asepsa.

Prevenција pneumonije udružene sa mehaničkom ventilacijom (VAP)

VAP se javlja u čak 9-27% pacijenata na mehaničkoj ventilaciji i udružena je sa visokom stopom mortaliteta⁹. Postupci koji smanjuju incidencu VAP su:

- rutinsko pranje ruku kao primarna mera pre i posle bilo kakve manipulacije sa tubusom,
- skraćivanje trajanja endotrahealne intubacije (pokušati sa povremenim epizodama spontanog disanja) i favorizovanje neinvazivnih tehnika ventilacije.
- pacijenta na mehaničkoj ventilaciji postaviti u polusedećem položaju; ležeći položaj je udružen sa većim procentom pojave VAP-a, verovatno zbog pojave gastroezofagealnog refluksa i moguće aspiracije gastričnog sadržaja,
- pritisak u balončiću endotrahealnog tubusa treba da bude iznad 20 cmH₂O da bi sprečio mikroaspiracije, ali manji od 30 cmH₂O da bi se sprečila pojava traheomalacije.
- može se koristiti i otvoreni i zatvoreni sistem za aspiraciju; ako se upotrebljavaju zatvoreni sistemi treba ih menjati jednom nedeljno.

U meta analizi devet randomiziranih kontrolisanih studija pokazano je da nema razlike u

incidenci VAP-a, mortalitetu, dužini intubacije između pacijenata koji su tretirani zatvorenim sistemima za aspiraciju u odnosu na one kod kojih je korišćen otvoreni aspiracioni sistem¹⁰.

ZAKLJUČAK

Podizanje svesti svakog medicinskog radnika o pojedinačnoj odgovornosti, uvođenje standarda i protokola zajedno sa kontinuiranom edukacijom dovela bi do značajnog smanjenja pojave bolničkih infekcija, koje danas predstavljaju značajan faktor razvoja rezistencije patogenih mikroorganizama, troškova lečenja i povećanja mortaliteta.

LITERATURA

1. Pinney E: Hand washing. Br J Perioper Nurs 2000; 10:328–31
2. Craven DE, Kunches L, Lichtenberg DA, et al. Nosocomial infections and fatality in medical and surgical intensive care unit patients. Arch. Intern. Med. 1988; 148:1161–1168.
3. Pittet D, Dharan S, Touveneau S, et al. Bacterial contamination of the hands of hospital staff during routine patient care. Arch Intern Med. 1999; 159(8):821-826.
4. Muto CA, Sistrom MG, Strain BA, et al. Glove leakage rates as a function of latex content and brand. Arch Surg. 2000;135:982-985.
5. One & Only Campaign. <http://www.oneandonlycampaign.org/about/the-campaign>. Accessed February 1, 2012.
6. O'Grady NP, Alexander M, Dellinger EP, et al. Guidelines for the prevention of intravascular catheter-related infections. Centers for Disease Control and Prevention. MMWR Recomm Rep. Aug 9 2002;51(RR-10):1-29.
7. O'Grady NP, Alexander M, Burns LA, et al. Guidelines for the prevention of intravascular catheter-related infections. Am J Infect Control. May 2011;39:31-34.
8. Maki DG, Kluger DM, Crnich CJ. The risk of bloodstream infection in adults with different intravascular devices: a systematic review of 200 published prospective studies. Mayo Clin Proc. Sep 2006; 81(9):1159-1171.

9. Coffin SE, Klompas M, Classen D, et al. Strategies to prevent ventilator-associated pneumonia in acute care hospitals. *Infect Control Hosp Epidemiol.* 2008;29:S31-40.
10. Siempos II, Vardakas KZ, Falagas ME. Closed tracheal suction systems for prevention of ventilator-associated pneumonia. *Br J Anaesth.* 2008;100:299-306.





