



ČASOPIS UDRUŽENJA ANESTEZISTA
REANIMATORA I TRANSFUZISTA SRBIJE



ANESTEZIJA
REANIMACIJA
TRANSFUZIJA

BEOGRAD
2014

Časopis udruženja anesteziologa, reanimologa i transfuzista Srbije

Glavni i odgovorni urednik:

Dragoslav Itov

Uređivački odbor:

Draga Udovica
Radivoje Milovanović
Ninoslav Stojković

Recenzenti:

Prof. dr sc med. Bela Balint
Dr sc med. Snežana Jovanović Srzentić
Puk. Prof. dr sc med. Predrag Romić
Puk. Prof. dr sc med. Nikola Filipović
Prof. dr sc med. Maja Šurbatović
Dr sc med. Gradimir Bogdanović
Prim. dr sc med. Slađana Anđelić
Prim. dr med. Snežana Petrović
Prim. dr sc med. Dušan Vučetić
Prim. dr sc med. Zoran Stanojković

Časopis izlazi kao dvobroj:

Tiraž : 300

Štampa:

Grafolik, Beograd

Predsednik Udruženja:

Draga Udovica

Izdaje:

Udruženje anesteziologa, reanimologa
i transfuzista Srbije
Beograd, Crnotravska 17

**S A D R Ź A J****STEM CELLS – CRITICAL
HEMOBIOLOGICAL****ASPECTS AND CLINICAL PRACTICE**

Bela Balint and Milena Todorovic 9

ZNAČAJ PROTOČNE CITOMETRIJE U**ISPITIVANJU TROMBOCITA**

Dušan Vučetić, Bela Balint, Danilo Vojvodić 23

PRINCIPI PRIPREME KONCENTRATA**TROMBOCITA**

Zoran Stanojković, Ana Antić, Lana Mačukanović

Golubović, Mirjana Stanojković, Marija Jelić 33

PRIMENA GEL AGLUTINACIONE TEHNIKE U**PRETRANSUZIJSKIM ISPITIVANJIMA**

Ana Antić, Zoran Stanojković, Lana Mačukanović

Golubović, Marija Jelić, Mirjana Stanojković 43

ANALIZA PETOGODIŠNJEG RADA NA**PRIKUPLJANJU I OBRADI KRV I U INSTITUTU****ZA TRANSFUZIOLOGIJU VMA**

Rajko Graovac, Dušan Vučetić, Nemanja Borovčanin,

Bela Balint 47

PROMOCIJA REGISTRA DAVALACA**KOSTNE SRŽI - ISKUSTVA SLUŽBE ZA****TRANSFUZIJU KRV I LOZNICA**

Jasmina Rangelov Kulezić, Tomislav Mijić,

Zorana Andrić 51

ZNAČAJ ZBRINJAVANJA DISAJNOG PUTA**KOD TRAUMATIZOVANOG PACIJENTA –****POVREDE LICA I VRATA**

I. Krstić Lečić, M. Veljović, M. Stevović, K. Mladenović,

I. Udovičić, A. Popadić 55

INHALACIONA POVREDA

K. Mladenović, M. Veljović, I. Krstić -Lečić, B. Kojičić,

S.Bajić-Batalo 59

PREHOSPITALNA NADOKNADA VOLUMENA**KOD TRAUMATIZOVANIH PACIJENATA**

M. Veljović, A. Milovanović, A. Popadić, I. Udovičić,

M. Stevović, B. Milutinović 63

TRAUMA I ANESTEZIJA

B. Đorđević, M. Veljović, J. Obradović, A. Popadić,

I. Udovičić, A. Milovanović 67

TROMBOEMBOLIJSKE KOMPLIKACIJE KOD**TRAUMATIZOVANIH PACIJENATA**

I. Popović, M. Veljović, B. Djordjević, J. Obradović,

M. Stevović, I. Udovičić 71

SINDROM MASNE EMBOLIJE KOD**POLITRAUMATIZOVANIH PACIJENATA**

Jovana Obradović, Milić Veljović, Žaklina Spasić 75



UPUTSTVO AUTORIMA ZA PRIPREMANJE RADA

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

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

Časopis se štampa na srpskom jeziku, sa kratkim sadržajem prevedeni m 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 prazni h karaktera (spejsova) radi poravnanja teksta, već za to koristiti alatke za kontrolu poravnanja na lenjiru i Toolbars. Posle svakog znaka interpunkcije staviti samo jedan prazan karakter. Ako se u tekstu koriste specijalni znaci (simboli), koristiti font Symbol.

Rukopis rada dostaviti 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 reviziji 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 n - siranje, sakupljanje podataka ili generalno nadgledanje istraživačke grupe sami po sebi ne mogu opravdati autorstvo. Svi drugi koji su doprineli i z - radi rada, a koji nisu autori rukopisa, trebalo bi da budu navedeni u zahvalnici s opisom njihovog rada, naravno, uz pisani pristanak.

Kratak sadržaj – SAŽETAK: Uz originalni rad, saopštenje, prikaz bolesnika, pregled iz literature, rad iz istorije medicine i rad za praksu, na posebnoj stranici treba priložiti kratak sadržaj rada obima 200-300 reči. Za originale radove kratak sadržaj treba da ima sledeću strukturu: uvod, cilj rada, metod rada, rezultati i zaključak. Svaki od navedenih segmenata pisati kao poseban pasus, koji počinje



boldovanom reči "Uvod", "Cilj rada", "Metod rada", "Rezultati" i "Zaključak". Navesti najvažnije rezultate (numeričke vrednosti) statističke analize i nivo značajnosti.

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

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

Na sledećoj stranici priložiti kratak sadržaj na engleskom jeziku (Abstract) sa ključnim rečima (Key words), i to za radove u kojima je obavezan kratak sadržaj na srpskom jeziku, koji treba da ima 200-300 reči. Apstrakt na engleskom treba da ima istu strukturu kao i kratak sadržaj na srpskom.

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

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

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

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

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

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

Za nazive lekova koristiti isključivo generička imena. Uređaji (aparati) se označavaju trgovačkim nazivima, a ime i mesto proizvođača treba navesti u obliku zagrada. Ukoliko se u tekstu koriste oznake koje su spoj slova i brojeva, precizno napisati broj koji se javlja kao 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 grafikonima i drugim priložima, budući da se u njima navodi i prevod na engleskom jeziku, decimalne brojeve pisati sa tačkom (npr. u tekstu će biti $12,5\pm 3,8$, a u tabeli 12.5 ± 3.8). Kad god je moguće broj zaokružiti na jednu decimalu.

Jedinice mere: Dužinu, visinu, težinu i zapreminu (volumen) izražavati u metričkim jedinicama (metar – m, kilogram – kg, litar – l) ili njihovim delovima. Temperaturu izražavati u stepenima Celzijusa ($^{\circ}\text{C}$), količinu supstance u molima (mol), a pritisak krvi u milimetrima živinog stuba (mm Hg). Sve rezultate hematoloških, kliničkih i biohemijskih merenja navoditi u metričkom sistemu prema Internacionalnom sistemu jedinica (SI).

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

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

Tabele: Tabele se označavaju arapskim brojevima po redosledu navođenja u tekstu, sa nazivom na srpskom i engleskom jeziku. Tabele raditi isključivo u programu Word, kroz meni Table – Insert – Table, uz definisanje tačnog broja kolona i redova koji će činiti mrežu tabele. Desnim klikom na mišu – pomoću opcija Merge Cells i Split Cells



– 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 poleđini 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 odštampane 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 po dršku. Finansijska i materijalna pomoć, u obliku sponzorstva, stipendija, poklona, opreme, lekova i drugo, treba takođe da bude navedena.

Literatura: Reference numerisati rednim arapskim brojevima prema redosledu navođenja u tekstu. Broj referenci ne bi trebalo da bude veći od 30, osim u pregledu iz literature, u kojem je dozvoljeno da ih bude do 50, dok za vodiče kliničke prakse broj referenci nije ograničen. Broj citiranih originalnih radova mora biti najmanje 80% od ukupnog broja referenci, odnosno broj citiranih knjiga, poglavlja u knjigama i preglednih članaka manji od 20%.

Izbegavati korišćenje apstrakta kao reference, a apstrakte starije od dve godine ne citirati. Reference članaka koji su prihvaćeni za štampu treba označiti kao "u štampi" (in press) i priložiti dokaz o prihvatanju rada.

Reference se citiraju prema tzv. vankuverskim pravilima (Vankuverski stil), koja su zasnovana na formatima koja koriste National Library of Medicine i Index Medicus. Naslove časopisa skraćivati takođe prema načinu koji koristi Index Medicus (ne stavljati tačke posle skraćenica!). Za



radove koji imaju do šest autora navesti sve autore. Za radove koji imaju više od šest autora navesti prva tri i et al. Stranice se citiraju tako što se navede početna stranica, a krajnja bez cifre ili cifara koje se ponavljaju (npr. od 152. do 157. stranice navodi se: 152-7).

Prilikom navođenja literature treba se pridržavati pomenutog standarda, jer je to vrlo

bitan faktor za indeksiranje prilikom klasifikacije naučnih časopisa. Pravilnim navođenjem literature Srpski arhiv bi dobio na kvalitetu i bolje bi se kotirao na listi svetskih naučnih časopisa.

Primeri:

1. Članak u časopisu:

Maisch B, Seferovic PM, Ristic AD, et al. Guidelines on the diagnosis and management of pericardial diseases. Executive summary. 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 svakog 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 ljudima ili imenovanje ljudi koji su doprineli izradi rada.

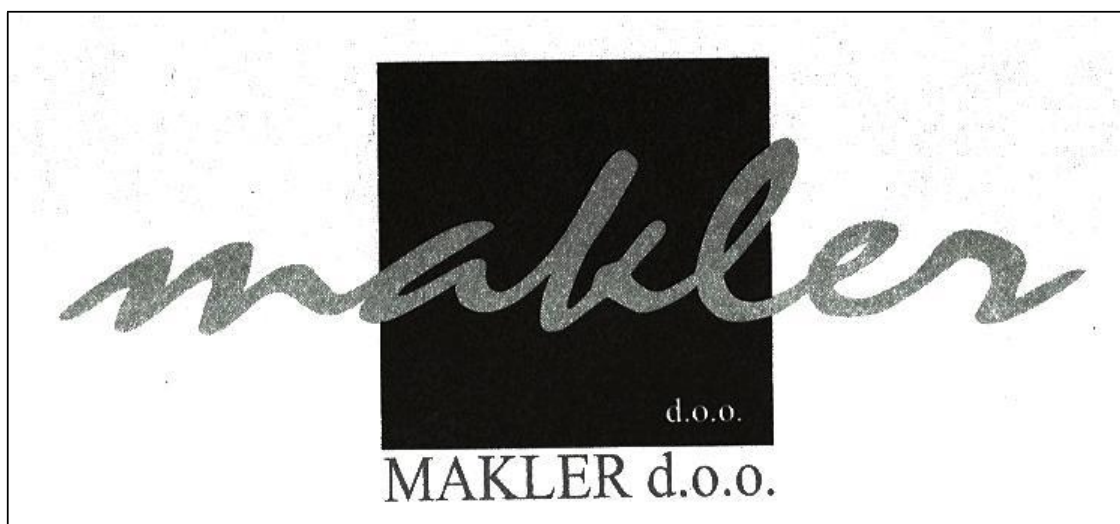
Slanje rukopisa: Rukopis rada i svi prilozi uz rad dostavljaju se u tri primerka, zajedno sa CD - om na kome je snimljen identičan tekst koji je i na papiru. Rad se šalje preporučenom pošiljkom (ili donosi lično u Uredništvo) na adresu: Udrženje anestezišta, reanimatora i transfuzista Srbije, ul. Svetog Save 39, 11000 Beograd, sa naznakom za časopis ANESTEZIJA, REANIMACIJA, TRANSFUZIJA, ili e-mailom glavnom uredniku časopisa.

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.

Adresa:

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

E-mail: udruzenjeart@gmail.com
Telefon glavnog urednika: 011 3615-015





STEM CELLS – CRITICAL HEMOBIOLOGICAL ASPECTS AND CLINICAL PRACTICE

Bela Balint^{1,2} and Milena Todorovic^{3,4}¹Institute for Medical Research, University of Belgrade, Serbia; ²Institute for Transfusiology of MMA, Belgrade, Serbia; ³Clinic for Hematology, Clinical Center of Serbia, Belgrade, Serbia; ⁴School of Medicine, University of Belgrade, Belgrade, Serbia.**Abstract**

The hematopoiesis is a continuous and complex event in which blood cells from a small number of stem cells (SCs) are produced through proliferation and differentiation. A complex network of interactive matters and factors organize the toti/pluri/multipotent SC survival, maturation and multiplication. Namely, differentiation and proliferation of SCs in the bone marrow (BM) are regulated by the extracellular matrix and micro-environment provided by stromal cells. These cells – including macrophages, fibroblasts, dendritic, endothelial and other cells – stimulate hematopoietic SCs by producing growth factors like Flt3-ligand, stem cell factor or c-kit-ligand, various interleukins, granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF), granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF). Other cytokines secreted by stromal cells regulate the adhesion molecules positioned on SCs, allowing them to remain in the BM or migrate to an area where the respective cell type is needed. Thus, hematopoietic SCs could be defined as cells capable for self-renewal with high proliferative capacity and extensive potential to differentiate into all blood cells or numerous somatic cell types (so-called SC plasticity due to "dedifferentiation" and/or "transdifferentiation") such as osteocytes, chondrocytes, hepatocytes, myocytes, cardiomyocytes and even endothelial cells.

Key words: stem cell, biology, transplantation, clinical indications.

Introduction

Adult totipotent, pluripotent and multipotent stem cells (SCs) give rise to repopulation of recipient's BM (engraftment) with subsequent complete, stable and long-term reconstitution of hematopoiesis. In addition, they are also capable of colonizing different tissues (homing) (1–9). Thus, initial experimental and clinical studies showed that "implantation" of autologous SCs into damaged and/or ischemic area induces their homing and subsequent "transdifferentiation" into the cell lineages of host organ, including collateral vessel formation. Angiogenic growth factors (or genes encoding of these proteins) promote the development of collateral arterioles, and the process is called as "therapeutic angiogenesis" or "neovascularization" (6–16).

In a few words, SC transplant involves the administration of high-dose radio-chemotherapy and (re)infusion of collected cells in order to obtain an abolition of disease, as well as to get hematopoietic reconstitution and general clinical improvement of patient. SC transplant with reduced-intensity conditioning (RIC) can be offered to patients who are ineligible for high-dose conditioning because of their age or comorbidities (17–19). Malignant hematolo-

gical diseases have so far been the most common indication of this new treatment modality; it has been less often used for nonmalignant diseases. Nowadays BM and peripheral blood (PB) SC transplants are more common in adult allogeneic or autologous setting. Umbilical cord blood (UCB) transplants have provided hopeful results in pediatrics mainly when a matched unrelated SC donor is unavailable (20–24).

Therefore, in practice for therapeutic use SCs can be collected by: (a) multiple aspirations from BM; (b) cell harvesting by apheresis from peripheral blood after mobilization with chemotherapy and/or growth factors (rHuG-CSF), and (c) purification by processing from UCB. SCs collected from the stated sources can be clinically applied (transplanted) immediately following harvesting (allogeneic setting) or after a short-term storage in liquid state or a long-term storage in frozen condition – cryopreservation (autologous setting) (2, 5, 6, 25–29).

Bone marrow derived stem cells

Historically, BM was the first source of SCs for transplant in experimental and clinical setting (30–35). A marrow harvest is the same for an al-



logeneic donor as for an autologous patient. SCs are collected by multiple aspirations from the posterior and anterior iliac crest and (seldom) from sternum. The posterior iliac crest provides the richest site of marrow. The procedure is performed under sterile conditions in the operation room, while the donor is generally anesthetized. In order to provide required number of nucleated cells (TNCs), that is $\geq 3 \times 10^8/\text{kg}$ of body mass (kgbm), around 200 aspirations are required, where single aspirate volume is 2 – 5 mL. Immediately after the collection, cell aspirate should be filtered in order to remove bone and lipid tissue particles and/or cell aggregates. Anticoagulation is provided using solution containing citrate and by heparin diluted in saline (5000 IU/500 mL), using autologous plasma or one of the cell culture medium for resuspension of collected cells (5, 6, 25, 26).

The target dose of collected marrow is 10 – 15 mL per kgbm. Thus, the volume of aspirate is relatively large (800 – 1000 mL) and it contains a high count of red blood cells. Accordingly, in order to prevent of anemia in donors, blood for autologous transfusion (to carry out during SC collection) should be collected around one week before SC collection and transplant (36).

On the other hand, of aspirate volume, precisely red blood cell number and/or plasma quantity reduction is required (by processing), especially for ABO incompatible (major and/or minor) transplants or when cryopreservation is intended (autologous setting). A commonly used minimum target (after processing) of TNC count – for both autologous and allogeneic transplants – is $2 \times 10^8/\text{kgbm}$ (26, 36). The depletion of unwanted malignant cells or T-cells in final cell suspension is achieved by the *ex vivo* purging procedure using immunomagnetic cell selection (6). These SC purification procedures (processing and purging or selection) enable reduction of the aspirate volume, i.e. reduction of red blood cell for around 80 – 90%, or even more precisely, the depletion of mentioned unwanted (malignant or T-cells) cells with efficacy $\geq 3 - 4 \text{ Log}_{10}$ (3–6, 36). Development of the ability to isolate selected SCs and/or *ex vivo* expanded them in a large numbers is expected to broaden their beneficial therapeutic effects, since the limitation to many of SC applications has been the absolute number of defined target cells.

Peripheral blood derived stem cells

CD34 is the cluster designation given to a transmembrane glycoprotein present on SC surface and some stromal cells. Cells expressing the CD34 antigen (obtained from BM or PB) are capable of complete reconstitution of hematopoiesis. The first SC harvests from PB were accomplished in "steady state hematopoiesis" – but using numerous (6 to 9) collections and following cryopreservation was needed (32, 37). Currently, SCs are harvested after mobilization by the use of chemotherapy and/or recombinant colony-stimulating factors (rHuG-CSF). The typical number of aphereses required is not more than one to three.

Briefly, SC harvesting from PB is performed by blood cell separators. The apheretic procedure is completely automated – uniform protocols are applied, with respect to the required standardization of the collected SC product. During apheresis, anticoagulation is achieved by ACD (solution A, USP). In allogeneic setting venous access is commonly realized through peripheral (antecubital) veins. However, for autologous donors – particularly for them who have received repeated chemotherapy – SC harvest should be performed across central venous access to circulation. Catheter-associated thrombosis is the most frequent possible complication. Also, there is around one percent hazard of the event of other complications associated with these catheters including infection, bleeding or pneumothorax. Thrombocytopenia has been reported as a complication of rHuG-CSF administration and SC collection in healthy donors (5, 36).

Nowadays peripheral blood have largely replaced marrow as the source of SCs. The PB derived SC transplant is characterized by: (a) less invasive cell collection procedure; (b) absence of the risk of bone infections, general anesthesia and work in the surgical division; (c) faster hematopoiesis reconstruction; (d) lower cell suspension volume (250 – 300 mL) and (e) absence or smaller level of contamination with tumor cells than in marrow aspirate. Clinical data comparing allogeneic peripheral blood vs. marrow transplants from HLA-identical siblings have also shown that peripheral blood derived SC recipients have faster engraftment, improved hematopoietic and immune reconstitution, lower transplant related morbidity (TRM), and a similar incidence of acute GvHD. Earlier studies reported a higher risk of chronic GvHD in allogeneic peripheral blood SC



recipients. However, a recent prospective randomized study found no difference in the incidence of this complication (36–40).

Due to the mentioned reasons, the number of patients treated by SCs harvested from PB is ever increasing worldwide, especially in autologous SC transplant setting. In order to obtain adequate SC yield, allogeneic donors are given rHuG-CSF 5 – 10 µg/kgbm per day. The count of CD34⁺ cells in the circulation begins to rise after 3rd day, and peaks following 5 – 6 days of rHuG-CSF administration. In autologous setting, patients are given higher rHuG-CSF dose (10–16 µg/kgbm daily) (6, 38–40).

In allogeneic setting, the first apheresis is performed typically on the 5th day of the rHuG-CSF application. The determination of optimal timing of an autologous SC harvesting is more complex and controversial. It is suggested that the optimal time to begin autologous SC collection when the leukocyte count exceeds 5–10x10⁹/L. However, the leukocyte count commonly does not correlate with the CD34⁺ number. The count of circulating CD34⁺ cells evidently correlate with the optimized collection timing, as well as with the superior CD34⁺ yield in harvest. Generally, at peripheral blood CD34⁺ count $\cong$ 10/µL, expected SC yield $\cong$ 1x10⁶ per kgbm. It is also presented that for a CD34⁺ $\geq$ 20 – 40/µL of peripheral blood the possibility of the CD34⁺ $\geq$ 2.5x10⁶ per kgbm is 15% using one standard apheresis, and 60% after one large-volume SC harvesting (36, 38).

The target mononuclear cell count in harvest should be 314x10⁸ per unit, that is $\geq$ 2–4x10⁸ per kgbm, and CD34⁺ cells should be 330x10⁶ per unit or $\geq$ 2–4x10⁶/kgbm of the recipient in order to expect successful transplant. However, recent data support a benefit associated with greater CD34⁺ yield ($\geq$ 5x10⁶/kgbm) compared to the minimum required cell quantity for engraftment ($\geq$ 1 x 10⁶/kgbm) in autologous setting. Finally, results obtained in our SC transplant center confirmed that large-volume apheresis is efficient (CD34⁺ $\geq$ 5x10⁶/kgbm) if the circulating CD34⁺ count was around 40 – 60/µL after mobilizing regiment (6, 38). Although are generally accepted, the stated values of SC yields cannot guarantee stable and long-term BM repopulation after transplant. In order to achieve them, the following issues are needed: (a) quantity of processed blood $\geq$ 2 – 4 of patient's circulating blood volume per one apheresis (large-volume leukapheresis), that is

around 12 – 25 L for person with around 70 – 80 kgbm, and/or (b) apheretic procedures should be performed one to two (occasionally three) times in the average (5, 38–40).

Selection of CD34⁺ cells is associated with a reduction of count of tumor cells (autologous) or T-cells (allogeneic) in harvest. Since peripheral blood has become the major source of mobilized SCs for allogeneic transplant – but with high-level mononuclear cell contamination – effective technologies for unwanted cell depletion were developed to reduce the risk of disease recurrence or GvHD. The use of "positive" or "negative" immunomagnetic cell selection has been shown to be the most effective method to achieve $\geq$ 3 – 4 Log₁₀ depletion of tumor or T-cells, while preserving the high number of CD34⁺ cells in the harvest. Namely, the CD34⁺ cell recovery (CD34⁺ count in comparison with the number present before selection) should be at least 50 – 70% and cell purity (ratio of CD34⁺ vs. mononuclear cells) around 70 – 90% or more (5, 6, 36).

Patients who have been earlier treated with high-dose cytostatics may be poor responders to SC mobilization protocol with rHuG-CSF plus chemotherapy. The most efficient approach to obtain a sufficient SC yield in harvest from poorly mobilized patients is undetermined still. Simultaneously harvesting of SCs from BM and PB not have been improved engraftment rate significantly. Mobilization with rHuG-CSF alone is perhaps more effective than rHuG-CSF plus chemotherapy for obtaining adequate CD34⁺ yield (36). Increased doses of rHuG-CSF or polyethylene glycol-conjugated G-CSF (Pegfilgrastim), as well as the use of rHuG-CSF plus IL-3 or CXCR4-inhibitor (Plerixafor) protocols has also effectively mobilized some autologous donors (41–44). Finally, application of the mobilization regimens and/or apheresis may result in donor discomfort and several immediately (bone pain, agrypnia and lassitude) or delayed adverse events – but the side effects were rare and manageable (36, 44–46).

Umbilical cord blood derived stem cells

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



neic transplant, mainly in patients who lack HLA - matched donors of BM or PB derived SCs (20 – 25).

UCB is a relatively rich in "more primitive" SCs that can be used not only to reconstitute the hematopoietic system, but have the potential to give rise to non-hematopoietic cells (myocardial, neural and endothelial cells, etc) by transdifferentiation. The "naïve" nature of UCB lymphocytes also permits the use of HLA-mismatched grafts at 1 – 2 loci without higher risk for severe GvHD relative to BM transplant from a full matched unrelated donor. On the other hand, UCB is rich in primitive NK cells, which possess impressive proliferative and cytotoxic capacities and can be induced Graft versus Leukemia (GvL) effect. The use of UCB is an accepted cell source for pediatric patients for whom smaller cell count is enough for engraftment, and for whom a matched unrelated allogeneic BM or peripheral blood SC donor is unavailable. However, a higher risk of graft failure was noticed in children weighing ≥ 45 kg. Since the number of SCs in UCB is limited and the collection can occur only in a single occasion – its use in adult patients can be more problematic (22–25, 36).

UCB volume is typically 100 mL (range 40 – 240 mL) with a TNC count $\approx 1 \times 10^9$ and $CD34^+$ approximately 3×10^6 per unit. UCB can easily be cryopreserved, thus allowing for the establishment of HLA-typed SC banks. Because UCB derived SC banking requires high financial investment and organizational efforts, banking efficiency should be optimized. An important determinant of banking efficiency is the ratio of collections that can be cryopreserved and supplied for transplant. Although there were reasons for removing UCB units that may be less amenable to improvement, such as low volumes and low cell counts, a number of obstetric factors influencing the outcome of collections could be evaluated further, including the time of cord clamping, length of gestation, length of labor, the newborn's body weight, and the weight of the placenta (24, 36).

Autologous SC transplants

When is BM appropriate to use as source of SCs for autologous resuscitation following myeloablative radio-chemotherapy or RIC depends on the marrow general state and/or infiltration with malignant cells. Fibrosis makes marrow not possible for SC collection by aspirations. Tumor cell infil-

trates eliminate marrow as a transplant source as well. Prior pelvic irradiation, poor anesthesia risk, obesity, or patient refusal of marrow collection can limit marrow as an option. Mobilized autologous SCs from PB are commonly used in the above situations and in heavily treated patients. This procedure is nowadays in routine clinical practice and provides more progenitor cell yield than conventional marrow harvest and therefore earlier engraftment, that is a faster hematopoietic recovery. Primarily for this reason, transplant of PB derived SCs has practically replaced BM transplant in an autologous setting. As mentioned, autologous PB harvests involve mobilizing the SCs from the patient's BM compartment into the circulation using different growth factors, typically in combination with chemotherapy prior to collection. Once in the circulation, the SCs are collected by apheresis – conventional or large-volume leukapheresis (6, 38).

Allogeneic SC transplants

Transplant of allogeneic SCs are indicated in the treatment of patients with malignant disease - if they have HLA-matched donors. For patients with immunodeficiency, marrow failure, metabolism disorders, etc, the use of allogeneic SCs is imperative. However, there are also some atypical data related to treatment of severe aplastic anemia using autologous SCs (40). Allogeneic transplant is associated with a risk that immunocompetent donor cells will react against recipient tissues (GvHD), despite immunosuppressive therapy administered. In adult "related allogeneic setting", the best results are obtained using completely HLA-matched (HLA-identical, i.e. six-antigen matched donor/recipient pairs) transplants. There is a 25% chance of a sibling being a complete match, a 50% chance of a haplotype match, and a 25% chance of a complete mismatch. Pediatric patients are more tolerant of partially mismatched graft (1–4, 36).

Data obtained up till now has shown that the use of SC donor registers can successfully recruit unrelated donors for collection of BM or PB derived SCs. Thus, matched unrelated donor searches can be initiated for approximately 70% of candidates without sibling donor. These protocols have possible benefit since higher engraftment potential of allogeneic vs. autologous SCs and following earlier hematopoietic reconstitution, as well as occurrence of GvL effect (36, 47). For definitive choice, additional



experimental and clinical trials for comparison of efficacy and outcome of autologous vs. allogeneic (related or unrelated) BM vs. PB derived SC transplant are required.

Syngeneic and haploidentical SC transplants

Finally, seldom recipient has an identical twin – a syngeneic transplant is optimal because the donor and recipient cells are genotypically identical (the first transplants performed in humans) (39). On the other hand, syngeneic grafts do not induce graft vs. tumor, that is GvL effect in recipient. Our knowledge of the immunobiology of SC transplant across major histocompatibility complex (MHC) barriers – haploidentical transplants – has increased significantly over the past decades. The key reason (or limitation) for realization potential haploidentical SC transplant is the absence of a HLA-matched related donor in the majority of families. On the other hand, the conversion of a new hypothetical therapeutic option into the routine haploidentical SC transplant clinical practice is accepted and developed more slowly. The most critical complications of SC transplants across HLA-barriers, are the graft rejection and/or occurrence of GvHD. However, these adverse event maybe could be successfully prevented and treated using current pharmacologic approaches or manipulations during the haploidentical hematopoietic grafting process (1).

The clinical use of SCs – conventional transplant setting

High-dose chemotherapy with allogeneic transplant or autologous SC support is a well-defined indication and standard approach in the treatment of presented malignancies and different benign diseases/disorders. The efficacy of SC transplant depends on the type of disease, its stage and sensitivity for radio-chemotherapy, age and general condition of the patient, and level of donor and recipient HLA-matching. However, an impressive advance in SC transplant outcome obtained when scientifics and clinicians recognized that SC transplants were most effective when used early in the disease course, rather than as a "last-option treatment". During the past decades, various diseases and disorders have been treated by SC transplants. Namely, different types of leukemia and additional hematologic malignancies, severe aplastic anemia and other BM failure states, immune deficiencies, some congenital disorders of

metabolism, several solid cancers, as well as autoimmune disorders were the main indications for the therapeutic use of SCs (1, 36).

Since 1996. (European Group for Blood and Marrow Transplantation) EBMT published special reports on the indications for the hematopoietic SC transplant in the current practice. Autologous and allogeneic SC transplant are now actual treatment options and have been incorporated in therapeutic algorithms for many diseases (48). The EBMT recommendations are based on existing Clinical trials with guidance which must be considered together with disease risk factors, as well as the risk of the transplant procedure. Accordingly, conditioning regimens vary in their intensity and are classified as standard, RIC or intensified.

As stated, there are standard, potential (clinical optional and developmental) and usually non recommended indications for SC transplants. Standard indications can be performed in any specialized centre with experience with SC transplant procedures defined by EBMT and JACIE (Joint Accreditation Committee EBMT-ISCT) guidelines (49). The category – clinical optional is the most difficult category and should be performed in a specialist centre with major experience with SC transplants. It encompasses many rare disorders and the paucity of data relating to transplant, variability in transplant procedures and the contribution of many patients risk factors such as comorbidities. The third category – developmental are this when there is a little experience, like in some autoimmune diseases. Finally, generally non recommended category, includes SC transplant in early stages of disease when results of conventional treatment do not normally justify the additional risk of transplant related mortality (TRM) or when the disorder is so advanced that the possibility of clinical success is minor. For example, it can be blast crisis of chronic myeloid leukemia (CML).

Acute leukemia

Acute myeloid leukemia. Acute myeloid leukemia (AML) is heterogeneous clonal disease of hematopoietic progenitor cells which lose the ability for differentiation and for response to normal regulators of proliferation. Induction chemotherapy is necessary for induce complete remission (CR) in AML. Postinduction chemotherapy is aimed to eradicate/reduce residual disease. Com-



bined chemotherapy induces CR in an average 60 – 80% of adult patients aged less than 60 years. After achieving remission, further chemotherapy is needed to prevent disease relapse. Postremission therapy for patients under the age 60 includes chemotherapy or SC transplant. Generally, SC transplant is performed after 2 or 3 cycles of chemotherapy. Patients are stratified into 3 main risk factors based on cytogenetics, molecular biology and response to induction chemotherapy. About 40 – 50% adult AML patient have normal karyotype as intermediate risk factor. Unfavorable prognosis is associated with several entities including Wilms tumor gene 1, bcl-2, bax, the brain and acute leukemia cytoplasmic gene (BAALC), FMS-like tyrosine kinase-3 (FLT3), MLL (mixed lineage leukemia gene). Some mutations of specific genes confer a more favorable prognosis, like mutations in the CCAT enhancer binding protein- α (C/EBP- α), CEBPA, and nucleophosmin NPM1 (50).

As concerning autologous SC transplant, better outcome is achieved when cells are harvested after the second or third course of chemotherapy. There are several advantages over allogeneic SC transplant, because matched donor is not needed, without risk of complications such as graft versus host disease GvHD. Also, immunological reconstitution is much faster and more complete. The major disadvantages are higher relapse rate due to lack of graft-versus leukemia (GvL) effect and the contamination of graft with leukemic cells. In high risk AML the role of autologous SC transplant is minimal, since the final clinical outcome is bad. The data of the Acute Leukemia Working Party (ALWP) registry indicate results as followed: leukemia free survival (LFS) 43%, overall survival (OS) 51%, response rate (RR) 53% (51).

Allogeneic SC transplant has had a extreme relevance in AML, since so many patients have been cured. In the last ten years it has been showed that the results of matched unrelated donor (MUD) transplants are improved, as well as the results of cord blood transplantations. The age limit (>60 years) remains, but older patients are increasingly considered for a transplant and RIC protocols. Transplant procedures consist of several steps, first reducing the tumor burden by conditioning regimen (3 – 4 Log), immunosuppression as the prevention of GvHD, as well as the prevention therapy of infections due to neutropenia. The HLA barrier remains the most important factor, so the best results are those using an HLA compat-

ible family donor. HLA compatible sibling transplant is standard reference for any other transplant. The results for AML patients transplanted in CR1 (first complete remission) give a probability of LFS from 45 – 70% (52). The relapse rate is approximately 20 – 25%. Additionally, MUD transplant represents the major effort of transplant centres in last decade. Now, there are more than 10 million potential donors. The continuous improvement of HLA typing is associated with improved results.

Current strategies in the treatment of AML patients suggest that for poor risk patient, allogeneic SC transplant in CR1 is the only best solution. For intermediate risk patients, who represent the majority of AML patients allogeneic SC transplant probably represents the best option if a HLA matched sibling donor is available. Chemotherapy is not inferior to transplant in good risk patients. Acute promyelocytic anemia is never recommended for transplant if the PCR for PML-RAR α is negative, and chemotherapy is optimal treatment option.

Acute lymphoblastic leukemia. Hematopoietic SC transplant has important role in the treatment for acute lymphoblastic leukemia (ALL) patients. Although, indications for SC transplant in first CR scheduling and procedures are still not completed yet. Most European ALL study groups define an indication for SC transplant in patients with unfavourable prognosis with survival probability less than 40% with chemotherapy alone (53). Due to the poor outcome with intensive chemotherapy, SC transplant has always been the therapy of choice for Ph⁺ ALL. Nowadays the majority of these patients receive imatinib as front line therapy, without no increase in TRM if SC transplant is performed thereafter. The survival after allogeneic SC transplant in first CR is 27 – 65% (54). The presence of detectable minimal residual disease (MRD) beyond first consolidation chemotherapy provides an important new indication for SC transplant. There is a general agreement that all patients in 2nd or later CR are candidates for SC transplant. This includes molecular relapse, which represents the reappearance of MRD above 10^{-4} to 10^{-3} . Recommendation of Germall Multicenter study Group for Adult ALL (GMALL) are given according to risk adapted approach. For high risk patients allogeneic SC transplant (allogeneic sibling or allogeneic MUD) is recommended. Controversy is doing of allogeneic SC



transplant in MRD negative patients. In standard risk patients, priority is allogeneic SC transplant in molecular non-responders. Therefore, in patients with 2nd CR, allogeneic SC transplant is necessary

Myelodysplasia

Myelodysplasia (MDS) consists of a heterogeneous group of clonal stem cell disorders. The spectrum of MDS varies from a disease with an indolent course over several years to a form with rapid progression to AML. Disease is characterized by deficiency of hemopoiesis associated with severe cytopenias, leading frequently to acute leukemia. The majority of MDS patients are older than 60 years. For this patient supportive care, including new biologic response modifiers, is the mainstay of therapy. A therapeutic dilemma exists in MDS, due to the multifactorial etiopathogenesis and various stage of the disease, as well as elderly age of patients at diagnosis. The therapeutic approach vary from low-intensity treatment plus supportive therapy to intensive chemotherapy combined with SC transplant. High-intensity therapies generally aims to alter the disease's natural history - improving survival, and decrease progression to acute leukemia - and are mainly used for high-risk disease. However, unfortunately most patients with MDS are too old to be considered for intensive treatment, such as SC transplant (36). In older age comorbidities are common, so the RIC regimens have been widely used in MDS (55). In a multivariate analysis, the 3 year relapse rate was significantly increased after RIC, but the 3-year non-relapse mortality was decreased (56).

Myeloproliferative disorders

Chronic myeloid leukemia. CML is a rare disorder with incidence of 1 to 2 patients per 100,000 population each year. The translocation t(9;22) leads to chromosomal abnormality Ph chromosome which is present in more than 90% of this patients. Previously, the only curative option for CML patients was allogeneic SC transplant, and for unsuitable for SC transplant, interferon (IFN)- α with or without cytosine-arabioside.

Imatinib as tyrosine kinase inhibitor (TKI) is much more superior than previous therapies in terms of hematological, cytogenetic and molecular genetic responses (57). However a significant minority of patients (15 – 20%) will fail to achieve

complete cytogenetic responses, or proportion of 15 – 20% will lose their response (58). The allogeneic SC transplant would be second line therapy for that group of patients (59). Also, there are the new generations of TKI like nilotinib or dasatinib used in terms of resistance on first generations of TKI (60).

The decision regarding the use of allogeneic SC transplant must now take into consideration prognostic factors like age, duration of CML, nature of donor stem cells, but also the response to TKI. Within the EBMT recommendations, allogeneic SC transplant from sibling and well matched donors remains a standard of care for the chronic and accelerated phases of CML, representing the only curative treatment for CML. Data relating to the incidence and risk of relapse after allografting were derived from qualitative RT-PCR for bcr-abl transcript. But, positive MRD for years post-transplant without clinical progression may not always herald relapse. Donor lymphocyte infusion (DLI) have become the therapy of choice for patients who relapse after allogeneic SC transplant especially for patients transplanted and relapsing in chronic phase (47, 61). Comparing the use of imatinib to DLI in this group of patients who relapsed after allogeneic SC transplant (31 pt), molecular remission is even better in the patients who received TKI (62).

Other myeloproliferative disorders. In other myeloproliferative disorders (MPD) including primary osteomyelofibrosis (OMF), myelofibrosis secondary to polycythemia vera (PV) and essential thrombocythemia (ET), allogeneic SC transplant can be therapeutic option, but in concern into risk factors and the course of disease (63). The allogeneic SC transplant should only be considered in patients with intermediate and high risk scores for OMF, since their expected median survival is less than 2 years. In patients with PV and ET occurrence of marrow fibrosis is the main criterion for allogeneic transplant. The use of RIC regimens had less TRM and remission in 75% of the patients (64).

Chronic lymphoproliferative diseases

Hodgkin lymphoma. Newly diagnosed Hodgkin lymphoma (HL) although in advanced stage have good prognosis with standard chemotherapy. In patients with chemosensitive relapse or in second CR high dose therapy and autologous SC trans-



plant nowadays considered to be therapy of choice (65). Also, in primary refractory disease, autologous SC transplant is an option. Allogeneic SC transplant is still an experimental procedure for patients with relapsed or refractory HL (66).

High grade non-Hodgkin lymphoma. The outcome of patients with high grade non-Hodgkin lymphoma (NHL) is unsatisfactory with standard approaches (67). These patients may be candidates for front line high dose therapy (HDT) and autologous SC transplant, but in first relapse. Approximately half of this patient can be cured with immunochemotherapy, usually R-CHOP. In younger patients with relapsed or refractory chemosensitive disease, HDT can be curative in a significant subset. But in the era of anti-CD20 (rituximab) combining with chemotherapy, the role of autologous and allogeneic SC transplant is optional. Other strategy to improve the outcome of the patients are currently being explored. In Diffuse large B cell lymphoma (DLBCL) the addition of rituximab to pre and post transplant therapy is promising (68). The role of allogeneic SC transplant remains uncertain in high grade NHL. The use of RIC can reduce TRM but evidence of significant graft versus lymphoma is lacking.

Low grade non-Hodgkin lymphoma. Follicular lymphoma (FL) is by far the most common low grade lymphoma, accounting 20% of malignant lymphoma in adults, but 40% of all lymphomas diagnosed in Western Europe and USA. Based on FL international prognostic index (FLIPI), therapeutic outcome on standard immunochemotherapy is different (69, 70). The use of HDT with autologous SC transplant in the treatment of low grade NHL is not yet been established. The rationale for considering transplantation is that disease is incurable using standard therapies, and young patients will die of their disease. Using consolidation with autologous SC transplant in first remission demonstrated no statistically significant benefit in favour of first line autologous SC transplant in patients with FL, and it should be reserved for relapsed patients (70). As concerning allogeneic SC transplant, it is not recommended in first CR, since high rate of TRM and long disease course. It can be used in relapsed patients with RIC regimens, consisting of alemtuzumab, fludarabine and melphalan with short course cyclosporin as GvHD prophylaxis.

Multiple myeloma. Multiple myeloma (MM) is plasma cell disorder with incidence 4 – 5 cases per 100,000/year. It remains incurable with conventional therapies. New therapeutic agents like bortezomib as inhibitor of NF κ B, or immunomodulatory drugs, angiogenesis inhibitors, improved the disease course with and increase overall response rate $\geq 80\%$ (71). Although HDT followed by autologous SC transplant prolonged OS in comparison to standard therapy resulted in prolongation of the OS more than 10 years. This approach presents standard of care for younger patients with MM. Regarding tandem use of autologous SC transplant, its use will decrease, mainly due to the thalidomide maintenance (72). In high risk MM patients including cytogenetic (t(4; 14), t(14; 16), t(14; 20), del p53, del 13, hypodiploidy, complex karyotype) or those with progressive disease during induction therapy, the use of novel agents as bortezomib improved the clinical course of disease. In high risk patients, induction therapy followed by autologous SC transplant plus allogeneic transplant with RIC, represent an adequate clinical approach.