ZNAČAJ INICIJALNE ANTIBIOTSKE TERAPIJE U JEDINICI INTENZIVNOG LEČENJA

Nevena Radović, Milić Veljović, Igor Vasković, Uroš Petrović

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

SAŽETAK

Antibiotici su različita grupa lekova koji se karakterišu selektivnom toksičnošću i koji mogu potpuno uništiti patogene mikroorganizme ili zaustaviti njihov rast i razmnožavanje bez pričinjavanja značajne štete organizmu domaćina. Da bismo koristili neki antibiotik moramo da poznamo njegove osobine odnosno njegovu farmakokinetiku, farmakodinamiku, spektar aktivnosti, način aplikacije, kao i rizik za razvoj rezistencije. Danas borba protiv bakterija podrazumeva pre svega pametnu odnosno racionalnu upotrebu antibiotika i naravno razvoj novih antibiotika. Inicijalno data odgovarajuća antibiotska terapija u mnogo čemu određuje dalji tok lečenja pacijenata sa ozbiljnom infekcijom u jedinicama intenzivnog lečenja.

Ključne reči: **antibiotici, empirijska antibiotska terapija, eskalacija, de-eskalacija**

UVOD

Kod pacijenata sa ozbiljnom infekcijom u jedinicama intenzivnog lečenja (JIL) neophodno je prvo postaviti dijagnozu nakon čega se uzimaju uzorci neophodni za mikrobiološke i laboratorijske analize i odmah započinje sa inicijalnom antibiotskom terapijom koja može da odredi dalji tok pa i ishod lečenja. Izbor empirijske antibiotske terapije treba bazirati na karakteristikama pacijenata, mestu infekcije, lokalnoj osetljivosti i epidemiologiji, farmako kine-ts-kim i farmakodinamskim karakteristikama samog leka, kao i da li ćemo se odlučiti za kombinovanu terapiju ili monoterapiju.

Primena odgovarajućeg inicijalnog antibiotskog tretmana podrazumeva primenu antibiotika prvo, da antibiotski spektar pokriva infektivni patogen i drugo, da je taj patogen osetljiv na antibiotik. Antibiotik treba dati u ranoj fazi bolesti, u adekvatnoj dozi i sa malim rizikom za stvaranje rezistencije. Kombinovana antibiotska terapija treba da ima prednost u odnosu na monoterapiju i uvek je treba koristiti kada je indikovana¹.

Odgovarajuća i neodgovarajuća antibiotska terapija

Primena odgovarajuće empirijske antibiotske terapije ima veći klinički uspeh i manji mortalitet u odnosu na primenu

neodgovarajućeg antibiotskog tretmana²⁻⁹. Dužina lečenja a samim tim i dužina boravka u JIL je znatno kraća kod primene odgovarajuće terapije, razlika je i do deset dana u odnosu na primenu neodgovarajuće terapije².

Vreme davanja antibiotika

Vreme davanja antibiotika je od velikog značaja koje dalje određuje tok i ishod lečenja. Ukoliko se antibiotik inicijalno da u prvom satu od postavljanja dijagnoze, procenat preživljavanja je veći. Svako dalje odlaganje započinjanja tretmana smanjuje verovatnoću preživljavanja. Čak i u ekonomski bogatijim zemljama svega 50% pacijenata u septičnom šoku dobije antibiotik u prvih šest sati. Odlaganje započinjanja terapije za svaki sat povećava smrtnost za 5-10%¹⁰.