Aplastic anemia

Hypoplasia or aplasia of BM and extreme reduction of polymorphonuclear count in circulation are typical parameters for categorization of aplastic anemia (AA): very severe AA $< 0.2 \times 10^9/L$, severe AA (sAA) $0.2 - 0.5 \times 10^9/L$ and mild AA $> 0.5 \times 10^9/L$. Research data confirmed immune-mediated etiology of disease: (a) reduced hematopoietic progenitor cell quantity in BM; (b) elevated T cell count and interferon gamma (IFN- γ) production; (c) altered mesenchymal cells function, expressed in a decreased inhibitory effect upon T cells (40, 75).

The standard therapeutic approaches for AA are: the use of immunosuppressive therapy (IST), mainly for older individuals with mild AA, or allogeneic stem cell (SC) transplant, primarily for younger patients with. Usually BM is the source of allogeneic SCs and cells can be collected in the steady state hematopoiesis or following BM-priming (BM-activation) using rHuGM-CSF or rHuG-CSF in low doses (1–4, 36, 37).

Syngeneic bone marrow transplant in patients with severe aplastic anemia is rare, and usually requires pre-transplant conditioning to provide engraftment. We report on a patient with hepatitis-associated sAA who was successfully treated with syngeneic PB derived SC transplant after a series



of infectious and bleeding complications. This is the second case of successful syngeneic SC transplant in hepatitis-associated sAA in literature available (40).

The potential treatment by autologous SC transplant in sAA is still an innovative/pioneering therapeutic approach. Namely, majority of patients with sAA have residual hematopoietic SCs and could be successfully mobilized following initial IST and extended administration of rHuG-CSF (75, 76). The collected and cryopreserved cell could be afterwards clinically applied, that is reinfused for the treatment of sAA.

Finally, we presented experience with sAA patient, successfully treated by autologous SC transplant too. The objective of our research was to optimize of the mobilization/harvesting protocol/timing in order to obtain high CD34⁺ and especially a more primitive CD34⁺/CD90⁺ cell yield and recovery –with critical goal of improving conditions for complete and long-term hematopoietic reconstitution following transplant. Results obtained in this study, clearly confirmed that in sAA (with no allogeneic donor), autologous SC transplant can result in a complete and long-term medullar and hematological remission, as well as successful clinical outcome. To our best knowledge, it was the second published case of autologous SC transplant in sAA (40).

*

*

*

Although the incidence of TRM have decreased, SC transplants continue to pose multiple potential adverse effects and complications. The most frequent complications of SC transplants are even now engrafting failure, infections and acute or chronic GvHD. Despite the advances made since the earliest days of transplant therapy, graft failure following allogeneic SC transplant is still a life-threatening complication. Antibiotic prophylaxis to prevent infections and supportive blood component care to minimize TRMM are critically important components in management for all, but especially for patients with chronic GvHD. To decrease GvHD incidence, cell harvest can undergo for T-cell depletion and patients are treated prophylactically with a variety of immunosuppressive drugs. Less toxic transplants, in the form of RIC, are being actively investigated, with the promise of expanding indications for allogeneic

transplants. That is, SC transplant with RIC can be offered to patients who are disqualified for high-dose conditioning because of their age or comorbidities. A careful proactive assessment to identify, treat, and, hopefully, prevent adverse events is essential to a successful SC transplant.

REFERENCES

1. Hoffman R. Hematology basic principles and practice, 4th edition. New York: Churchill Livingstone; 2005.
2. Balint B, Radovic M, Milenkovic Lj. Bone marrow transplantation. *Vojnosanit Pregl* 1988; 45: 195–201.
3. Ho AD, Hoffman R, Zanjani ED. Stem cell transplantation. Biology, processing, and therapy. Weinheim: WILEY-VCH Verlag GmbH & Co.KgaA; 2006.
4. Bilko NM, Fehse B, Ostertag W, Stocking C, Zander AR. Stem cells and their potential for clinical application. Dordrecht: Springer; 2008.
5. Balint B. Stem and progenitor cell harvesting, extracorporeal "graft engineering" and clinical use – initial expansion vs. current dilemmas. *Clin Appl Immunol* 2006; 5(1): 518–27.
6. Balint B. Stem cells – unselected or selected, unfrozen or cryopreserved: marrow repopulation capacity and plasticity potential in experimental and clinical settings. *Maked Med Pregl* 2004; 58 (Suppl 63): 22–4.
7. Obradovic S, Rusovic S, Balint B, Ristic–Andelkov A, Romanovic R, Baskot B et al. Autologous bone marrow–derived progenitor cell transplantation for myocardial regeneration after acute infarction. *Vojnosanit Pregl* 2004; 61(5): 519–29.
8. Pavlović M, Balint B. The use of stem cells to repair cardiac tissue. *Anest Reanim Transfuziol* 2006; 34: 129–50.
9. Balint B, Stamatovic D, Todorovic M, Jevtic M, Ostojic G, Pavlovic M, et al. Stem cells in the arrangement of bone marrow repopulation and regenerative medicine. *Vojnosanit Pregl* 2007; 64(7): 481–4.
10. Makino S, Fukuda K, Miyoshi S, Konishi F, Kodama H, Pan J et al. Cardiomyocytes can be generated from stromal cells in vitro. *J Clin Invest* 1999; 103: 697–705.
11. Beltrami AP, Urbanek K, Kajstura J, Yan S–M, Finato N, Bussani R et al. Evidence that



- human cardiac myocytes divide after myocardial infarction. *N Engl J Med* 2001; 344(23): 1750–7.
12. Shintani S, Murohara T, Ikeda H, Uenoi T, Honma T, Katoh A, et al. Mobilization of endothelial progenitor cells in patients with acute myocardial infarction. *Circulation* 2001; 103: 2776–9.
 13. Templin C, Luscher TF, Landmesser U. Cell-based cardiovascular repair and regeneration in acute myocardial infarction and chronic ischemic cardiomyopathy – current status and future developments. *Int J Dev Biol* 2011; 55(4–5): 407–17.
 14. Flynn A, O'Brien T. Stem cell therapy for cardiac disease. *Expert Opin Biol Ther* 2011; 11(2): 177–87.
 15. Forraz N, McGuckin CP. The umbilical cord: a rich and ethical stem cell source to advance regenerative medicine. *Cell Prolif* 2011; 44 Suppl 1: 60–9.
 16. Fukumitsu K, Yagi H, Soto-Gutierrez A. Bioengineering in organ transplantation: targeting the liver. *Transplant Proc* 2011; 43(6): 2137–8.
 17. Craddock C, Barty P, Kreiter S, Johnston R, Apperley J, Marks D, et al. Short Report: Engraftment of T-cell-depleted allogeneic hematopoietic stem cells using a reduced intensity conditioning regimen. *Br J Haematol* 2000; 111: 797–800.
 18. Bethge WA, Faul C, Bornhäuser M, Stuhler G, Beelen DW, Lang P, et al. Haploidentical allogeneic hematopoietic cell transplantation in adults using CD3/CD19 depletion and reduced intensity conditioning: An update. *Blood Cells Mol Dis* 2008; 40(1): 13–9.
 19. Robinson SP, Sureda A, Canals C, Russell N, Caballero D, Bacigalupo A, et al. Reduced intensity conditioning allogeneic stem cell transplantation for Hodgkin's lymphoma: identification of prognostic factors predicting outcome. *Hematologica* 2009; 94(2): 230–8.
 20. Gluckman E, Broxmayer HE, Auerbach AD. Hematopoietic reconstruction in a patient with Fanconi anemia by means of umbilical cord from HLA identical sibling. *New Engl J Med*, 1989; 321: 1174–8.
 21. Rubinstein P, Dobrila L, Rosenfield RE. Processing and cryopreservation of placental/umbilical cord blood for unrelated bone marrow reconstitution. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1995; 92: 10119–22.
 22. Rogers I, Casper RF. Umbilical cord blood stem cells. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol* 2004; 18(6): 893–908.
 23. Cohen Y, Nagler A. Umbilical cord blood transplantation – how, when and for whom? *Blood Rev* 2004; 18(3): 167–79.
 24. Skoric D, Balint B, Petakov M, Sindjic M, Rodic P. Collection strategies and cryopreservation of umbilical cord blood. *Transfusion Med* 2007; 17(2): 107–13.
 25. Rowley SD. Secondary processing, cryopreservation, and reinfusion of the collected product. In: Kessinger A, McMannis JD, editors. *Practical considerations of apheresis in peripheral blood stem cell transplantation*. Lakewood: Cobe BCT Inc; 1994. p. 53–62.
 26. Rowley SD. Standards for hematopoietic progenitor cell processing. In: Brecher ME, Lasky LC, Sacher RA, Issitt LA, editors. *Hematopoietic progenitor cells: processing, standards and practice*. Bethesda: AABB Press; 1995. p. 183–99.
 27. Balint B, Ivanovic Z, Petakov M, et al. The cryopreservation protocol optimal for progenitor recovery is not optimal for preservation of MRA. *Bone Marrow Transplant* 1999; 23: 613–9.
 28. Balint B. Coexistent cryopreservation strategies: microprocessor-restricted vs. uncontrolled-rate freezing of the "blood-derived" progenitors/cells. *Blood Banking Transf Med* 2004; 2(2): 62–7.
 29. Balint B. From the initial efforts of cell freezing to the standardization of the blood cell cryopreservation. *Bull Transfus* 2000; 46: 3–8.
 30. Thomas ED, Lochte HL. Supralethal whole body irradiation and isologous marrow-transplantation in man. *J Clin Invest* 1959; 38: 1709–16.
 31. Mathe G, Jammot H. Transfusions et greffes de moelle osseuse homologue chez des humaines irradiées à haute dose accidentellement. *Rev Fr Etud Clin Biol* 1959; 4: 226–38.
 32. Thomas ED, Ferrebee JW. Prolonged storage of marrow and its use in the treatment of radiation injury. *Transfusion* 1962; 2: 115–7.
 33. Buckner CD, Stewart P, Clift RA. Treatment of blastic transformation of CGL by



- chemotherapy, total body irradiation and infusion of cryopreserved autologous marrow. *Exp Hematol* 1978; 6: 96–100.
34. Goldman JM, Th'ng KH, Park DS, Spiers ASD, Lowenthal RM, Ruutu T. Collection, cryopreservation and subsequent viability of haemopoietic stem cells intended for treatment of chronic granulocytic leukemia in blast–cell transformation. *Br J Hematol* 1978; 40: 185–95.
 35. Champlin R. The role of bone marrow transplantation for nuclear accidents: Implications of the Chernobyl disaster. *Semin Hematol* 1987; 24 (2 Suppl): 1–4.
 36. Balint B, Stamatovic D, Andric Z. Stem and progenitor cell transplantation. In: Balint B (ed): *Transfusion Medicine*. Belgrade: CTCI–Press; 2003. p. 525–47.
 37. Stamatovic D, Balint B, Todorovic–Zivanovic B, Marjanovic S, Lakic–Trajkovic Z, Malesevic M. Second allogeneic bone marrow transplantation in treatment of patients with severe aplastic anemia following late graft rejection. *Vojnosanit Pregl* 2000; 57 (5 Suppl): 95–8.
 38. Balint B, Ljubenov M, Stamatović D, Todorović M, Pavlović M, Ostojić G, et al. Stem cell harvesting protocol research in autologous transplantation setting: large volume vs. conventional cytophoresis. *Vojnosanit Preg* 2008; 65(7): 545–51.
 39. Savic A, Balint B, Urosevic I, Rajic N, Todorovic M, Percic I, Popovic S. Syngeneic peripheral blood stem cell transplantation with immunosuppression for hepatitis–associated severe aplastic anemia. *Turk J Hematol* 2010; 27(4): 294–8.
 40. Balint B, Stamatovic D, Todorovic M, Elez M, Vojvodic D, Pavlovic M, Cucuz–Jokic M. Autologous transplant in aplastic anemia: quantity of CD34⁺/CD90⁺ subset as the predictor of clinical outcome. *Transf Apher Sci* 2011; 45(2): 137–41.
 41. Wagstaff AJ. Plerixafor: in patients with non–Hodgkin's lymphoma or multiple myeloma. *Drugs* 2009; 69(3): 319–26.
 42. De Clercq E. The AMD3100 story: the path to the discovery of a stem cell mobilizer (Mozobil). *Biochem Pharmacol* 2009; 77(11): 1655–64.
 43. MacVittie TJ, Farese AM, Smith WG, Baum CM, Burton E, McKearn JP. Myelopoietin, an engineered chimeric IL–3 and G–CSF receptor agonist, stimulates multilineage hematopoietic recovery in a nonhuman primate model of radiation–induced myelosuppression. *Blood* 2000; 95: 837–45.
 44. Nosari A, Cairoli R, Ciapanna D, Gargantini L, Intropido L, Baraté C, et al. Efficacy of single dose pegfilgrastim in enhancing the mobilization of CD34⁺ peripheral blood stem cells in aggressive lymphoma patients treated with cisplatin–aracytin–containing regimens. *Bone Marrow Transplant*. 2006; 38(6):413–6.
 45. Li P, Zhang GY, Zhu P, Wu BQ, Niu Q, Xie Y. Peripheral blood stem cell mobilization with low dose rhG–CSF in 56 unrelated healthy donors. *Zhongguo Shi Yan Xue Ye Xue Za Zhi*. 2007; 15(2): 348–51. [Article in Chinese].
 46. D'Souza A, Jaiyesimi I, Trainor L, Venuturumili P. Granulocyte colony–stimulating factor administration: adverse events. *Transfus Med Rev* 2008; 22(4): 280–90.
 47. Petakov M, Balint B, Bugarski D, Jovicic G, Stojanovic N, Vojvodic D, et al. Donor leukocyte infusion – the effect of mutual reactivity of donor's and recipient's peripheral blood mononuclear cell on hematopoietic progenitor cells growth. *Vojnosanit Pregl* 2000; 57 (5 Suppl): 89–93.
 48. Wingard JR, Gastineau DA, Leather HL et al. Hematopoietic stem cell transplantation. A handbook for clinicians. Bethesda: AABB; 2009.
 49. Link H, Schmitz N, Gratwohl A, Goldman JM. Standards for specialist units undertaking blood and marrow stem cell transplants – recommendations from the EBMT. *Bone Marrow Transplant* 1995; 16: 733–763.
 50. Falini B, Nicoletti I, Martelli MF, Mecucci C. Acute myeloid leukemia carrying cytoplasmic/mutated nucleophosmin (NPMc+ AML): biologic and clinical features. *Blood* 2007; 109(3): 874–85.
 51. Breems DA, Löwenberg B. Acute myeloid leukemia and the position of autologous stem cell transplantation. *Semin Hematol* 2007; 44: 259–66.
 52. Frassoni F, Labopin M, Powles R, Mary JY, Arcese W, Bacigalupo A, et al. Effect of centre on outcome of bone–marrow transplantation for acute myeloid leukaemia. Acute Leukaemia Working Party of the



- European Group for Blood and Marrow Transplantation. *Lancet* 2000; 355: 1393–8.
53. Gökbuget N, Hoelzer D. HSCT for acute lymphoblastic leukemia in adults. In: Apperly J, Carreras E, Gluckman E, Gratwohl A, Maszi T. *Hematopoietic Stem Cell Transplantation. The EBMT Handbook*, 5th edition. Paris: ESH; 2008. p. 372–9.
54. Chaidos A, Kanfer E, Apperly JF. Risk assessment in hematopoietic stem cell transplantation: disease and disease stage. *Best Pract Res Clin Hematol* 2007; 20: 125–54.
55. de Witte T, Sanz G. HSCT for myelodysplasia in adults. In: Apperly J, Carreras E, Gluckman E, Gratwohl A, Maszi T. *Hematopoietic Stem Cell Transplantation. The EBMT Handbook*, 5th edition. Paris: ESH; 2008. p. 380–7.
56. Martino R, Iacobelli S, Brand R, Jansen T, van Biezen A, Finke J, et al. Retrospective comparison of reduced-intensity conditioning and conventional high-dose conditioning for allogeneic hematopoietic stem cell transplantation using HLA-identical sibling donors in myelodysplastic syndromes. *Blood* 2006; 108: 836–46.
57. Druker BJ, Guilhot F, O'Brien SG, Gathmann I, Kantarjian H, Gattermann N, et al. Five-year follow up of patients receiving imatinib for chronic myeloid leukemia. *N Engl J Med* 2006; 355: 2408–17.
58. Apperly JF. Mechanisms of resistance to imatinib in chronic myeloid leukemia. *Lancet Oncol* 2007; 8: 1116–28.
59. Niederwieser D. HSCT for chronic myeloid leukemia in leukaemia in adults. In: Apperly J, Carreras E, Gluckman E, Gratwohl A, Maszi T. *Hematopoietic Stem Cell Transplantation. The EBMT Handbook*, 5th edition. Paris: ESH; 2008. p. 388–97.
60. Signorovitch JE, Wu EQ, Betts KA, Parikh K, Kantor E, Guo A, et al. Comparative efficacy of nilotinib and dasatinib in newly diagnosed chronic myeloid leukemia: a matching-adjusted indirect comparison of randomized trials. *Curr Med Res Opin* 2011; 27(6): 1263–71.
61. Guglielmi C, Arcese W, Brand R al. Donor lymphocyte infusion for relapsed chronic myelogenous leukemia: prognostic relevance of the initial cell dose. *Blood* 2002; 100: 397–405.
62. Weisser M, Tischer J, Schnittger S et al. A comparison of donor lymphocyte infusions or imatinib mesylate for patients with chronic myelogenous leukemia who have relapsed after allogeneic stem cell transplantation. *Hematologica* 2006; 91: 663–6.
63. Cervantes F, Rovira M, Urbano-Ispizua A, Rozman M, Carreras E, Montserrat E. Complete remission of idiopathic myelofibrosis following donor lymphocyte infusion after failure of allogeneic transplantation: Demonstration of a graft-versus-myelofibrosis effect. *Bone Marrow Transplantation* 2000; 26: 697–9.
64. Rondelli D, Barosi G, Bacigalupo A et al. Allogeneic hematopoietic stem cell transplantation with reduced intensity conditioning in intermediate-or high risk patients with myelofibrosis and myeloid metaplasia. *Blood* 2005; 105: 4115–4119.
65. Sureda A. HSCT for Hodgkin's lymphoma in adults. . In: Apperly J, Carreras E, Gluckman E, Gratwohl A, Maszi T. *Hematopoietic Stem Cell Transplantation. The EBMT Handbook*, 5th edition. Paris: ESH; 2008. p. 444–63.
66. Sureda A, Robinson S, Canals C, Carella AM, Boogaerts MA, Caballero D, et al. Reduced-intensity conditioning compared with conventional allogeneic stem-cell transplantation in relapsed or refractory Hodgkin's lymphoma: an analysis from the Lymphoma Working Party of the European Group for Blood and Marrow Transplantation. *J Clin Oncol* 2008; 26(3): 455–62.
67. Vose JM, Zhang MJ, Rowlings PA, Lazarus HM, Bolwell BJ, Freytes CO, et al. Autologous transplantation for diffuse aggressive non-Hodgkin's lymphoma in patients never achieving remission: a report from the Autologous Blood and Marrow Transplant Registry. *Blood and marrow Transplant registry. J Clin Oncol* 2001; 19: 406–13.
68. Lazarus HM, Zhang MJ, Carreras J, Hayes-Lattin BM, Ataergin AS, Bitran JD, et al. A comparison of HLA-identical sibling allogeneic versus autologous transplantation for diffuse large B cell lymphoma: a report from the CIBMTR. *Biol Blood Marrow Transplant* 2010; 16(1): 35–45.



69. Solal-Céligny P, Roy P, Colombat P, White J, Armitage JO, Arranz-Saez R, et al. Follicular lymphoma international prognostic index. *Blood* 2004; 104: 1258–65.
70. Gribben JG. HSCT for low-grade non-Hodgkin's lymphoma in adults. In: Apperly J, Carreras E, Gluckman E, Gratwohl A, Maszi T. *Hematopoietic Stem Cell Transplantation. The EBMT Handbook*, 5th edition. Paris: ESH; 2008. p. 442–53.
71. Blade J, Rosiñol L, Sureda A, Ribera JM, Díaz-Mediavilla J, García-Laraña J, et al. High-dose therapy intensification compared with continued standard chemotherapy in multiple myeloma patients responding to the initial chemotherapy: long-term results from a prospective randomized trial from the Spanish cooperative group PETHEMA. *Blood* 2005;106: 3755–9.
72. Koreth J, Cutler CS, Djulbegovic B et al. High dose therapy with single autologous transplantation versus chemotherapy for newly diagnosed multiple myeloma. A systematic review and meta analysis of randomized controlled trials. *Biol Blood marrow Transplant* 2007; 13: 183-196.
73. Young N, Calado RT, Scheinberg P. Current concepts in the pathophysiology and treatment of aplastic anemia. *Blood* 2006; 108: 2509–19.
74. Champlin RE, Perez WS, Passweg JR, Klein JP, Camitta BM, Gluckman E, et al. Bone marrow transplantation for severe aplastic anemia: a randomized controlled study of conditioning regimens. *Blood* 2007; 109(10): 4582–5.
75. Bacigalupo A. Treatment strategies for patients with severe aplastic anemia. *Bone Marrow Transplant* 2008; 42 (Suppl 1): S42–S4.
76. Bacigalupo A, Piaggio G, Podesta M, Van Lint MT, Valbonesi M, Lercari G, et al. Collection of peripheral blood hematopoietic progenitors (PBHP) from patients with severe aplastic anemia (SAA) after prolonged administration of granulocyte colony-stimulating factor. *Blood* 1993; 82: 1410–4.





ZNAČAJ PROTOČNE CITOMETRIJE U ISPITIVANJU TROMBOCITA

Dušan Vučetić, Bela Balint, *Danilo Vojvodić

Institut za transfuziologiju, * Institut za medicinska istraživanja
Vojnomedicinska akademija

SAŽETAK

Protočna citometrija predstavlja najznačajniji metod za ispitivanje glikoproteina trombocita, gde se pomoću monoklonskih antitela analiziraju kvantitativne i kvalitativne promene njihove ekspresije, a sve u cilju utvrđivanja povezanosti ovih promena sa kontrolom njihove funkcije. Mogućnost da se registruju odnosno prate, određene grupe stečenih događaja ili ćelije, omogućava izolaciju i analize trombocita u mešanoj ćelijskoj populaciji ili u celoj krvi. Ovo se posebno primenjuje za detekciju vezanih proteina, feto - materinskih i antitrombocitnih antitela, aktivacije i interreakcije sa drugim ćelijama, ispitivanje intraćelijskog kalcijuma i merenje retikulisanih trombocita. Tehnički je mnogo teže izvesti ispitivanja trombocita u odnosu na granulocite ili eritrocite, zbog mogućnosti in vitro aktivacije i agregacije. Brzina, reproducibilnost i preciznost ovog metoda uz potpunu automatizaciju, osigurava dobijanje najpouzdanijih podataka. Trombociti imaju mnoštvo površinskih glikoproteina, a funkcije pojedinih još uvek nisu detaljno proučene. Dostupnost monoklonskih antitela koja prepoznaju ove molekule i njihove neoepitope omogućili su široku upotrebu protočne citometrije u dijagnostikovanju Bernar-Soulier sindroma i Glanzmanove trombastenije, kao i trombocitopenije indukovane heparinom. U transfuziologiji je praktična primena u kontroli kvaliteta jedinica koncentrovanih trombocita, kao i onih koji su zamrznuti, ili za praćenje trombocita in vivo. Veoma precizno se detektuje spektar specifičnih modifikacija na površini trombocitne membrane koje određuju aktivacioni status i reaktivnost cirkulišućih trombocita. Protočnom citometrijom se utvrđuje: a) procenat ispoljavanja antigena (% trombocita koji se boje pozitivno za određeno antitelo) i b) prosečni intenzitet fluorescence ispoljavanja antigena na trombocitima (MFI). MFI je odraz gustine antigena ili epitopa, i koristi se kao semikvantitativni test radi merenja količine vezanog antitela (procene antigenih molekula po trombocitu). U zavisnosti od eksperimentalnih okolnosti i fiziološke prirode antigena koji se meri, nekad veću značajnost može imati MFI a nekad procenat pozitivnih trombocita.

UVOD

Uvođenje tehnike protočne citometrije krajem osamdesetih godina predstavljalo je ogroman napredak u funkcionalnoj dijagnostici trombocita (1). Ona predstavlja izuzetno važno sredstvo za ispitivanje funkcije i specifičnih promena na površini trombocita (1). Porast upotrebe ove tehnike je sve veći, zbog preciznosti i osetljivosti u odnosu na druge metode. Protočni citometar veoma brzo meri specifične karakteristike velikog broja pojedinačnih ćelija. Pre analize protočnim citometrom, pojedinačne ćelije u suspenziji se obeležavaju fluorescentnom bojom, obično fluorescentno konjugovanim monoklonskim antitelom. U citometru, suspendovane ćelije prolaze kroz protočnu komoru stopom od 1000-100,000 ćelija po minuti, kroz fokusiran snop lasera. Nakon što laserska svetlost aktivira fluorescentne boje na ekscitacionu talasnu dužinu, detektori procesiraju

emitovani intenzitet fluorescencije i karakteristike svetlosnog rasipanja svake ćelije. Intenzitet emitovanog svetla je direktno proporcionalan gustini antigena ili karakteristikama ćelija koje se mere. Ovako se može odrediti, veličina ("forward scatter"), granuliranost ("side scatter"), i površinska ekspresija antigena ("mean immunofluorescence") nakon vezivanja antitela konjugovanog fluorescentnom bojom (1). Kao antikoagulans se najčešće koristi natrijum citrat, a mogu se koristiti i drugi antikoagulansi. Stvaranje trombocitnih agregata se minimizira dilucijom uzorka.

Upotrebom više vrsta fluorescentnih boja sa drugačijim spektrom svetlosnih frekvencija moguće je istovremeno analizirati različite funkcionalne promene trombocitne membrane (1). Postoji širok spektar ovih boja kao što su fikoeritrin-PE, fluorescein izotiocijanat - FITC,



peridinin hlorofil protein -PerCP, fikoeritrin -Cy5, fikoeritrin-Teksas Red-PE:TR i alofikocianin -APC. Monoklonsko antitelo (prepoznaje antigen koji se meri), se dodaje u saturirajućoj koncentraciji. U testu se mogu koristiti fiziološki agonisti kao što su trombin, aktivirajući peptid trombinskog receptora (TRAP), adenozin difosfat (ADP), kolagen, frakcija komplementa C5b -9, i analozi tromboksana A2. Uzorci se stabilizuju fiksacijom sa 1% paraformaldehidom.

Antitela se mogu dodati nakon fiksacije, pod uslovom da fiksacija ne ometa vezivanje antitela (2), a potom se uzorci analiziraju u citometru. Nakon identifikacije trombocita pomoću tkz. „light scattering“ i fikoeritrin pozitivnosti, vezivanje fluorescein izotiocijanata (FITC) -konjugovanih test monoklonskih antitela se određuje na osnovu analize 5000 -10.000 pojedinačnih trombocita.

Postoje brojne prednosti analize funkcije trombocita protočnom citometrijom. Trombociti se direktno analiziraju u fiziološkom miljeu cele krvi (uključujući eritrocite i leukocite) koji utiču na aktiviranje trombocita (3). Minimalna manipulacija uzoraka sprečava artefaktno *in vitro* aktiviranje i potencijalni gubitak subpopulacija trombocita (1, 4). Može se utvrditi aktivacioni status i reaktivnost cirkulišućih trombocita. Ova metoda omogućava detekciju spektra specifičnih modifikacija na površini membrane koje su zavisne od aktivacije trombocita. Osim toga, kako se proizvode nova monoklonska antitela usmerena protiv funkcionalnih epitopa, ona se mogu lako uklopiti u buduće analize. Subpopulacija od svega 1% delimično aktiviranih trombocita se može otkriti citometrijom cele krvi. Neophodne su minimalne zapremine krvi od svega 5 μ L (1, 4) što čini protočnu citometriju posebno značajnom za ispitivanja kod neonatusa.

Trombociti bolesnika sa značajnom trombocitopenijom se takođe mogu precizno analizirati. Konačno, ova metoda je prilagodljiva za istraživanja na životinjama pod uslovom da su dostupni reagensi (5).

Nedostaci ove metode su visoka cena i održavanje protočnog citometra. Drugo, za kliničku primenu, priprema uzoraka može biti prilično komplikovana, mada je proizvodnja komercijalnih test kitova pojednostavila neke testove. Treće, da bi se izbeglo „ex vivo“ aktiviranje trombocita, uzorak krvi se mora obraditi tokom 30 minuta (1). Za procenu nekih

receptora trombocita, ovo vreme se može zaobići neposrednom fiksacijom.

PRIMENA PROTOČNE CITOMETRIJE U ISPITIVANJU TROMBOCITA

Merenje aktivacije trombocita

U nedostatku egzogenog trombocitog agonista, citometrijom cele krvi (prema vezivanju monoklonskih antitela) može da se odredi aktivacioni status cirkulišućih trombocita. Aktivacija kriokonzerviranih trombocita može se precizno pratiti protočnom citometrijom o čemu postoje i sopstvena iskustva (6-11). Pored toga procena funkcije trombocita *in vivo* uz uključivanje egzogenog agonista u test, omogućava analizu reaktivnosti cirkulišućih trombocita u *in vitro* uslovima. Na kraju, protočna citometrija je fiziološki test funkcije trombocita, tako što agonist dovodi do u specifičnog funkcionalnog odgovora – promeni u površinskoj ekspresiji fiziološkog receptora (ili drugih antigena ili vezanih liganda), što se manifestuje promenom vezivanja monoklonskih antitela. Pored toga, analiza monocitno-trombocitnih agregata i prokoagulantnih mikropartikula je takođe osetljiva za *in vivo* aktivaciju trombocita.

MARKERI AKTIVACIJE TROMBOCITA

Monoklonska antitela zavisna od aktivacije

Markeri aktivacije trombocita čine konformacione promene zavisne od aktivacije u integrin α IIb β 3 (GPIIb-IIIa kompleksu, CD41/CD61), ekspozicija membranskih proteina granula (P-selektin, CD63, LAMP-1, LAMP-2, CD40L), vezivanje sekretovanih proteina na površini trombocita (trombospondin, multimerin) i stvaranje prokoagulantne površine (vezivanje činioca koagulacije V/Va, X/Xa i V III).

Najčešće korišćena monoklonska antitela su ona usmerena protiv konformacionih promena u α IIb β 3 i ona usmerena protiv membranskih proteina. Integrin α IIb β 3 je receptor za fibrinogen i von Willebrandov faktor koji je važan za agregaciju trombocita. Većina monoklonskih antitela usmerena ka α IIb β 3 vezuje se za mirujuće trombocite, monoklonsko antitelo PAC1 je usmereno ka fibrinogen vezujućem mestu koje se eksprimira nakon konformacione promene u



α IIb β 3 aktiviranog trombocita (12). Dakle, PAC1 se vezuje samo za aktivirane a ne i za mirujuće trombocite. Ostala monoklonska antitela specifična za α IIb β 3, su usmerena protiv ligand indukovanih konformacionih promena u α IIb β 3 (12) ili receptorom indukovanih konformacionih promena u vezanom ligandu (fibrinogen) (12).

Umesto α IIb β 3 specifičnih monoklonskih antitela, fluoresceinom konjugovani fibrinogen može da se koristi i za otkrivanje aktiviranog oblika α IIb β 3 (13), s tim što se koncentracija neobeleženog i obeleženog fibrinogena oslobođenog iz α granula takođe mora uzeti u obzir u ovim testovima.

P-selektin (CD62P) je najčešće korišćeno monoklonsko antitelo usmereno protiv granula membranskih proteina. P-selektin je komponenta α granula mirujućih trombocita, koja je izražena na membrani samo nakon sekrecije α granula. Stoga se ovo antitelo vezuje samo za degranulisane trombocite, a ne i za mirujuće. Aktivacijom zavisni porast P-selektina na površini trombocita, nije reverzibilan tokom vremena u *in vitro* uslovima (14). Međutim, *in vivo*, cirkulišući degranulisani trombociti brzo gube površinski P-selektin, ali normalno cirkulišu i funkcionišu (15, 16).

P-selektin nije idealni marker za otkrivanje cirkulišućih degranulisanih trombocita, osim ako 1) uzorak krvi nije uzet distalno od mesta aktivacije trombocita, 2) je uzorak krvi uzet u roku od 5 minuta od aktivirajućeg stimulusa, ili 3) postoji kontinuirana aktivacija trombocita. Dužina vremena da drugi površinski markeri (zavisni od aktivacije) ostanu eksprimirani na površini trombocita *in vivo*, još nije definitivno određena.

Leukocitno-trombocitni agregati

P-selektin posreduje u inicijalnoj adheziji aktiviranih trombocita za monocite i neutrofile (17) preko P-selektin glikoproteina -1 (PSGL-1) receptora na površini leukocita. Monocitno - trombocitni i neutrofilno -trombocitni agregati se lako detektuju protočnom citometrijom uzorka cele krvi (16). Merenje cirkulišućih monocitno - trombocitnih agregata može biti osetljiviji indikator *in vivo* aktivacije trombocita od cirkulišućih neutrofilno -trombocitnih agregata ili cirkulišućih P-selektin pozitivnih neagregiranih trombocita (15, 16).

Mirkočestice koje potiču od trombocita

Mirkočestice koje potiču od trombocita (PDM) su heterogena populacija vezikula (<1 μ m) stvorenih iz plazma membrane (18). Protočnom citometrijom je utvrđeno, da *in vitro* aktivacija trombocita različitim agonistima (C5b-9, kolagen/trombinom, kalcijum-jonoforom A23187) u prisustvu ekstracelularnih jona kalcijuma dovodi do stvaranja mikročestica. One vrše snažnu prokoagulantnu ulogu u blizini aktivnosti trombocita (monoklonska antitela se vezuju za aktivirane faktore V ili VIII ili pomoću aneksina V) (19). Stvaranje mikropartikula u području aktivisanih trombocita je mera za prokoagulantnu aktivnost zavisnu od trombocita (20). Predstavljaju posebnu populaciju koja se razlikuje od egzozoma koji potiču iz intraćelijskih multivezikularnih tela. PDM se takođe razlikuju od mikropartikula koje potiču od megakariocita uprkos postojanja nekoliko identičnih površinskih markera na megakariocitima (18).

Trombocitno - trombocitni agregati

Trombocitno - trombocitni agregati se mogu meriti protočnom citometrijom na osnovu svojstava "light scattering-a" (15, 20). Međutim, ako su trombociti agregirani, količina antigena po trombocitu se ne može odrediti protočnom citometrijom. Ovo je posledica toga što se protočnom citometrijom meri količina fluorescencije po pojedinačnoj čestici, bez obzira da li je čestica jedan trombocit ili agregat nepoznatog broja trombocita.

DIJAGNOZA SPECIFIČNIH POREMEĆAJA

1. Bernar-Soulier sindrom

U ovom sindromu postoji nasledni nedostatak GPIIb-IX-kompleksa. Protočna citometrija uz korišćenje specifičnih monoklonskih antitela GPIIb, GPIX i GPV je brz i jednostavan način za dijagnozu homozigotnih i heterozigotnih stanja ovog sindroma (21). Protočna citometrija omogućava analizu trombocita, bez tehnički teškog postupka fizičkog odvajanja džinovskih trombocita od ćelija slične veličine (crvenih i belih krvnih zrnaca) kod ovog sindroma. Važno je pravilno podesiti „light scatter“ gejtove u protočnom citometru. Ovo



podešavanje može dovesti do preklapanja svetlosti između džinovskih trombocita i ostalih ćelija te je od suštinskog značaja da se u ispitivanje uključe specifična monoklonska antitela kao identifikator trombocita.

2. Glanzmanova trombastenija

U Glanzmanovoj trombasteniji je prisutan nasledni nedostatak integrin $\alpha\text{IIb}\beta 3$. Protočnom citometrijom sa αIIb i $\beta 3$ specifičnim monoklonskim antitelima se brzo i jednostavno dijagnostikuje homozigotni ili heterozigotni status (21, 22). Pored toga, panel monoklonskih antitela se može koristiti za procenu bolesnika sa defektom agregacije, sekrecije ili prokoagulantnih aktivnosti.

3. Bolesti skladištenog pula

Standardnom agregometrijom se ova nasledna deficijencija ne može detektovati, a predstavlja relativno čest uzrok blage hemoragijske diateze (23). Za razliku od konvencionalne metode sa fluorescentnom bojom „mepakrinom“ (24), koja je prilično subjektivna, dugotrajna i ispituje samo mali broj trombocita, protočna citometrija jednostavno, brzo u i je dnom koraku dijagnostikuje ovaj sindrom (25). Metod pokazuje dobru korelaciju sa fluorescentnom mikroskopijom ali poboljšava otkrivanje mepakrinom-obeđenih trombocita kvantitativnim merenjem fluorescence na velikom broju (5000) trombocita (25).

Stečeni poremećaj, koji se nalazi u mijeloproliferativnim bolestima i završnoj fazi bubrežne insuficijencije, se takođe može dijagnostikovati citometrijom (25).

4. Heparinom indukovana trombocitopenija

Za razliku od normalnih seruma i seruma pacijenata sa kinin ili kinin indukovanom trombocitopenijom, serum pacijenata sa trombocitopenijom indukovanom heparinom (HIT) stvara prokoagulantne PDM iz normalnih trombocita (26). Ovo zapažanje je iskorišćeno za razvoj brzog, specifičnog i osetljivog citometrijskog testa za dijagnozu HIT-a.

PRIMENA U TRANSFUZIOLOŠKIM CENTRIMA

Kontrola kvaliteta koncentrovanih trombocita

Kao što je određeno vrednostima P-selektina, CD63 i $\alpha\text{IIb}\beta 3$, ispitivanja jedinica koncentrovanih trombocita pre transfuzije su obezbedila direktan dokaz aktivacije trombocita koja je zavisna od vremena skladištenja (9, 10, 11, 27). Ove promene su u korelaciji sa izmenama u morfologiji trombocita (smanjenje „swirlinga“), oslobađanje laktat dehidrogenaze kao i oslobađanje β -tromboglobulina (27, 28). Predloženo je da vrednosti površinskog P-selektina u koncentrovanim trombocitima mogu predvideti in vivo opstanak trombocita i/ili funkciju.

Međutim, ima dokaza da infundovani degranulisani trombociti (non-humani model primata) brzo gube površinski P-selektin u plazma pul, ali i dalje cirkulišu i funkcionišu in vivo (15). Dakle, molekuli površinskog P-selektina se brzo eliminišu, pre nego degranulisani trombociti. Berger je potvrdio da su i trombociti divljeg tipa i P-selektin „nokaut“ miševa, imali identični životni vek (16). Kada su trombociti bili izolovani, aktivirani trombinom i reinfundovani miševima, stopa eliminacije trombocita je bila nepromenjena. Infundovani trombinom-aktivirani trombociti su brzo izgubili svoj površinski P-selektin u cirkulaciju, a ovaj gubitak je bio praćen simultanim pojavljivanjem fragmenata P-selektina (100-kD) u plazmi (16). Skladištenje trombocita na 4°C prouzrokuje značajno smanjenje njihovog životnog veka in vivo, međutim nisu zapažene značajne razlike između dva genotipa. Dakle, rezultati Bergera i sar. (16) potvrđuju da P-selektin ne posreduje u eliminaciji trombocita.

U modelu povrede bubrega kod trombocitopenijskog zeca, Krišnamurti i sar. (29) su objavili da trombinom-aktivirani ljudski trombociti: a) gube površinski P-selektin u cirkulaciji kunića, b) preživljavaju u cirkulaciji isto tako dugo kao i sveži ljudski trombociti, i što je najvažnije, c) podjednako su efikasni u smanjenju gubitka krvi kao i sveži ljudski trombociti.

Ukratko, ove studije (15, 16, 29) ukazuju da merenje površinskog P-selektina trombocita u jedinicama koncentrovanih trombocita, ne treba koristiti kao prediktor preživljavanja trombocita



ili funkcija *in vivo*. Međutim, površinski P-selektin može ipak biti koristan u kontroli kvaliteta tokom obrade, skladištenja i manipulacije (filtriranje, pranje) (27, 28). To je zato što, za razliku od situacije *in vivo* (15, 16, 29), porast površinskog P-selektina nije reverzibilan tokom vremena, pod standardnim uslovima skladištenja (30).

Ostale primene u transfuziološkim centrima

Protočni citometar se takođe može koristiti za identifikaciju leukocitne kontaminacije koncentrovanih trombocita, imunofenotipizaciju trombocita HPA-1a (31) i drugih polimorfizama, otkrivanje majčinih i fetalnih anti-HPA-1a antitela (32) i „crossmatch“ trombocita, što je značajno za aloimunizovane bolesnike za koje HLA kompatibilni trombociti nisu uvek na raspolaganju (33).

IMUNOGLOBULINI KLASA IgG VEZANI ZA TROMBOCITE

Merenje imunoglobulina klase IgG vezanih za trombocite metodom protočne citometrije je korisno u imunim trombocitopenijama (34) i aloimunizacijama (35). Kao test za imunu trombocitopeniju, predložena je kvantitativna direktna imunofluorescenca za IgG vezane za trombocite.

BROJ TROMBOCITA

Protočna citometrija se može koristiti za lako i precizno brojanje trombocita kada je njihov broj u uzorku veoma nizak (36). Trombociti se identifikuju prema karakteristikama „light scattering“ i uz korišćenje jednog ili dva specifična monoklonska antitela. Merenje trombocita protočnom citometrijom zahteva mali uzorak krvi (oko 5 μ L). Metoda protočne citometrije je posebno povoljna za teške trombocitopenije gde je elektronsko brojanje trombocita manje precizno (37) kao i za oštećenja gde dolazi do promene veličine trombocita (npr. Bernard-Soulier sindrom).

RAZNA ISTRAŽIVANJA TROMBOCITA

Preživljavanje trombocita, praćenje i funkcija *in vivo*

Protočna citometrija sa više boja se može koristiti za praćenje trombocita *in vivo* uz određivanje njihovog opstanka i funkcije (15, 38). Protočna citometrija sa tri boje uz fluorescentno obeležavanje identifikuje: 1) trombocite u krvi (npr., fikoeritriinom-konjugovani GPIb, GPIX, α Ib-, ili β 3- specifična monoklonska antitela), 2) infundovane trombocite i 3) od aktivacije zavisno monoklonsko antitelo (FITC-om konjugovana P-selektin specifična, ili aktivirana α Ib-ili β 3 specifična monoklonska antitela). Ovako, funkcija trombocita *in vivo*, može biti određena u različitim vremenskim tačkama uključujući učešće u agregaciji trombocita, ekspoziciju fibrinogen vezujućeg mesta na α Ib β 3, stvaranje prokoagulantnih PDM (15).