Da bi uspeh u lečenju bio veći u prvom satu empirijski treba dati antibiotik pacijentima sa ozbiljnom infekcijom, koji su hemodinamski nestabilni, sa neuromeningealnim simptomima, neutropenijom ili sa splenektomijom. U prvih šest sati antibiotik treba da dobiju pacijenti sa ozbiljnom infekcijom, hemodinamski stabilni, bez neuromeningealnih simptoma i bez neutropenije. Dok u prvih 24 časa antibiotik treba dati hemodinamski stabilnim

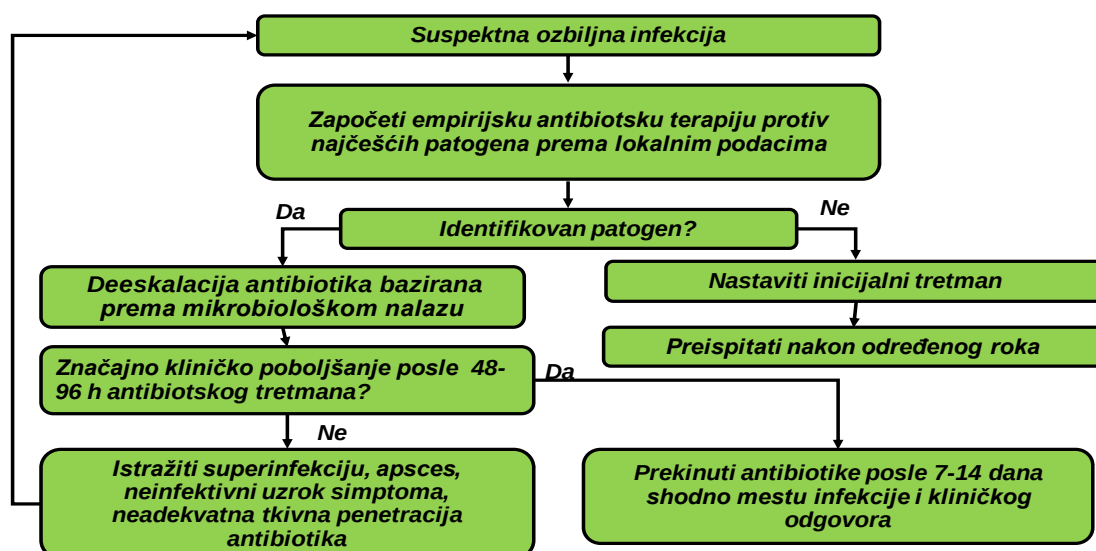
pacijentima sa infekcijom bez neutropenije i neuromeningealnih simptoma¹¹.

Racionalna de-eskalaciona antibiotska terapija

Kada se posumnja da se radi o ozbiljnoj infekciji i pošto se pacijenti mikrobiološki obrade, započinje se sa empirijskom antibiotskom terapijom koja je širokog spektra delovanja i koja pokriva potencijalne rezistentne sojeve. Ukoliko je patogen identifikovan, radi se de-eskalacija antibiotika

prema mikrobiološkom nalazu u cilju smanjenja bakterijske rezistencije kao i smanjenja troškova lečenja. Kao primer racionalne upotrebe antibiotika može poslužiti algoritam prikazan na Slici 1. Značajno kliničko poboljšanje se očekuje nakon 48-96 sati i terapija se može prekinuti posle 7-14 dana. Ukoliko poboljšanje izostane neophodno je ponovo razmotriti dijagnozu, ponoviti i dopuniti laboratorijske i mikrobiološke analize i započeti empirijski antibiotski tretman do pristizanja nalaza¹².

Racionalna de-eskalaciona antibiotska terapija



Slika 5. Algoritam za antibiotsku terapiju

Vodiči za inicijalnu antibiotsku terapiju

Postoji nekoliko bitnih principa kojih se treba pridržavati kada započinjemo empirijsku antibiotsku terapiju:

1. Koristiti specifične antibiogramе pri odabiru inicijalne terapije
2. Određeni antibiotici izazivaju unakrsnu rezistenciju na druge klase antibiotika tako da uvek treba birati antibiotik koji minimizira rezistencu i
3. Birati kombinovanu terapiju^{13,14}

Pri tome uvek treba koristiti i kliničke parametre za prilagođavanje, proširivanje ili ukidanje antibiotske terapije kao što su

povišena telesna temperatura, trahealni sekret, oksigenacija, RTG srca i pluća.

ZAKLJUČAK

Vreme davanja antibiotika je od velikog značaja koji dalje određuje tok i ishod lečenja. Empirijsku antimikrobnu terapiju u životno ugrožavajućim stanjima treba što hitnije ordinirati i to antibiotikom koji ima širok spektar delovanja i pokriva sve potencijalno rezistentne patogene. Međutim, da bi se smanjila ekcesivna upotreba antibiotika, terapija širokog spektra bi trebalo da bude de-eskalirana na osnovu mikrobiološkog nalaza i

kliničkog odgovora. Brojne studije su pokazale da rana odgovarajuća inicijalna antibiotska terapija skraćuje njeno trajanje, bolničko lečenje i utiče na smanjenje troškova lečenja i mortaliteta.

LITERATURA

1. Dellit TH, Owens RC, McGowan JE, et al. Infectious Diseases Society of America and the Society for Healthcare Epidemiology of America Guidelines for Developing an Institutional Program to Enhance Antimicrobial Stewardship. *Clin Infect Dis.* 2007; 44:159-77.
2. Rello J, Vidaur L, Sandiumenge A et al. De-escalation therapy in ventilator-associated pneumonia. *Crit Care Med*, 2004; 32:2183–2190
3. Alvarez-Lerma F: Modification of empiric treatment in patients with pneumonia acquired in the intensive care unit. *ICU-Acquired Pneumonia Study Group. Intensive Care Med* 1996, 22:387-394.
4. Luna CM, Vujacich P, Niederman MS, et al: Impact of BAL data on the therapy and outcome of ventilator-associated pneumonia. *Chest* 1997; 111:676-685.
5. Rello J, Gallego M, Mariscal D, et al. The value of routine microbial investigation in ventilator-associated pneumonia. *Am J Respir Crit Care Med*, 1997; 156:196-200.
6. Kollef MH, Sherman G, Ward S, et al. Inadequate antimicrobial treatment of infections: a risk factor for hospital mortality among critically ill patients. *Chest*, 1999; 115:462-474
7. Ibrahim EH, Sherman G, Ward S, et al. The influence of inadequate antimicrobial treatment of bloodstream infections on patient outcomes in the ICU setting. *Chest*, 2000;118:146–155.
8. Harbarth S, Garbino J, Pugin J, et al. Inappropriate initial antimicrobial therapy and its effect on survival in a clinical trial of immunomodulating therapy for severe sepsis. *Am J Med*, 2003;115:529–535.
9. Valles J, Rello J, Ochagavia A, et al. Community-acquired bloodstream infection in critically ill adult patients: impact of shock and inappropriate antibiotic therapy on survival. *Chest*. 2003;123:1615–1624.
10. Kumar A, Roberts D, Wood KE et al () Duration of hypotension before initiation of effective antimicrobial therapy is the critical determinant of survival in human septic shock. *Crit Care Med*, 2006; 34:1589–1596
11. Textoris J, Wiramus S, Martin C, et al. Antibiotic therapy in patients with septic shock. *Eur J Anaesthesiol* 2011; 28: 318-324.
12. Kollef MH, Golan Y, Micek ST et al. Appraising contemporary strategies to combat multidrug resistant gram-negative bacterial infections—proceedings and data from the Gram-Negative Resistance Summit. *Clin Infect Dis*, 2011;53(suppl 2):S33–S55
13. Guidelines for the management of adults with hospital-acquired, ventilator-associated, and healthcare-associated pneumonia. *Am J Respir Crit Care Med* 2005;171:388-416
14. Solomkin, J. S., J. E. Mazuski, J. S. Bradley, et al. Management of complicated intra-abdominal infection in adults and children: guidelines by the Surgical Infection Society and the Infectious Diseases Society of America. *Clin. Infect. Dis.* 2010; 50:133-164.

**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