Transdukcija signala

Protočna citometrija se može koristiti za istraživanje transdukcije trombocitnih signala. Na primer, za otkrivanje i kvantifikovanje određene intraćelijske fosforilacije proteina pomoću specifičnih antitela (39).

SPECIFIČNOSTI VAŽNE ZA USPEŠNOST IZVOĐENJA ANALIZA

Uzimanje krvi

Nakon odbacivanja prva 2 ml krvi, prikupljanje krvi u 3,2% natrijum citratnim vacutainer epruvetama ne dovodi do značajne aktivacije trombocita. Međutim, svaka laboratorija mora utvrditi da li njihov metod prikupljanja, uključujući uzimanje uzoraka kroz angioplastiku ili druge katetere dovodi do artefijalne *in vitro* aktivacije trombocita, što se vidi vezivanjem monoklonskih antitela. Iako je natrijum citrat (slabi helator kalcijuma) najčešće korišćeni antikoagulant mogu se upotrebljavati i drugi antikoagulansi (40). EDTA (jak helator kalcijuma) treba izbegavati, zbog uticaja na α Ib β 3.



Fiksacija

Fiksacija trombocita je značajna ka da nema uslova za neposrednu analizu na citometru. Ona sprečava naknadnu arteficijelnu aktivaciju trombocita *in vitro*. Za većinu antitela "obeležavanje antitelima pre fiksacije" ne dovodi do značajne razlike u intenzitetu fluorescencije između neposredno i uzoraka analiziranih u roku od 24 sata nakon fiksacije (1). Metoda "fiksacija pre obeležavanja antitelima" takođe ne rezultuje značajnim razlikama u intenzitetu fluorescencije između neposredno i uzoraka analiziranih u roku od 24 sata.

Međutim, fiksacija je važna varijabla koja mora biti kontrolisana, posebno u metodi "fiksacija pre obeležavanja antitelima", jer je vezivanje monoklonskih antitela za fiksirane trombocite često smanjeno u odnosu na ne fiksirane trombocite (2). Nadalje, vezivanje nekih antitela dalje pada nakon fiksacije u funkciji vremena. Optimalna fiksacija za svako novo monoklonsko antitelo mora biti definisana od svake laboratorije.

Izbor antitela

Pošto ekspozicija različitih antigena odražava različite aspekte aktivacije trombocita, poželjno je koristiti panel monoklonskih antitela. Monoklonska antitela su bolja od poliklonskih antitela u protočnoj citometriji cele krvi jer oni mogu pouzdanije saturirati sve specifične epitope i rezultirati u manje nespecifičnom vezivanju. Specifična monoklonska antitela su sada dostupna iz široke palete komercijalnih izvora i često su već konjugovana fluoresceinom, biotinom, fikoeritriinom, PerCP, APC ili tandem konjugovano (npr. fikoeritrin-Cy5 ili RED-670). Upotreba antitela konjugovanih direktno sa fluoresceinom, fikoeritriinom, PerCP, APC, ili tandem konjugovano, eliminiše potrebu za dodavanjem sekundarnih antitela, čime se izbegava dodatna inkubacija i postupak pranja, koji kod ne fiksiranih uzoraka mogu dovesti do arteficijalne *in vitro* aktivacije trombocita. Pored toga, korišćenje sekundarnog antitela će rezultovati u povećanju pozadinske fluorescencije i smanjenju osetljivosti testa. Konačno, upotreba direktno konjugovanih antitela omogućava da se analizira više boja sa, na pr. drugačije konjugovanim antitelima miša.

Saturaciona koncentracija svakog antitela za trombocite se mora odrediti u laboratoriji. Ova koncentracija je obično između 0,25 i 20g/mL. Osim toga, kada se koristi više od jednog monoklonskog antitela (standard u citometriji uzorka cele krvi), potrebno je utvrditi da oni ne ometaju jedni druge u vezivanju za površinu trombocita.

Ekspresija vezivanja antitela

Vezivanje antitijela se može izraziti kao prosečni intenzitet fluorescencije (MFI) ili kao procenat pozitivnog bojenja trombocita za određeno antitelo (zasnovano na analizi pozitivnog regiona postavljenog s desne strane fluorescentnog histograma negativne kontrole). U zavisnosti od okolnosti eksperimenta i fiziološke prirode antigena koji se meri, više značaja može imati MFI ili procenat pozitivnih trombocita. Za razliku od MFI metoda, "procenat pozitivnih trombocita" je nezavisna od varijacija u amplifikaciji signala (npr. kao rezultat promene u PMT naponu), jer signal negativne kontrole raste u proporciji sa test uzorkom. Metod "procenat pozitivnih trombocita" može otkriti subpopulacije trombocita koje proizlaze iz lokalnog *in vivo* inzulta. Međutim, važno je shvatiti da "antitelo pozitivni" trombociti mogu imati vrlo malo antigena izraženih na svojoj površini. Na primer, u određenoj kliničkoj situaciji može se dobiti podatak da cirkuliše 20% aktiviranih trombocita na temelju P-selektin pozitivnosti. Međutim, ako svaki P-selektin pozitivni trombocit eksprimira samo 10% maksimalnog površinskog P-selektina trombocita, tad je sveukupni prosečni porast površinskog P-selektina samo 2%. Ako je cilj da se odredi ukupna količina površinskog antigena trombocita, MFI je za to precizniji način prikaza podataka.

Smanjenje površinskog GPIb-IX-V trombocita treba biti kvantifikovano pomoću MFI, pre nego metodom "procenat pozitivnih trombocita" jer pad u GPIb-IX-V na svakom trombocitu je obično nedovoljan da rezultuje u "negativnom trombocitu" (41). Donja granica detekcije protočnom citometrijom je oko 500 molekula antitela po trombocitu.

Na kraju, može se konstatovati da je metoda protočne citometrije trombocita izuzetno korisna tehnika u savremenoj transfuziologiji koja se koristi pri kontroli kvaliteta jedinica koncentrovanih trombocita kao i dokazivanja prisustva leu-



kocita u istim, određivanja stepena aktivacije trombocita, imunofenotipiziranja, detekciji fetomaterinskih antitrombocitnih antitela, unakrsnom testu za trombocite. Pored ovoga, našla je primenu u dijagnozi specifičnih oboljenja, monitoringu antitrombocitnih lekova, praćenju trombopoeze, istraživanja trombocita i njihove funkcije ne samo u oblasti transfuziologije već i hematologije odnosno kardiologije.

LITERATURA

1. Shattil S, Cunningham M, Hoxie J. Detection of activated platelets in whole blood using activation-dependent monoclonal antibodies and flow cytometry. *Blood* 1987; 70: 307–15.
2. Michelson A, Barnard M, Benoit S, Mitchell J, Knowles C, Ault K. Characterization of platelet binding of blind panel mAb. In *Leucocyte Typing V*, Schlossman S, Boumsell L, Gilks W, Harlan J, Kishimoto T, Morimoto C, Ritz J, Shaw S, Silverstein R, Springer T, Tedder T, Todd R. Eds. Oxford: Oxford University Press, 1995, p. 1207–1210.
3. Santos M, Valles J, Marcus A, Saffier L, Broekman M, Islam N, et al. Enhancement of platelet reactivity and modulation of eicosanoid production by intact erythrocytes. A new approach to platelet activation and recruitment. *J Clin Invest* 1991; 87: 571–580.
4. Michelson A, Ellis P, Barnard M, Matic G, Viles A, Kestin A. Downregulation of the platelet surface glycoprotein Ib-IX complex in whole blood stimulated by thrombin, ADP or an in vivo wound. *Blood* 1991; 77: 770–79.
5. Alugupalli K, Michelson A, Barnard M, Leong J. Serial determinations of platelet counts in mice by flow cytometry. *Thromb Haemost* 2001; 86: 668–671.
6. Balint B, Paunović D, Vučetić D, Vojvodić M, Petakov M, Trkuljić M. Controlled-rate versus uncontrolled-rate freezing as predictors for platelet cryopreservation efficacy. *Transfusion* 2006; 46: 230-5.
7. Balint B, Vučetić D, Vojvodić D, Petakov M, Brajušković G, Ivanović Z, Trkuljić M, Stojanović N. Cell recovery, cryothermal micro-damages and surface antigen expression as predictors for cold-induced GPIb α /CD42b-cluster mediated platelet clearance after controlled-rate vs. uncontrolled-rate cryopreservation. *Blood Banking and Transfusion Medicine* 2004; 2 (1): 31-35.
8. Balint B, Vučetić D, Drašković B, Vojvodić D, Brajušković G, Čolić M, Trkuljić M. Microprocessor-controlled vs. "dump-freezing" platelet and lymphocyte cryopreservation: a quantitative and qualitative comparative study. *Vojnosanit Pregl* 2006; 63(3): 261-70.
9. Vučetić D, Balint B, Vojvodić D, Trajković-Lakić Z, Mandić-Radić S, Subota V, Trkuljić M. Cryopreserved vs. liquid stored platelets: a quantitative and functional analysis. *Mak med pregled* 2004, 58 (Suppl 63): 136.
10. Vučetić D, Balint B, Vojvodić D, Mandić-Radić S, Subota V, Trkuljić M. Flow cytometric and functional investigations of cryopreserved and liquid stored platelets. Abstract book of the 15th International Meeting Danubian League against thrombosis and haemorrhagic disorders, May 14-16, 2009: 27.
11. Vučetić D, Balint B, Vojvodić D, Mandić-Radić S, Subota V, Trkuljić M. Cryopreserved vs. liquid stored platelets – from the basic to the up to date findings. Abstracts of the 17th Regional Congress of the ISBT, Europe, June 23-27, 2007, Madrid, Spain. *Vox Sang* 2007; 93(Suppl. 1): 111.
12. Shattil SJ, Hoxie JA, Cunningham M, Brass LF. Changes in the platelet membrane glycoprotein IIb-IIIa complex during platelet activation. *J Biol Chem* 1985; 260: 11107–11114.
13. Faraday N, Goldschmidt-Clermont P, Dise K, Bray PF. Quantitation of soluble fibrinogen binding to platelets by fluorescence-activated flow cytometry. *J Lab Clin Med*. 1994; 123(5): 728-40.
14. Ruf A, Patscheke H. Flow cytometric detection of activated platelets: comparison of determining shape change, fibrinogen binding, and P-selectin expression. *Semin Thromb Hemost*. 1995; 21(2): 146-51.
15. Michelson AD, Barnard MR, Hechtman HB, MacGregor H, Connolly RJ, Loscalzo J, Valeri CR. In vivo tracking of platelets: circulating degranulated platelets rapidly lose surface P-selectin but continue to circulate



- and function. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1996; 93(21): 11877-82.
16. Berger G, Hartwell DW, Wagner DD. P-Selectin and platelet clearance. *Blood*. 1998; 92(11): 4446-52.
17. Larsen E, Celi A, Gilbert GE, Furie BC, Erban JK, Bonfanti R, Wagner DD, Furie B. PADGEM protein: a receptor that mediates the interaction of activated platelets with neutrophils and monocytes. *Cell*. 1989; 59(2): 305-12.
18. Siljander P. Platelet-derived microparticles – an updated perspective. *Thrombosis Research* 2011; 127 Suppl 2: S30-S33.
19. Sims PJ, Faioni EM, Wiedmer T, Shattil SJ. Complement proteins C5b-9 cause release of membrane vesicles from the platelet surface that are enriched in the membrane receptor for coagulation factor Va and express prothrombinase activity. *J Biol Chem*. 1988; 263(34): 18205-12.
20. Gawaz M. Flow cytometric investigations. In: *Blood platelets*. Georg Thieme Verlag Stuttgart, 2001. p 49-56.
21. Michelson AD. Flow cytometric analysis of platelet surface glycoproteins: phenotypically distinct subpopulations of platelets in children with chronic myeloid leukemia. *J Lab Clin Med*. 1987; 110(3): 346-54.
22. Jennings LK, Ashmun RA, Wang WC, Dockter ME. Analysis of human platelet glycoproteins IIb-IIIa and Glanzmann's thrombasthenia in whole blood by flow cytometry. *Blood*. 1986; 68(1): 173-9.
23. Nieuwenhuis HK, Akkerman JW, Sixma JJ. Patients with a prolonged bleeding time and normal aggregation tests may have storage pool deficiency: studies on one hundred six patients. *Blood*. 1987; 70(3): 620-3.
24. Lorez HP, Richards JG, Da Prada M, Picotti GB, Pareti FI, Capitanio A, Mannucci PM. Storage pool disease: comparative fluorescence microscopical, cytochemical and biochemical studies on amine-storing organelles of human blood platelets. *Br J Haematol*. 1979; 43(2): 297-305.
25. Gordon N, Thom J, Cole C, Baker R. Rapid detection of hereditary and acquired platelet storage pool deficiency by flow cytometry. *Br J Haematol*. 1995; 89(1): 117-23.
26. Warkentin TE, Hayward CP, Boshkov LK, Santos AV, Sheppard JA, Bode AP, Kelt on JG. Sera from patients with heparin-induced thrombocytopenia generate platelet-derived microparticles with procoagulant activity: an explanation for the thrombotic complications of heparin-induced thrombocytopenia. *Blood*. 1994; 84(11): 3691-9.
27. Fijnheer R, Modderman PW, Veldman H, Ouwehand WH, Nieuwenhuis HK, Roos D, de Korte D. Detection of platelet activation with monoclonal antibodies and flow cytometry. Changes during platelet storage. *Transfusion*. 1990; 30(1): 20-5.
28. Vučetić D. Procena kvaliteta kriokonzervisanih trombocita u odnosu na trombocite skladištene u tečnom stanju. Doktorska teza 2007. god. Vojnomedicinska akademija, Beograd.
29. Krishnamurti C, Maglasang P, Rothwell SW. Reduction of blood loss by infusion of human platelets in a rabbit kidney injury model. *Transfusion*. 1999; 39(9): 967-74.
30. Holme S, Sweeney JD, Sawyer S, Elfath MD. The expression of p-selectin during collection, processing, and storage of platelet concentrates: relationship to loss of in vivo viability. *Transfusion*. 1997; 37(1): 12-7.
31. Forsberg B, Jacobsson S, Stockelberg D, Kutti J, Rydberg L, Wadenvik H. The platelet-specific alloantigen PIA1 (HPA-1a): a comparison of flow cytometric immunophenotyping and genotyping using polymerase chain reaction and restriction fragment length polymorphism in a Swedish blood donor population. *Transfusion*. 1995; 35(3): 241-6.
32. Marshall LR, Brogden FE, Roper TS, Barr AL. Antenatal platelet antibody testing by flow cytometry--results of a pilot study. *Transfusion*. 1994; 34(11): 961-5.
33. Gates K, MacPherson BR. Retrospective evaluation of flow cytometry as a platelet crossmatching procedure. *Cytometry*. 1994; 18(3): 123-8.
34. Holme S, Heaton A, Kunchuba A, Hartman P. Increased levels of platelet associated IgG in patients with thrombocytopenia are not confined to any particular size class of platelets. *Br J Haematol*. 1988; 68(4): 431-6.
35. Rosenfeld CS, Bodensteiner DC. Detection of platelet alloantibodies by flow cytometry. Characterization and clinical significance. *Am J Clin Pathol*. 1986; 85(2): 207-12



36. Dickerhoff R, Von Ruecker A. Enumeration of platelets by multiparameter flow cytometry using platelet-specific antibodies and fluorescent reference particles. *Clin Lab Haematol.* 1995; 17(2): 163-72.
37. Kunz D, Höffkes H, Kunz WS, Gressner AM. Standardized flow cytometric method for the accurate determination of platelet counts in patients with severe thrombocytopenia. *Cytometry.* 2000; 42(5): 284-9.
38. Heilmann E, Friesen P, Anderson S, George JN, Hanson SR, Burstein SA, Dale GL. Biotinylated platelets: a new approach to the measurement of platelet life span. *Br J Haematol.* 1993; 85(4): 729-35.
39. Schwarz UR, Geiger J, Walter U, Eigenthaler M. Flow cytometry analysis of intracellular VASP phosphorylation for the assessment of activating and inhibitory signal transduction pathways in human platelets--definition and detection of ticlopidine / clopidogrel effects. *Thromb Haemost.* 1999;82(3):1145-52.
40. Schneider DJ, Tracy PB, Mann KG, Sobel BE. Differential effects of anticoagulants on the activation of platelets ex vivo. *Circulation.* 1997; 96(9): 2877-83.
41. Collier BS, Peerschke EI, Scudder LE, Sullivan CA. Studies with a murine monoclonal antibody that abolishes ristocetin-induced binding of von Willebrand factor to platelets: additional evidence in support of GPIb as a platelet receptor for von Willebrand factor. *Blood.* 1983; 61(1): 99-110.





PRINCIPI PRIPREME KONCENTRATA TROMBOCITA

Stanojković Zoran¹, Antić Ana¹, Mačukanović Golubović Lana²,

Stanojković Mirjana³, Jelić Marija⁴

¹ Zavod za transfuziju krvi Niš, Srbija, ² Klinički centra Niš, Klinika za hematologiju i imunologiju, ³ Klinički centra Niš, Centar za medicinsku biohemiju, ⁴ Vojna bolnica Niš, Kliničko-biohemijska laboratorija, Niš, Srbija

SAŽETAK

Transfuzije koncentrata trombocita jesu sastavni deo lečenja bolesnika sa trombocitopenijom koja je proistekla iz smanjene produkcije trombocita usled osnovne bolesti ili primene mijelotoksičnih lekova, potrošnje ili dilucije krvi, ali i nekih stanja sa poremećenom funkcijom trombocita.

Koncentrati trombocita se mogu dobiti separacijom iz jedinica cele krvi dobrovoljnih davalaca ili primenom separatora krvnih ćelija (aferezni trombociti). Koncentrati trombocita se iz cele krvi mogu pripremati iz prethodno prikupljene plazme bogate trombocitima (PRP) ili izdvajanjem iz "buffy coata" (leukocitno-trombocitnog sloja - BC). Terapijska doza trombocita za odrasle dobija se puliranjem 4 - 6 koncentrata trombocita iste ABO krvne grupe, a puliranje može da se vrši primenom komercijalnog kita za puliranje ili lančanom metodom („chain reaction“).

Aferezni trombociti se dobijaju trombocitafereznom procedurom od jednog davaoca, pomoću automatskog separatora krvnih ćelija. Na ovaj način smanjuje se HLA aloiminizacija i efikasnije leče već aloiminizovani pacijenti. Smanjenjem izlaganja većem broju davalaca, takođe, se smanjuje i rizik prenošenja virusnih infekcija.

Kvalitet pripremljenih koncentrata trombocita zavisi od velikog broja faktora, kao što su: metoda pripreme, dužina skladištenja, vrsta kese u kojoj se čuvaju, bakteriološko ispitivanje koncentrata, a u novije vreme i primena inaktivacije patogena.

UVOD

Koncentrati trombocita se primenjuju u prevenciji i lečenju krvarenja kod bolesnika sa trombocitopenijom ili trombocitopatijom. Najčešće se primenjuju u lečenju hematoloških bolesti, kod presađivanja koštane srži i drugih organa, u lečenju kardiohirurških bolesnika i pri gastrointenstinalnim krvarenjima. Povećanje primene agresivnih medicinskih postupaka i hemioterapije povećala je učestalost lečenja transfuzijama trombocitnih koncentrata^{1,2}.

Primena trombocitnih koncentrata ima sledeće ciljeve:

1. transfuzijom treba u bolesnikovu cirkulaciju uneti dovoljan broj trombocita kako bi se povećao njihov broj i omogućila normalna hemostaza,

2. transfundovani trombociti moraju biti efikasni u prevenciji i lečenju krvarenja,

3. transfuzije trombocita ne smeju uzrokovati nuspojave,

4. smanjenjem broja transfundovanih koncentrata trombocita treba pokušati smanjiti učestalost nuspojava, infekcija i aloimunizacija^{3,4}.

Od pre 50-tak godina kako je otkriveno ovo terapijsko sredstvo mnogo promena je bilo u načinu pripreme, pakovanja i skladištenja produkta.

KONCENTRAT TROMBOCITA IZ JEDINICE CELE KRV

Tokom dugog niza godina jedinica cele krvi bila je glavni izvor trombocita za transfuziju. Potrebno je da davanje jedinice krvi iz koje će se pripremiti koncentrat trombocita ne traje duže od 12 minuta, jer slab protok krvi tokom davanja vodi povećanom utrošku trombocita. Krv se može uzeti samo od davaoca koji ne uzimaju aspirin (ako je koristio aspirin ili neki lek koji u sebi sadrži aspirin u prethodnih 72 sata, funkcija trombocita će biti ozbiljno poremećena)^{1,2}.



Cela krv iz koje će se pripremiti koncentrat trombocita, također, ne sme da se stavlja u frižider, jer bi to iniciralo agregaciju trombocita i smanjilo njihovu funkcionalnost. Jedinice krvi treba da se čuvaju na temperaturi $22 \pm 2^\circ\text{C}$, koja treba da se postigne u što kraćem roku od davanja krvi. To se najčešće postiže primenom izolovane transportne kutije i vrećama ili pločama rashladne tečnosti (npr. butan diol)⁵.

Centrifugiranjem jedinice cele krvi lako se izdvajaju krvne komponente: eritrociti, plazma i trombociti. Dve su osnovne metode koje se koriste za proizvodnju trombocita: iz PRP (plazme bogate trombocitima) i iz buffy coat -a (BC).

Standardna terapijska doza trombocita za odrasle je pripremljena iz 4-6 jedinica krvi. Prinos trombocita iz jedne jedinice cele krvi je $50-70 \times 10^9$ u zapremini 50-60 mL, i on se postiže primenom različitih tehnika. Prinos trombocita predstavlja ukupan broj trombocita prisutan u finalnoj kesi za skladištenje i preračunat korišćenjem broja trombocita u jednom litru i ukupne zapremine u kojoj su trombociti suspendovani^{4,6}.

Koncentrati trombocita mogu da se izdaju u terapijske svrhe kao pojedinačni, ili mogu da se puliraju u jednu kesu kao terapijska doza (zbog lakše administracije). Tokom puliranja može da se koristi i leukocitni filter i tako pripreme filtrirani (leuko-redukovani) pulirani koncentrati trombocita. Pripremljeni koncentrati trombocita moraju da se skladište u posebnim uslovima kako bi sačuvali svoju funkcionalnost i hemostatsku aktivnost:

- Koncentrat trombocita mora da se kontinuirano čuva na temperaturi $22 \pm 2^\circ\text{C}$, koja je posebno pogodna za brzi razvoj bakterija koje mogu da kontaminiraju trombocite (a potiču sa mesta venepunkcije ili su prisutne u cirkulaciji davaoca). Iz tog razloga maksimalna dužina skladištenja trombocita je samo 5 dana, a može se produžiti na 7 dana ako se primene odgovarajuće metode patogene redukcije ili mikrobiološko testiranje trombocita^{6,7}.
- PVC kese u kojima se skladište trombociti se razlikuje od kesa za uzimanje krvi ili transfer kesa u tome što se sastoje od posebnih vrsta plastike koje propuštaju gasove i garantuju dostupnost kiseonika, pa se tako prevenira pad pH. Kесе su velike, obično se kesa od 1000 mL koristi za skladištenje 300 mL puliranih

trombocita, te se tako ubrzava transport kiseonika kroz veliku površinu kесе. Količina potrebnog kiseonika zavisi od broja trombocita u kesi – više trombocita traži više kiseonika⁸.

- Tokom perioda skladištenja obavezna je lagana, ali kontinuirana agitacija na ravnom agitatoru (približno 70 ciklusa u minutu), kako bi se sprečila agregacija trombocita i ubrzao transfer kiseonika. Pregrade agitatora treba da dozvoljavaju dotok vazduha do donje strane kесе (da budu mrežaste ili perforirane). Koncentrati trombocita se postavljaju pojedinačno na agitator, nikako jedan na drugi, jer to sprečava protok vazduha. Veličina i broj etiketa koje su postavljene na kesi treba da budu što manje. Adekvatna veličina kесе i agitacija održavaju pH koncentrata trombocita između 6,4 i 7,4, što predstavlja optimum skladištenja⁷⁻⁹.

METODE RADA

1. Metoda iz plazme bogate trombocitima (PRP)

Jedinica cele krvi se centrifugira brzinom i u vremenu validiranim da se dobije maksimalni broj trombocita i minimalni broj eritrocita i leukocita u plazmi. To je ključni korak u proizvodnji koncentrata trombocita ovom metodom. Centrifugirana kesa se potom postavlja u plazma ekstraktor ili automatsku mašinu za procesiranje krvi, pomoću kojih se polako izdvaja plazma bogata trombocitima u posebnu kesu. Da bi se maksimalno redukovala kontaminacija finalnog produkta eritrocitima ili leukocitima posebno mora da se vodi računa da se ne ošteti sloj između eritrocita i plazme, separacija treba da bude lagana i da se zaustavi kada ostane oko 8 mm plazme iznad sloja eritrocita^{10,11}.

Trombociti u PRP se sedimentiraju na dnu kесе centrifugiranjem na većem broju obrtaja u dužem vremenskom intervalu. Ako je drugo centrifugiranje na još većem broju obrtaja onda trombocitno dugme na dnu kесе neće biti dezagregirano. Zato je vrlo važno da se povede računa o karakteristikama centrifugiranja. Supernatantna plazma siromašna u trombocitima se odstranjuje u transfer kesu ostavljajući 50 – 70 mL plazme sa trombocitima.



Ako se ne ispoštuje usvojena procedura može biti otežana resuspenzija trombocita. Kesa mora da se ostavi da „odmori“ 1-2 h pre postavljanja na agitator. Ne preporučuje se da se proces resuspenzije ubrzava manuelnom manipulacijom trombocitnog dugmeta jer može da izazove ireverzibilnu agregaciju. Posle resuspendovanja, 4-6 koncentrata trombocita iste ABO krvne grupe mogu da se puliraju u terapijsku dozu za odrasle. U ovom procesu koncentrat trombocita se spajaju u veliku kesu za skladištenje korišćenjem sterilnog konektora ili laminarnog protoka. Preporučuje se primena sterilnog konektora, jer pul trombocita ima isti rok važenja kao i pojedinačni koncentrat (5 dana), dok se ubadanjem igle otvaraju sistemi kojima je rok skladištenja samo 6 sati^{11,12}.

Metoda iz PRP-a ima određena ograničenja. Oštro centrifugiranje u drugom koraku povećava osetljivost ćelija na određene stimulse, kao što je aktivacija trombocita, složeni lanac reakcija dovodi do promene oblika (od diskoidnog do sferičnog) i oslobađanja sadržaja unutrašnjih granula. Zavisno od intenziteta aktivacije, proces može biti reverzibilan ili ireverzibilan. Ipak, iako proces može biti reverzibilan, ponovljeni ciklusi aktivacije i deaktivacije na kraju dovode do dubokih promena u funkciji trombocita, što je poznato kao „lezija skladištenja“¹³.

Obzirom da se ovom metodom dobijaju pojedinačni koncentrat trombocita brojne su kontroverze o bezbednosti i efikasnosti puliranih koncentrata trombocita nakon skladištenja i kasnije transfuzije. *Sweeny i autori* su u najnovijim ispitivanjima pokazali mogućnost resuspendovanja trombocita u aditivnoj soluciji za trombocite (umesto u plazmi) i njihovom „pre-storage“ puliranju, što održava *in vitro* karakteristike čak i do 7 dana¹⁴.

Hedde i autori su ispitivali značaj „pre-storage“ i „after-storage“ puliranja (pre i posle skladištenja) u periodu od 7 dana¹⁵. Sedmog dana skladištenja uočena je statistički značajna razlika u vrednosti pH, pCO₂ i hipotoničnom šok odgovoru, koji su niži u puliranom produktu pre skladištenja, dok su pO₂, laktati i morfološki skor povišeni. Autori se slažu, da i pored uočene statistički značajne razlike, njena veličina je takva da se ne očekuje uticaj na efikasnost trombocita. Klinička studija koja je štampana u istom broju *Transfusion*-a pokazuje da se trombociti

pripremljeni iz PRP-a mogu skladištiti u pulu pripremljenom pre skladištenja do 5 dana dovodeći do očekivanog CCI, komparabilnog sa trombocitima koji su se skladištili pojedinačno i koji su pulirani neposredno pre transfuzije¹⁶.

2. Metoda iz „buffy coat“-a

Krajem sedamdesetih godina prošlog veka u Evropi je počeo da se uklanja sloj buffy coat -a (BC), formiran tokom centrifugiranja između plazme bogate trombocitima na vrhu i napakovanih eritrocita na dnu, kako bi se na taj način redukovalo prisustvo mikroagregata i hemolize tokom skladištenja jedinica eritrocita. Vrlo brzo nakon toga uočeno je da se i z BC mogu pripremati koncentrat trombocita i da se prinos trombocita može značajno povećati ako se za prikupljanje cele krvi koriste „top and bottom“ kese¹⁷. Kao i mnogo puta u istoriji medicine, tehnološka inovacija je omogućila primenu novih kesa i nove metode rada: pojava sterilne konekcije.

U poređenju sa metodom pripreme koncentrata trombocita iz PRP-a, metoda iz BC omogućava proizvodnju produkta sa približno jednakim sadržajem (10% manje kontaminacije leukocitima pre leukoredukcije), preko 20 mL manje eritrocita u jedinici eritrocita, ali 30-75 mL više plazme^{2,3}. Pored toga, kako je prvi korak centrifugiranja oštar, a drugi lagan, aktivacija trombocita indukovana metodom pripreme je mnogo manja.

Jedinica cele krvi se skladišti kraće od 24 sata na temperaturi 22±2°C, a zatim centrifugira kako bi se izdvojio sloj buffy coat -a u kome su trombociti i leukociti. Ovako centrifugirana krv se najčešće separiše korišćenjem automatske opreme, ali može da se koristi i manuelna metoda. Buffy coat (BC) može da se pripremi na dva načina^{18,19}:

- Klasičnom metodom iz četvorostrukih kesa - tokom separacije centrifugirane cele krvi određena količina se plazme se prebacuje u kesu, a BC sa malom količinom plazme se prebacuje u drugu kesu, ostavljajući eritrocite u originalnoj primarnoj kesu;
- Korišćenjem „top and bottom“ kesa - tokom separacije centrifugirane cele krvi određena količina plazme se prebacuje u kesu dodatu na vrhu (*top*), eritrociti se prebacuju u drugu kesu na dnu (*bottom*), ostavljajući buffy coat



sa malom količinom plazme u originalnoj primarnoj kesi¹⁷.

Pripremljeni koncentrat buffy coat-a se čuvaju na temperaturi $22 \pm 2^\circ\text{C}$ bez agitacije do daljeg procesiranja u koncentrate trombocita, najkasnije do 48 sati od davanja krvi. Trombocitni koncentratu mogu da se proizvode kao pojedinačni ili pulirani.

POJEDINAČNI KONCENTRATI TROMBOCITA IZ BC

U jedinici buffy coat-a treba da ostane 50-60 mL plazme kako bi finalni produkt imao dovoljni volumen za suspenziju trombocita. Kesa za buffy coat (BC) treba da ima dodatnu kesu u kojoj će se skladištiti koncentrat trombocita. Ova kesa može biti integrisani deo sistema kesa ili se dodaje korišćenjem sterilnog konektora.

Nakon temeljnog, ali laganog mešanja, BC se centrifugira kako bi se sedimentirali rezidualni eritrociti i leukociti, dok trombociti ostaju resuspendovani u čistoj supernatantnoj plazmi. Ovaj korak centrifugiranja je ključni kako bi se proizveo koncentrat trombocita koji sadrži veliki broj trombocita sa minimalnim brojem eritrocita i leukocita. Kako je volumen BC ja ko mali, treba voditi računa o postavljanju kесе vertikalno u kivete centrifuge, kako bi se izbegla preklapanja kесе ili formiranje džepova. Nakon centrifugiranja supernatantna plazma koja sadrži trombocite se prebacuje u kesu za skladištenje trombocita. Koncentrat trombocita se skladišti na linearnom agitatoru, a jedinica je spremna za transfuziju nakon propisnog obeležavanja^{18,19}.

Metoda pripreme koncentrata trombocita iz BC daje brojne prednosti u smislu organizacije rada u velikim transfuzijskim centrima – moguće je da se odloži proizvodnja koncentrata trombocita do 24 sata.

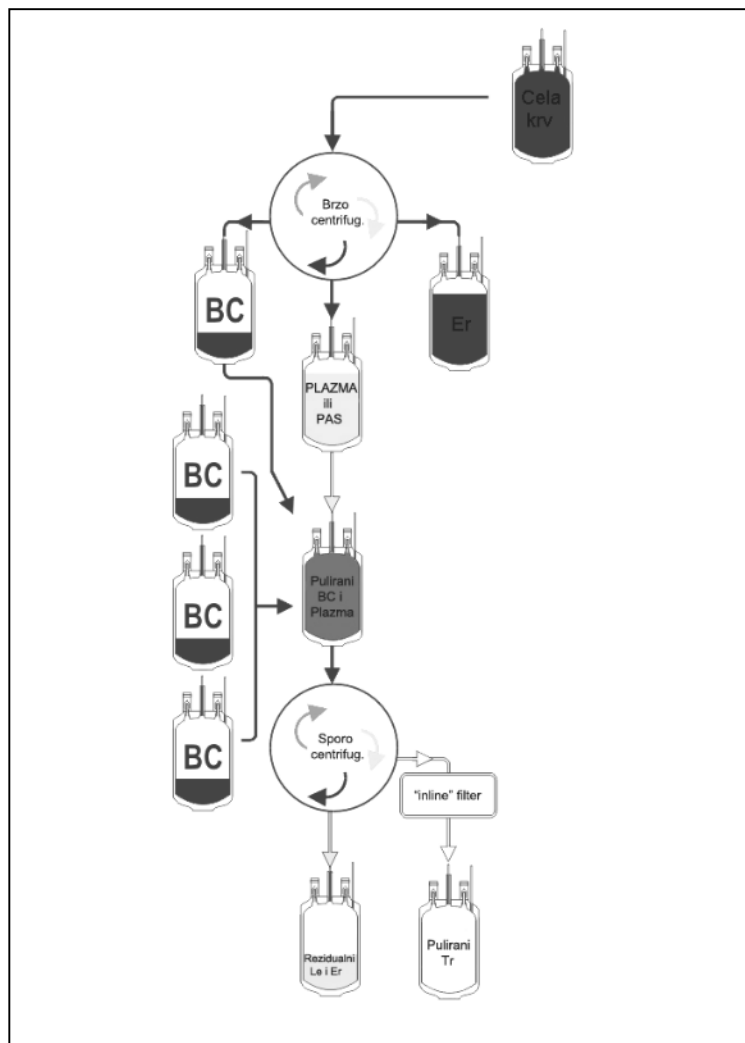
Suprotno metodi iz PRP-a, gde je obavezno procesiranje krvi unutar 8 sati od kolekcije, kada se jedinice cele krvi postavljaju na ploče koje ubrzano hlade kесе cele krvi na temperaturi $22 \pm 2^\circ\text{C}$ do 24 sata, separacija trombocita koji se pripremaju iz BC može biti odložena do 18 sati¹⁰.

PULIRANJE KONCENTRATA TROMBOCITA IZ BC

4-6 jedinica BC iste ABO krvne grupe mogu da se puliraju pre centrifugiranja. BC spreman za puliranje je prosečnog volumena 50 mL i hematokrita 0,40 – 0,50. Dilucija pula vrši se plazmom (jedna od jedinica iz koje je izdvojen BC), ili aditivnom solucijom za trombocite (PAS). PAS održava funkciju trombocita i pH bolje od plazme²⁰. BC mogu da se puliraju korišćenjem kita za puliranje ili lančanom metodom.

I Kit za puliranje:

Puliranje BC može da se vrši upotrebom komercijalnih kitova za puliranje. Korišćenjem sterilnog konektora kесе sa BC se svaka pojedinačno konektuju sa jednim od multipnih krajeva kita za puliranje, a zatim se dodaje plazma ili PAS. BC se prebacuju u transfer kesu zapremine 600 mL, a plazma ili PAS prolazi kroz sve prazne kесе u kojima je bio BC kako bi sprala zaostale ćelije. Na kraju se sadržaj svih kesa sa BC i približno 300 mL PAS-a ili plazme pulira u spojenu kesu sa ukupnom zapreminom od približno 600 mL^{2,11} (slika 1). Kesa za puliranje ima fabrički spojenu kesu za skladištenje trombocita, a ako je potrebno može biti uključen i „in-line“ filter.

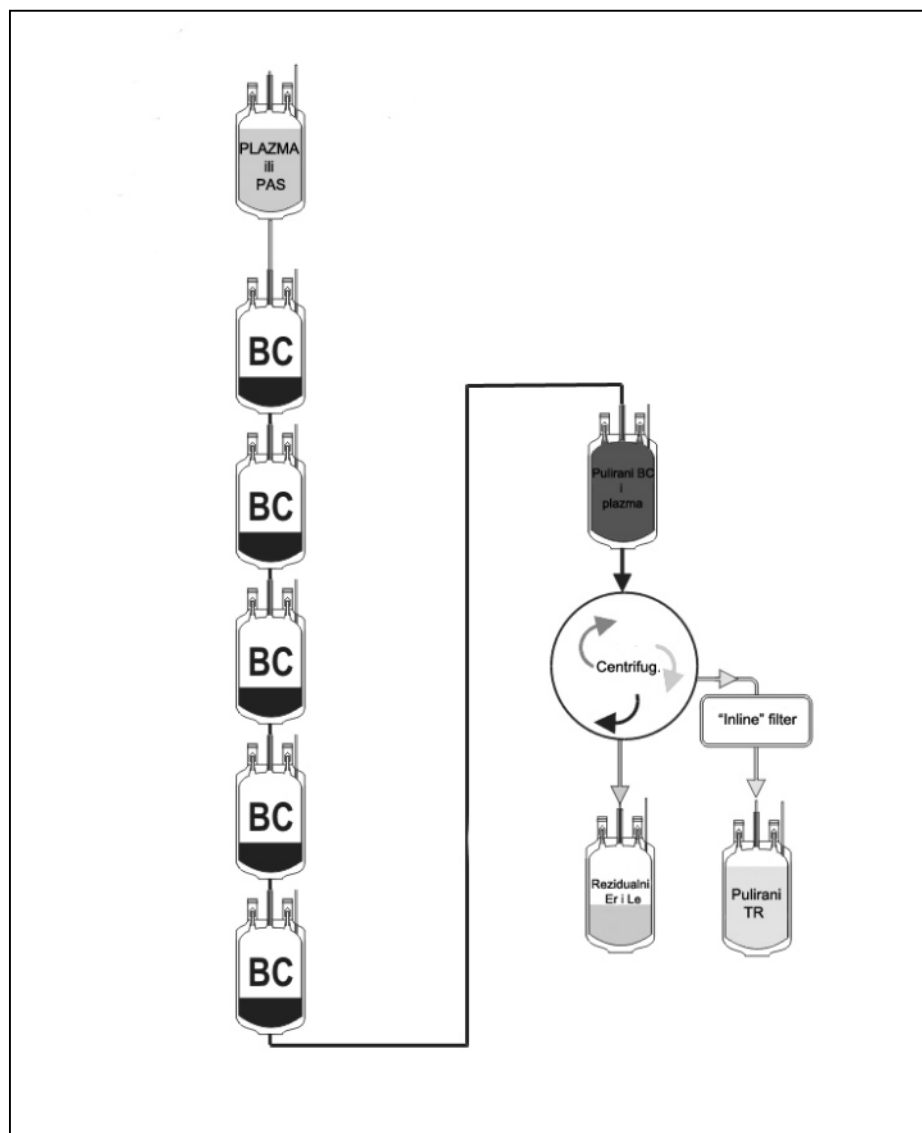


Slika 1: Puliranje „buffy coat“-a i priprema trombocita primenom kita za puliranje

II Lančana metoda:

BC separisan iz „*top and bottom*“ kese može biti puliran vrlo efikasno i ekonomično primenom ove metode. Linija na vrhu ke se za BC se povezuje sa linijom na dnu (*bottom*) druge kese sa BC korišćenjem sterilnog konektora. Na taj način željeni broj BC se povezuje u lanac, a plazma ili PAS za diluciju BC se spaja za liniju na vrhu lanca. Lanac se okači sa dilentom na vrhu.

Sadržaj svih BC se propušta do BC na dnu, a onda diluent prolazi kroz prazne BC kese (jednu po jednu), kako bi se isprao BC iz njega. Finalna kesa ima ukupnu zapreminu od 600 mL BC koji je diluiran u plazmi ili PAS. Kesa za skladištenje trombocita, koja može u sebi sadržati i „*in-line*“ trombocitni filter, spaja se kesom sa puliranim BC (slika 2).



Slika 2: Puliranje „buffy coat“-a i priprema trombocita primenom lančane metode

Kesa sa puliranim BC (pripremljenim bilo primenom kita za puliranje ili lančanom metodom), sa spojenom kesom za skladištenje trombocita, se centrifugira brzinom koja omogućava sedimentiranje eritrocita i leukocita, ostavljajući trombocite suspendovane u supernatantu (plazma ili PAS).

Uslovi centrifugiranja su ključni za uspešnu proizvodnju koncentrata trombocita sa visokim brojem trombocita i niskim brojem leukocita i eritrocita.

Centrifugirani pul se pažljivo vadi iz centrifuge i postavlja u plazma ekstraktor ili automatski aparat za procesiranje. Pod pritiskom supernatant bogat trombocitima se prebacuje u kesu za skladištenje trombocita (moguće kroz filter, ako je potrebno). Kesa sa BC koja sadrži sedimentirane leukocite i eritrocite se odbacuje^{2,17,21}.

Termin „*trombociti slučajnog davaoca*“ (*random donor platelets*) označava pojedinačne



ili pulirane koncentrate trombocita proizvedene iz jedinice cele krvi^{3,8}. Trombociti iz 4-6 jedinica krvi čine terapijsku dozu koja izlaže pacijenta

AFEREZNI TROMBOCITI

Uvođenje aferezni tehnologija kasnih šestdesetih godina prošlog veka omogućilo je kolekciju najmanje jedne terapijske doze trombocita (za odrasle) od jednog davaoca. U početku se ova metoda primenjivala za pripremu trombocita za pacijente koji su imali refraktarnost na transfuzije standardnih koncentrata trombocita kao rezultat HLA aloimunizacije. Sredinom osamdesetih godina razvio se još jedan trend primene aferezni trombocita za transfuziju, koji je podrazumevao smanjeno izlaganje pacijenta većem broju davaoca (koje je prisutno kod standardnih trombocita – terapijsku dozu čini 4-6 pojedinačnih koncentrata trombocita) i jednostavnije snabdevanje trombocitima²². Kao rezultat tog trenda u USA 2001. godine 74 % transfundovanih koncentrata trombocita su bili aferezno prikupljeni²³. U većini evropskih zemalja situacija je suprotna, većina transfundovanih koncentrata trombocita je pripremljena iz BC-a. Tehničke novine koje se dodaju u moderne separatore za trombocitaferazu doprinose značajnom poboljšanju karakteristika finalnog produkta. Moderne aferezne platforme dozvoljavaju prikupljanje trombocita jednim venskim pristupom, sa vrlo niskim sadržajem eritrocita i leukocita (može dalje produkt da se leukoredukuje, prema vrlo strogim Evropskim direktivama manje od jednog miliona ćelija po jedinici je standard), pri čemu davalac vrlo lako podnosi proceduru.

Pošto su tehnologije koje koriste sadašnji licencirani aferezni sistemi za separaciju i kolekciju trombocita različite, prikazane su razlike u karakteristikama trombocitnih produkata, uglavnom odnoseći se na nivo aktivacije trombocita^{22,24}. Ipak ne postoje dokazi da ove razlike mogu da doprinesu kliničkim razlikama kada se produkti transfunduju.

Dugo godina je plazma bila standardni medijum za skladištenje aferezni trombocita. Poslednjih godina, u cilju smanjenja posttransfuzijskih reakcija koje su posledica prisustva plazme, kao i uvođenja metoda patogene inaktivacije, uvedena je aditivna solucija za trombocite (PAS) i hiperkoncentrovani

značajnom riziku transfuzijom prenosive infekcije ili aloimunizaciji na HLA antigene, mnogo većem nego prilikom transfuzije aferezni trombocita. koncentrat trombocita. Bakterijska sepsa udružena sa transfuzijom koncentrata trombocita je i dalje najčešći infektivni rizik za pacijenta. Iz tog razloga, u brojne zemlje je uvedeno rutinsko bakteriološko ispitivanje trombocita. Evropske direktive dozvoljavaju produženje roka skladištenja koncentrata trombocita na 7 dana ukoliko se validiranom metodom dokaže odsustvo bakterijske kontaminacije⁶. U Sjedinjenim Američkim Državama, FDA (*Food and Drug Administration*) dopušta produženje roka trombocita na 7 dana ako su prikupljeni aferezom na aparatima *Amicus* (*Baxter*) ili *Trima* (*Gambro*)²⁵, i ako *BacT-Alert* (*Biomerieux*) pokazuje negativne rezultate ispitivanja.

U proceduri trombocitaferaze uzima se krv davaoca, obrađuje u afereznom aparatu i prikupljaju samo trombociti, a sve ostale komponente krvi se vraćaju davaocu, tako da on/ona može biti davalac na separatoru mnogo češće nego što bi dao/la celu krv. Ovako prikupljeni trombociti mogu biti leuko -redukovani dodatnim centrifugiranjem ili filtracijom.

Aferezni trombociti se mogu čuvati u plazmi ili mešavini plazme i PAS-a. Uslovi čuvanja su isti kao i za standardne koncentrate trombocita, obzirom da je to zatvoren sistem. Prinos trombocita u koncentratu dobijenom od jednog davaoca varira i zavisi od samog davaoca, vrste aparata i procedure, ali je u proseku ekvivalent najmanje 3 do 13 koncentrata trombocita slučajnih davalaca^{6,26}.

Aferezni trombociti su trombociti izbora, njihova primena je limitirana samo obavezanim aparatom za proizvodnju i cenom troškova.

Termin „**trombociti jednog davaoca**“ (*single donor platelets*) označava trombocite dobijene od jednog davaoca postupkom trombocitaferaze⁹. Tako se dobija prihvatljiva terapijska doza trombocita od jednog davaoca. Metoda pokazuje prednost u smislu redukcije rizika transfuzijom prenosive infekcije i HLA aloimunizacije.

Deljenje aferezni trombocita

Prinos trombocita dobijen jednom afereznom procedurom može biti veliki za skladištenje u jednoj kesi. Većina setova za aferezno davanje ima dve kese za skladištenje



koje dozvoljavaju da se produkt podeli i čuva sa adekvatnim dotokom kiseonika. Najčešće je prinos trombocita u svakoj kesi dovoljan da se primeni kao standardna terapijska doza za odrasle (približno 240×10^9 po kesi, ne manje od 200×10^9), i **svaka kesa se može primeniti drugom pacijentu**. U nekim slučajevima ako druga kesa ne može da zadovolji standardnu terapijsku dozu, može da se podeli dalje na manje jednice koje su pogodnije za pedijatrijsku primenu (više od 60×10^9 trombocita u 40-60 mL plazme ili PAS-a po kesi)^{6,9,26}.

LITERATURA

- Balint B, Todorović M. Od hematopoeze do kliničke primene hemoprodukata. In: Balint B, Trkuljic M, Todorovic M. Osnovni principi hemoterapije. Beograd: Institut za transfuziologiju VMA, 2010 (in Serbian); pp.126-31.
- Lozano M, Cid J. Platelet components today. Vox Sang 2007; 2:216-219.
- Stroncek FD, Rebull P. Platelet transfusions. Lancet 2007; 370(9585): 427-38.
- Balint B, Paunović D, Stanojković Z. Hemotherapy for patients with hemostatic disorders. in: Balint B, editor. Transfusiology. Beograd: Zavod za udžbenike i nastavna sredstva, 2004 (In Serbian).pp.331 -38.
- Maurer-Spurej E, Chipperfield K. Past and future approaches to access the quality of platelets for transfusion. Transfus Med Rev 2007; 21:295-306.
- Council of Europe. Guide to the preparation, use and quality assurance of blood components. European Directorate for the Quality of medicines, Recommendations No. R(95)15. 15th ed. 2009.
- Blajchman MA, Beckers EA, Dickmeiss E, Lin L, Moore G, Muylle L. Bacterial detection of platelets: current problems and possible resolutions. Transfus Med Rev 2005; 19:259-272.
- Slichter S. Evidence -Based Platelet Transfusion Guidelines. Hematology 2007; 1:172-8.
- British Committee for Standards in Haematology. Guidelines for the use of platelet transfusions. Br J Haem 2003; 122:10-23.
- Moroff G, Kline L, Dabay M, Hunter S, Johnson A, McNeil D, Nixon J, Sawyer S, Taylor H, Whitley P, Wahab F, Murphy S. Reevaluation of the resting time period when preparing whole blood-derived platelet concentrates with platelet-rich plasma method. Transfusion 2006; 46:572-577.
- Vassallo RR, Murphy S. A critical comparison of platelet preparation methods. Curr Opin Hematol 2006; 13:323-330.
- Arnold DM, Heddle NM, Kulczycky M, Carruthers J, Sigouin C, Blajchman BA. In vivo recovery and survival of apheresis and whole blood-derived platelets: a paired comparison in healthy volunteers. Transfusion 2006; 46:257-264.
- Seghatchain J, Krailadsiri P. The platelet storage lesion. Transfus Med Rev 1997; 11:130-144.
- Sweeney J, Kouttab N, Holme S, Kurtis J, Cheves T, Nelson E. Storage of platelet-rich plasma-derived platelet concentrates pools in plasma and additive solution. Transfusion 2006; 46:835-840.
- Heddle NM, Barty RL, Sigouin CS, Boye DM, Nelson EJ, Blajchman MA, Kelton JG. In vitro evaluation of prestorage pooled leukoreduced whole blood-derived platelets stored for up to 7 days. Transfusion 2005; 45:904-910.
- Heddle NM, Cook RJ, Blajchman MA, Barty RL, Sigouin CS, Boye DM, Nelson EJ, Kelton JG. Assessing the effectiveness of whole blood-derived platelets stored as a pool: a randomized block noninferiority trial. Transfusion 2005; 45:896-903.
- Pietersz RN, Dekker WJ, Reesink HW. A new multiple blood bag system with top and bottom drainage. Comparison with the conventional multiple bag system. Beitr Infusionsther 1990; 26:60-4.
- Perez-Pujol S, Lozano M, Perea D, Mazzara D, Ordinas A, Escolar G. Effect of holding buffy coats 4 or 18 hours before preparing pooled filtered PLT concentrates in plasma. Transfusion 2004; 44:202-209.
- Cid J, Claparols M, Pinacho A, Hernandez JM, Ortiz P, Puig L, Pau Pla R. Comparison of blood component preparation methods from whole blood bags based on buffy coat extraction. Transfus Apher Sci 2007; 36(3): 243-247.



20. Gulliksson H, AuBuchon JP, Cardigan R, van der Meer PF, Murphy S, Prowse C, Richter E, Ringwald J, Smacchia C, Slichter S, Wildt-Eggen J. Storage of platelets in additive solutions: a multicentre study of the in vitro effects of potassium and magnesium. *Vox Sang* 2003; 85:199-205.
21. Hogman CF, Eriksson L, Hedlund K, Wallvik J. The bottom and top system: a new technique for blood component preparation and storage. *Vox Sang* 1988; 55:211-217.
22. Bueno JL, Garcia F, Castro E, Barea L, Gonzales R. A randomized crossover trial comparing three plateletpheresis machines. *Transfusion* 2005; 45:1373-1381.
23. Sullivan MT, Cotton R, Read JL, Wallace EL. Blood collection and transfusion in the United States in 2001. *Transfusion* 2007; 47:385-394.
24. Vetlesen A, Mirlashari MR, Ezligini F, Kjeldsen-Kragh J. Evaluation of platelet activation and cytokine release during storage of platelet concentrates processed from buffy coats either manually or by the automated OrboSac system. *Transfusion* 2007; 17:126-132.
25. Ringwald J, Duerler T, Frankow O, Zimmermann R, Zingsem J, Stras ser E, Antoon M, Eckestein R. Collection of hyperconcentrated platelets with Tromba Accel. *Vox Sang* 2006; 90:92-96.
26. New York State Council on Human Blood and Transfusion Services. Guidelines for the administration of platelets. 2nd ed. 2006.



Београд 94

**PRIMENA GEL AGLUTINACIONE TEHNIKE U PRETRANSUZIJSKIM ISPITIVANJIMA**

Antić Ana¹, Stanojković Zoran¹, Mačukanović Golubović Lana², Jelić Marija³, Stanojković Mirjana⁴

¹ Zavod za transfuziju krvi Niš, Srbija, ² Klinički centra Niš, Klinika za hematologiju i imunologiju, ³ Vojna bolnica Niš, Kliničko-biohemijska laboratorija, Niš, Srbija,

⁴ Klinički centra Niš, Centar za medicinsku biohemiju

SAŽETAK

Primena gel aglutinacione tehnike u pretransfuzijskim ispitivanjima predstavlja trend savremene transfuziološke prakse. Ona omogućava standardizaciju imunohematoloških ispitivanja, visoku senzitivnost, specifičnost i efikasnost u radu. Pipetiranje i centrifugiranje ID -kartica je precizno, parametri testiranja su strogo kontrolisani, širok je spektar dijagnostičkih mogućnosti, postoji mogućnost ponovnog čitanja i upoređivanja rezultata, fotografisanja rezultata i njihovog čuvanja. Nema pranja eritrocita, a mogućnost otkrivanja slabih antigena i podgrupa, kao i nižih koncentracija antieritrocitnih anti tela je je podignuta na najviši nivo.

Gel aglutinaciona tehnika utiče i na organizaciju rada u laboratoriji za pretransfuzijska ispitivanja u smislu smanjenja broja zaposlenih i značajne uštede laboratorijskog stakla, a, takođe, je smanjen i rizik infekcije, nema mogućnosti kontaminacije ID-kartica i test reagenasa, jer su svi resursi koji se koriste biorazgradljivi.

UVOD

Tehniku aglutinacije antigen-antitelo mikrometodom aglutinacije u gelu prvi je opisao i uveo u rutinsku transfuzijsku praksu **Lapiere Y.** 1985. godine u Francuskoj. Metoda se zasniva na kontrolisanom centrifugiranju kroz dekstranakrilamid gel u specijalno dizajniranim mikrocevcicama u kojima se nalaze partikule gela, sferičnog oblika, koje imaju ulogu reakcionog medijuma i filtera. Gornji deo cevčice je dizajniran tako da dozvoljava prethodnu inkubaciju test seruma i eritrocita u prostoru iznad gela. Čestice gela zadržavaju aglutinate eritrocita, a propuštaju slobodne eritrocite na dno. Time je olakšano i ujednačeno očitavanje rezultata reakcije tj. smanjene su varijacije u očitavanju rezultata koje su prisutne primenom konvencionalne tehnike u epruveti¹⁻³.

Princip testa je direktna aglutinacija (u slanoj sredini) ili indirektna aglutinacija eritrocita (primenom antihumanglobulin testa) sa specifičnim antitelima na partikulama gela. Postoje tri vrste gela u ID-karticama:

- neutralni gel (sadrži gel u osmotski izbalansiranoj sredini, koristi se za testove direktne aglutinacije),
- gel sa specifičnim antitelima (sadrži mešavinu gela i specifičnog anti-seruma, kao

što su anti-A, anti-B, anti-D, koristi se za tipiziranje antigena),

- gel sa AHG reagensom (sadrži antihuman globulin (AHG), koristi se za izvođenje direktnog Coombs-

ovog testa, skriniga iregularnih antitela ili probe kompatibilnosti)^{4,5}.

U jednoj plastičnoj kartici smešteno je 6 mikrocevcica, pri čemu svaka od njih može da sadrži isti gel ili mešavinu različitih gelova, zavisno od namene. Kartice su prema proizvođaču napunjene gelom i označene.

Gel tehnika u mikrocevcicama se danas koristi rutinski za izvođenje skoro svih imunohematoloških ispitivanja, kao što su određivanje ABO Rh(D) krvne grupe, skrinig iregularnih antieritrocitnih antitela i njihova identifikacija, direktni antihuman globulin test (DAT), određivanje titra antitela, elucija i adsorpcija antitela, probe kompatibilnosti^{2,6}. U savremenoj literaturi posebno se naglašava da se ova metoda može koristiti za praćenje perifernog oporavka posle alogene transplantacije kostne srži, za detekciju paroksizmalne noćne hemoglobinurije⁷ i fetomaternalnog krvarenja⁸. Zahvaljujući mogućnosti otkrivanja antitela niskog afiniteta gel tehnika se može koristiti i za otkrivanje antitela koja nastaju unošenjem lekova i multipnih antitela. Danas se ova metoda koristi u



preko 100 zemalja Evrope, Srednjeg Istoka, Severne i Južne Amerike, Afrike, Azije i Australije. Prema zvaničnim podacima *DiaMed-a* (Švajcarska), koji je vodeća firma u proizvodnji gel kartica, dnevno se primeni oko 1.000.000 testova u svetu⁹. U Zavodu za transfuziju krvi Niš gel aglutinaciona tehnika je uvedena još 1989. godine, a u pretransfuzijska ispitivanja jula 2008. godine uvođenjem automatske linije **Swing ID-Sampler, Saxo ID-reader i Lyra-MP reader** (*DiaMed, Švajcarska*) na kojima se vrše svi elementi testiranja. Danas je ova automatska linija deo rutinskog rada u Odeljenju za pretransfuzijska ispitivanja i distribuciju krvi i produkata od krvi Zavoda.

METODA RADA

Pretransfuzijska ispitivanja se u Zavodu za transfuziju krvi u Nišu izvode prema Preporukama Britanskog Komiteta za Standarde u Hematologiji (*BCSH - British Committee for Standards in Haematology*) i predstavljaju jasno definisana i standardizovana ispitivanja uzoraka krvi davaoca i primaoca, sa ciljem postizanja maksimalnog terapijskog učinka transfuzije, uz očekivano preživljavanje ćelija u cirkulaciji¹⁰. Sastoje se od potpune identifikacije uzorka krvi i pacijenta, određivanja ili provere i potvrde krvnogrupne pripadnosti ABO Rh(D) pacijenta i jedinice krvi koja se testira, ispitivanja klinički značajnih iregularnih eritrocitnih antitela u serumu pacijenta (skrining antitela), izvođenja direktnog Coombs-ovog testa za pacijenta i imunoserološke probe kompatibilnosti (crossmatch, interreakcija).

Svi elementi pretransfuzijskih ispitivanja u Zavodu za transfuziju krvi Niš izvode se automatizovano na gel karticama (ID -kartice) i mikropločama (MP) iz uzoraka krvi pacijenata uzetih na EDTA (etilendiamin-tetrasirćetna kiselina) kao antikoagulansu. Provera krvne grupe ABO Rh(D) pacijenta i jedinice krvi koja se testira vrši se na mikropločama sa dodatim monoklonskim antitelima *DiaMed-MP test A, B, DVI+, ctl / A, B, DVI+, ctl*, dok se skrining iregularnih eritrocitnih antitela, DAT i interreakcije izvode gel tehnikom na *ID-LISS/Coombs* karticama. Kod svih pacijenata sa pozitivnim skriningom antitela testiranje se nastavlja identifikacijom antitela tj. utvrđivanjem njihove specifičnosti primenom iste metode (gel tehnika).

Priprema suspenzije eritrocita koja se koristi u mikropločama vrši se dodavanjem ID-Diluent-a 1 (*DiaMed, Švajcarska*), koji je po svom sastavu modifikovani bromelin, dok se za pripremu suspenzije eritocita za ID -kartice koristi *Diluent 2* (*DiaMed, Švajcarska*), koji predstavlja modifikovani LISS. U testiranju iregularnih eritrocitnih antitela i probama kompatibilnosti koriste se skrining eritrociti *DiaCell I, II* (*DiaMed, Švajcarska*), a za identifikaciju antitela koristi se *ID-DiaPanel* (*DiaMed, Švajcarska*).

Automatsku liniju na kojoj se vrše pretransfuzijska ispitivanja čine tri aparata, koji su povezani sa **Maestro Master Softverom**. **Swing ID-Sampler** je automatski pipetor ID -kartica i mikroploča, koji u jednom aktu pipetiranja može da primi 19 uzoraka, 12 reagenasa, 24 ID -kartica i jednu mikroploču. **Saxo ID-reader** je automatski čitač ID -kartica koji u jednom aktu može da centrifugira, očita i interpretira rezultate testiranja na 24 ID -kartice. **Lyra-MP reader** je automatski čitač mikroploča, koji vrši centrifugiranje, agitaciju, čitanje i interpretiranje rezultata ABO Rh(D) krvnih grupa, ima ugrađenu kameru u boji visoke rezolucije, što omogućava fotografisanje i čuvanje rezultata krvnih grupa davaoca i pacijenata u boji. Svi aparati su povezani sa softverskim sistemom u kome se čuvaju rezultati testiranja.

PREDNOSTI PRIMENE GEL TEHNIKE

Gel-aglutinaciona tehnika pokazuje pokazuje brojne prednosti primene u odnosu na klasičnu metodu u epruveti. Pre svega, to je visoka senzitivnost testa zasnovana na preciznom odmeravanju reaktanata, upotrebi pojačivača reakcije antigen-antitela u rastvoru niske jonske jačine, enzimom obrađenih eritrocita ili AHG reagensa. Povećana je mogućnost otkrivanja slabih antigena i podgrupa, kao i nižih koncentracija antieritrocitnih antitela. Gel aglutinaciona tehnika može da detektuje ćelijsku subpopulaciju od 1%, odnosno subpopulaciju od 2 – 4 % eritrocita u ukupnoj ćelijskoj zapremini. Neutralizacijom antitela može da detektuje subpopulaciju od 0,2 - 0,4 % ćelija (npr. u skriningu za fetomaternalno krvarenje)^{8,11}. Identifikacija antieritrocitnih antitela je brža i jednostavnija, posebno je olakšana identifikacija multipnih antitela u serumu, antitela koja nastaju unošenjem lekova, kao i ispitivanje eluata.



Suspenzije eritrocita su precizno propisane, i za razliku od klasične metode u epruveti gde se koriste 3-5 % suspenzije eritrocita, u gel tehnici se koriste 0,8 % suspenzije, čime je postignut visok odnos serum:eritrociti. Dilucija do 0,8 % suspenzije eritrocita se postiže specijalno puferisanom LISS-om koja je već dodata u ID-kartice. Pipetiranje se vrši poluautomatskim ili automatskim pipetama sa tačno određenim volumenima reagenasa, inkubiranje i centrifugiranje kartica je, takođe, strogo kontrolisano^{12,13}.

Nema potrebe za pranjem eritrocita u toku izvođenja testova, jer se eritrociti jasno izdvajaju od okolne tečnosti. Na početku centrifugiranja, eritrociti prvi ulaze u gel i lako se odvajaju od imunoglobulina u serumu pacijenta, te su slobodni da se vežu za AHG reagens. Manuelna tehnika izvođenja testova u epruveti zahteva pranje eritrocita, koje čak i ako se izvede najpreciznije, može da izazove disocijaciju antitela niskog afiniteta sa površine. To je jedan od najznačajnijih razloga zašto je ova metoda daleko osetljivija za pojedina antitela nego klasična metoda u epruveti, posebno za ona koja imaju nisku konstantu vezivanja, ali i antitela koja su usmerena ka antigenima prisutnim u malom broju na ćelijskoj membrani^{3,6}.

Aglutinati u gelu su postojani i lako uočljivi, tako da je očitavanje rezultata lako i ujednačeno. Moguće je čitanje gradacije aglutinacije (od ++++ do ±) odmah po centrifugiranju, ali i posle 24 do 48 časova, ako se ID-kartica čuva na temperaturi +4°C do +6 °C. Aglutinisane ćelije su uhvaćene u prostore između pojedinačnih partikula gela, što reakciju čini stabilnom i omogućava njeno čuvanje. Rezultati čak mogu biti fotografisani i na taj način se obezbeđuje trajan medicinski dokument koji je sigurnost za pacijenta, ali i deo bezbednosti svih zaposlenih u Službi za transfuziju. Rezultati se na ovaj način lako mogu upoređivati, što je posebno važno za adekvatno gradiranje rezultata u slučajevima multipnih imunizacija^{1,14}.

Standardizacijom uslova i tehnike izvođenja testiranja postignuta je konzistentnost u radu koja se ogleda u činjenici da se svi u zorc k rvi testiraju na identičan način i pod identičnim uslovima, čime je ljudski faktor kao uzrok greške potpuno eliminisan. Bezbednost u pretransfuzijskim ispitivanjima je podignuta na najviši nivo i smanjenjem mogućnosti greške, u smislu zamene uzoraka pacijenata, zamene

epruveta u manuelnom radu, pogrešnog ukapavanja reagenasa i sličnog¹⁵. Pojednostavljeno je obeležavanje u izvođenju testova (šest mikrocevčica na jednoj ID -kartici, 96 polja na mikroploči).

Obzirom da nema pranja eritrocita tokom izvođenja testiranja, smanjen je rizik od infekcije, nema mogućnosti kontaminacije reagenasa, ID -kartica ili mikroploča, a takođe je prevenirano stvaranje aerosola. Pored toga, postoji i značajna ušteda na laboratorijskom staklu, ali i u oblasti uklanjanja otpada, obzirom da su ID-kartice i mikroploče biorazgradljive. Nema mogućnosti infekcije za zaposlene u laboratoriji, a radne površine ostaju čiste^{4,13-16}.

ZAKLJUČAK

Primena gel aglutinacione tehnike u pretransfuzijskim ispitivanjima omogućava uniformnost i standardizaciju izvođenja svih elemenata pretransfuzijskih ispitivanja, saglasno Preporukama za pripremu, upotrebu i obezbeđenje kvaliteta komponenata krvi Saveta Evrope, poboljšava kvalitet rada, omogućava visoku specifičnost i efikasnost i povećava sigurnost u radu.

LITERATURA

1. Jovanović Srzentić S, Veljković D. Metode aglutinacije eritrocita: Tehnike aglutinacije u mikroeprevetama. In: Jovanović Srzentić S, Veljković D. Imunološki i klinički značaj krvnih grupa. Intra.Net communication Beograd, 2009:50-52.
2. Delajlija M. Development of ID gel technique in immunohematology. Books of the lectures: 10 years of using gel agglutination method for transfusion testing in Slovenia 2006 May 25-26, Maribor.
3. Cate JC, Reilly N. Evaluation and Implementation of the Gel Test for Indirect Antiglobulin Testing in a Community Hospital Laboratory. Arch Pathol Lab Med 1999; 23(8):693-7.
4. Bromilow IM, Adams KE, Hope J, Eggington J, Duguid JK. Evaluation of the ID-gel test antibody screening and identification. Transf Med 1991; 1:159-61.
5. Delaflor-Weiss E, Chizhevsky V. Implementation of gel testing for antibody



- screening and identification in a community hospital, a 3-year experience. *Lab Med* 2005; 36(8):489-92.
6. Rožman P, Šalinović UV. (Editors). 10 years of using gel agglutination method for transfusion testing in Slovenia. Maribor: Mediapront, 2006.
 7. Gupta R, Pandey P, Choudry R, Kashyap R. A prospective comparison of four techniques for diagnosis of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Int Jnl Lab Hem* 2007; 29: 119-126.
 8. Agaylan A, Meyer O, Ahrens N, Dudenhausen J, Bombard S, Salama A. Arapid gel agglutination test for determination of fetomaternal haemorrhage. *Transfus Med* 2007; 17(5):395-8.
 9. DiaMed Diagnostic and Medical Products: Information about DiaMed and Gel test: Proceedings of Transfusion Science Course Mourten, Switzerland, 2008.
 10. British Committee for Standards in Haematology. Guidelines for compatibility procedures in blood transfusion laboratories. *Transfus Med* 2004; 14:59-73.
 11. Schonitzer D. Pretransfusion Testing before and after the Discovery of the Gel Agglutination Method. Books of the lectures: 10 years of using gel agglutination method for transfusion testing in Slovenia 2006 May 25-26, Maribor.
 12. Shin SY, Kwon KC, Koo SH, Park JW, ko CS, Song JH, Sung JY. Evaluation of two automated instruments for pretransfusion testings: AutoVue Innova nad Techno TwinStation. *Korean J Lab Med* 2008; 28:214-20.
 13. Langston MM; Procter JL, Cipolone KM, Stroncek DF. Evaluation of the gel system for ABO grouping and D typing. *Transfusion* 1999; 39:300-5.
 14. Knowles SM, Milkins EC, Champan JF, Scoot M. The United Kingdom National External Quality Assessment Scheme (Blood Transfusion Laboratory Practice): trends in proficiency and practice between 1985 and 2000. *Transfus Med* 2002; 12:11-23.
 15. Hiroyuki O. Standardization and automation of pre-transfusion compatibility testing for risk-management. *Jour of Anal Bio-Sci* 2003; 26(4): 322-36.
 16. Antić A, Stanojković Z. Automatizacija u pretransfuzijskim ispitivanjima. *Bilt Transfuziol* 2010; 56 (12):88-92.



ANALIZA PETOGODIŠNJEG RADA NA PRIKUPLJANJU I OBRADI KRVI U INSTITUTU ZA TRANSFUZIOLOGIJU VMA

Rajko Graovac, Dušan Vučetić, Nemanja Borovčanin, Bela Balint
Institut za transfuziologiju, Vojnomedicinska akademija, Beograd

Uvod: Transfuziološki centri zavise od dobrovoljnih davalaca koji obezbeđuju krv neophodnu za potrebe bolesnika. Jedan od glavnih zadataka Instituta za transfuziologiju VMA je prikupljanje, obrada i racionalna distribucija optimalnih količina hemoprodukata za potrebe VMA, a drugih zdravstvenih ustanova prema potrebi i mogućnostima. Sve veća potreba za krvnim produktima i sve veće učešće civilnih osiguranika na lečenju u VMA zahteva stalno osavremenjivanje pristupa i strategija prikupljanja i obrade krvi, kao i njihovu optimizaciju tokom terapijske primene.

Cilj: Analizirati podatke o broju i strukturi izvora prikupljenih i procesiranih jedinica krvi u periodu od januara 2006. do decembra 2010. godine.

Materijal i metode: Krv se prikuplja u Institutu od heterogene populacije davalaca i na terenu od pripadnika Vojske Srbije (VS), kao i od davalaca krvi civilnih udruženja. Koriste se četvorostruke i trostruke kese proizvođača Terumo i Macopharma. Procesiranje krvi se izvodi u Institutu korišćenjem centrifuga proizvođača Heraeus i Jouan i automatskih procesora krvi T-ACE 2 Terumo.

Rezultati: U posmatranom periodu, ekipe Instituta za transfuziologiju VMA pri kupile su ukupno 89438 jedinica cele krvi. Od tog broja 45010 davalaca u Institutu i 44428 na terenima. U 2006. godini prikupljeno je 18201 jedinica cele krvi, odnosno 45,28% u Institutu i 54,72% na terenima. Tokom 2007. godine, dolazi do porasta broja davalaca krvi te je prikupljeno 18589 jedinica cele krvi. Od tog broja 43,79% čine davaoci krvi u Institutu a 56,21% na terenima. Međutim, tokom 2008. godine dolazi do smanjenja broja davalaca na terenima a povećanja u Institutu. Prikupljeno je ukupno 18081 jedinica cele krvi, odnosno 52,81% u Institutu i 47,19% na terenima. U 2009. godini, taj trend se održava, te je prikupljeno 17166 jedinica cele krvi, odnosno 51,73% u Institutu i 48,27% na terenima. U 2010. godini je prikupljeno 17401 jedinica cele krvi. Od tog broja 58,62% čine davaoci krvi u Institutu a 41,38% na terenima. Uvođenjem NAT-PCR tehnologije za rutinsko testiranje davalaca krvi i zbog povećanja broja procedura vezanih za transplantaciju tkiva i organa, dolazi do povećanja broja dijagnostičkih procedura. U navedenom periodu u Institutu od prikupljenih jedinica krvi proizvedeno je 23739 L krvi siromašne u leukocitima resuspendovane u SAGM, 2161 L filtriranih eritrocita, 16885 L plazme, 485 jedinica cele krvi (CK), 50011 jedinica koncentrovanih trombocita, 7770 jedinica krioprecipitata, 176 jedinica fibrinskog lepka i 1641 jedinica deplazmatisane krvi.

Zaključak: Analizom navedenih podataka ustanovljeno je održavanje broja davanja krvi, uz izmenjenu procentualnu zastupljenost davalaca, kao i promenjen odnos davanja na Institutu u odnosu na teren. Takve promene su srazmerne povećanju broja civilnih osiguranika lečenih u VMA. Postoji tendencija porasta pripremanja svih hemoprodukata u cilju što efikasnije usmerene hemoterapije –prvenstveno koncentrovanih trombocita, krioprecipitata, filtriranih eritrocita i fibrinskog lepka. Pravilo da "KRV-ČEKA povredjene/obolele" je u ovom periodu bio osnovni motiv za rad svih zaposlenih u Institutu. Sve prikupljene jedinice cele krvi su prerađene u one hemoprodukte neophodne za uspešno lečenje usmerenom hemoterapijom.

Ključne reči: dobrovoljni davaoci krvi, jedinice cele krvi, hemoprodukti, usmerena hemoterapija

UVOD

U našoj zemlji transfuziološki centri zavise od dobrovoljnih davalaca koji obezbeđuju krv neophodnu za potrebe bolesnika. Da bi se privukli davaoci krvi i podstaklo njihovo kontinuirano učešće, najvažnije je obezbediti odgovarajuće uslove u kojima će se tokom

davanja krvi osećati prijatno, udobno i sigurno. Adekvatno opremljene prostorije moraju biti dobro osvetljene, stalno provetravane, čiste i prikladne za prijem davalaca u ono vreme koje njima najviše odgovara. Osoblje mora biti profesionalno obučeno, dobro tehnički edukovano i ljubazno sa svakim davaocem. Bez obzira da li



se krv prikuplja u transfuziološkoj ustanovi ili od strane mobilnih ekipa, mora se učiniti sve da davanje krvi bude prijatno iskustvo. Neophodno je da svaka transfuziološka ustanova propiše svoje propise i regulative za izbor davalaca krvi koje će biti tako napravljene da će zaštititi i davaoca i primaoca krvi. 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 (1,2). Transfuziološki centri u našoj zemlji se oslanjaju 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 (3,4). U cilju obezbeđenja dovoljnih količina krvi za potrebe Vojnomedicinske akademije, mobilne ekipe Instituta obilazile su većinu garnizona u VS. Jedan od glavnih zadataka Instituta za transfuziologiju VMA je prikupljanje, obrada i racionalna distribucija optimalnih količina hemoprodukata kako za VMA tako i za druge zdravstvene ustanove prema potrebi i mogućnostima. Sve veći zahtevi za krvnim produktima i sve veće učešće civilnih osiguranika na lečenju u VMA iziskuje stalno osavremenjivanje pristupa i strategija prikupljanja i obrade krvi, kao i njihovu optimizaciju tokom terapijske primene.

CILJ RADA

Analizirali smo podatke o broju i strukturi izvora prikupljenih i procesiranih jedinica krvi u

periodu od januara 2006. do decembra 2010. godine.

MATERIJAL I METODE

Krv se prikuplja u Institutu, na terenu od pripadnika Vojske Srbije, kao i od davalaca krvi civilnih udruženja. Koriste se četvorostruke i trostruke kese proizvođača „Terumo“ (Japan) i „Macopharma“ (Francuska). Procesiranje krvi se izvodi korišćenjem centrifuga proizvođača „Heraeus“ (Nemačka) i „Jouan“ (Francuska) i automatskih procesora krvi T-ACE 2 (Terumo, Japan).

REZULTATI

U posmatranom periodu, kao što je prikazano u tabeli 1, ekipe Instituta za transfuziologiju VMA su prikupile ukupno 89438 jedinica cele krvi (CK). Od tog broja 45010 davalaca u Institutu i 44428 na terenima. U 2006. godini prikupljeno je 18201 CK (45,28% u Institutu i 54,72% na terenima). Tokom 2007. godine dolazi do porasta broja davalaca, te je prikupljeno 18589 CK. Od tog broja 43,79% čine davaoci krvi u Institutu a 56,21% na terenima. Međutim, u 2008. godini dolazi do značajnog smanjenja broja davalaca krvi na terenima, a povećanja u Institutu. Od prikupljenih 18081 CK, 52,81% davalaca je bilo u Institutu a 47,19% na terenima. Taj trend se održava u 2009. godini, kada je prikupljeno 17166 CK, odnosno 51,73% u Institutu i 48,27% na terenima. Naredne godine je prikupljeno 17401 CK, gde značajno veći procenat (58,62%) čine davaoci krvi u Institutu u odnosu na terene (41,38%).

Tabela 1: Broj prikupljenih jedinica krvi od 2006. do 2010.

PRIKUPLJENE JED. KRV	INSTITUT	TEREN	UKUPNO
2006	8241	9960	18201
2007	8140	10449	18589
2008	9548	8533	18081
2009	8880	8286	17166
2010	10201	7200	17401
UKUPNO	45010	44428	89438



Procentualna zastupljenost usmerenih davalaca je od 2008. godine postepeno rasla, da bi u 2010. godini dostigla 35%.

Tokom 2006 god. na Institutu za transfuziologiju je bilo 159573 dijagnostičkih usluga, odnosno izvedenih procedura (tabela 2). U 2007 god. dolazi do njihovog porasta na 181190, uvođenjem NAT-PCR tehnologije za rutinsko testiranje

ranje davalaca krvi. Taj broj pokazuje tendenciju rasta i u 2008 godini (215517), zbog povećanja broja imunohematoloških dijagnostičkih procedura vezanih za transplantaciju tkiva i organa. U narednom periodu broj dijagnostičkih procedura se održava na istom nivou, te je u 2009 god. izvršeno 176285, a naredne godine 167900 procedura.

Tabela 2: Dijagnostičke usluge/procedure – Institut za transfuziologiju VMA

GODINE	2006.	2007.	2008.	2009.	2010.
BROJ USLUGA/ PROCEDURA	159 573	181 190	215 517	176 285	167 900

Za brzo, kvalitetno i sigurno lečenje bolesnika, potrebno je unapred obezbediti dovoljne količine krvi i hemoprodukata u rezervi, a to se jedino može postići blagovremenim prikupljanjem jedinica krvi od dobrovoljnih davalaca krvi.

Kao što se vidi iz tabele 3, u navedenom periodu od prikupljenih jedinica krvi je proizvedeno ukupno:

- 23739 L krvi siromašne u leukocitima resuspendovane u SAGM,
- 2161 L filtrovanih eritrocita,
- 16885 L plazme,
- 485 jedinice CK,
- 50011 jedinica koncentrovanih trombocita,
- 7770 jedinice krioprecipitata,
- 176 jedinica fibrinskog lepka i
- 1641 jedinica deplazmatisane krvi (5,6)

Tabela 3: Hemoprodukti

GODINA	PRIKUPLJE NE JEDINICE	KRIO	TROM BOCITI	FILTROVANI ERITROCITI	KRV SIR.U LEUK.RES.U SAGM	PLAZMA	CK	FL	DK
2006	18201	1682	7406	294 L	4889 L	3521 L	47	23	671
2007	18589	1362	9811	237 L	4566 L	3554 L	105	25	397
2008	18081	1410	10015	382 L	5686 L	3368 L	89	26	259
2009	17166	1039	10324	718 L	3857 L	3045 L	123	30	271
2010	17401	2277	12455	530L	4741 L	3397 L	121	72	43
UKUPNO	89438	7770	50011	2161 L	23 739 L	16 885 L	485	176	1641

DISKUSIJA

Prvenstveni zadatak Instituta za transfuziologiju VMA je snabdevanje krvlju bolesnika lečenih u VMA. Krv se prikuplja u Institutu i na terenu od heterogene populacije davalaca. Zbog fluktuacije u broju prijavljenih davalaca krvi, prikupljene količine krvi od profesionalnih pripadnika Vojske Srbije (VS) u pojedinim periodima nisu bile dovoljne, pa je bilo neophodno da se za neke bolesnike lečene u VMA organizuje prikupljanje krvi od namenskih

davalaca (*rodbina, prijatelji, kolege sa posla*). U više navrata, u urgentnim situacijama, apelovalo se da i pripadnici Vojnomedicinske akademije daju krv u Institutu. Broj autolognih transfuzija krvi u VMA je mali, ali sa tendencijom stalnog porasta. Mobilne ekipe Instituta za transfuziologiju VMA prikupljaju krv od dobrovoljnih davalaca u jedinicama VS prema planovima koji se prave jednom u tri meseca. Planovi su podložni promenama i prilagođeni su potrebama za krvlju, kao i željama, odnosno



aktivnostima jedinica u kojima se krv prikuplja. Za motivaciju davalaca i organizaciju davalastva u jedinicama VS uglavnom je zaduženo sanitetko osoblje, mada u pojedinim jedinicama i komande jedinica učestvuju u tome. Za motivaciju se koriste predavanja, filmovi, flajeri, a ve liku ulogu u motivaciji imaju pored sanitetskog osoblja i komandiri jedinica. Tokom 2008 god. u saradnji sa "Zastava filmom" iz Beograda snimljen je propagadno-nastavni film o aktivnostima Instituta za transfuziologiju VMA, koji se takođe koristi u motivaciji davalaca krvi. Slična je situacija i sa dobrovoljnim davaocima civilnih udruženja. Planovi se prave u dogovoru sa njihovim predstavnicima odnosno organizatorima, koji ujedno i motivišu davaoce, a prikupljanje krvi se vrši uz obostrano zadovoljstvo. U 2008. godini, VMA je otvorila svoja vrata za lečenje civilnih osiguranika tako da se srazmerno povećanju broja pacijenata lečenih u VMA povećao i broj davalaca krvi u Institutu. U to vreme je počeo proces reorganizacije vojske, a sa smanjenjem broja regruta, smanjio se i broj davalaca na terenima u jedinicama VS. Sve veće učešće civilnih osiguranika na lečenju u VMA odrazilo se na povećanje broja civilnih davalaca u Institutu. Ostvarena je dobra saradnja sa drugim transfuziološkim ustanovama kao i sa drugim zdravstvenim ustanovama u pogledu snabdevanja krvlju. Takođe je uspostavljena izuzetno dobra saradnja sa Savezom dobrovoljnih davalaca krvi Srbije. U Savezu su posebno bili aktivna društva davalaca krvi iz: "Železnice Srbije" "Galenike", "NIS Naftagasa", "GSP-a", "Elektro distribucije" „Beogradskog vodovoda i kanalizacije“, „Kostolca“, „Želvoza“ iz Smedereva, „Kolubare“, „McDonald's“ a i dr. Pored toga, saradnja je uspostavljena i sa Savezom dobrovoljnih davalaca krvi iz Republike Srpske, te je došlo do znatnog povećanja davalaca krvi iz civilnih udruženja. U 2009. godini prikupljeno je 1093, a u 2010. godini 835 jedinice krvi iz civilnih udruženja. Uvodjenjem NAT-PCR tehnologije za rutinsko testiranje davalaca krvi, tokom 2007. godine, kao i zbog povećanog broja imunohematoloških dijagnostičkih procedura vezanih za transplantaciju tkiva i organa, dolazi do ukupnog povećanja broja dijagnostičkih usluga. Postoji tendencija porasta broja pripremanja svih hemoprodukata, u cilju što efikasnije usmerene hemoterapije povređenih/obolelih (p/o). To se prvenstveno odnosi na jedinice koncentrovanih

trombocita, filtriranih eritrocita (upotreba *in line* filtera, i drugih strategija leukodeplecije), krioprecipitata i fibrinskog lepka. Nasuprot tome, zapaža se drastično smanjenje broja izdvojenih jedinica deplazmatisane krvi, odnosno CK, kao i njihova primena u lečenju p/o. (što je u skladu sa trendom u savremenoj transfuziološkoj praksi u celom svetu).

ZAKLJUČAK

Analizom navedenih podataka ustanovljena je konstantnost broja davanja krvi (oko 18000 godišnje), generalno izmenjena procentualna zastupljenost kao i odnos broja davalaca u Institutu i na terenu. Takve promene su srazmerne povećanju broja civilnih osiguranika lečenih u VMA. Sva prikupljena krv se preradjuje u hemoprodukte koji su trenutno najpotrebniji (u zavisnosti od stanja rezervi), a krv se izdaje bolesnicima poštujući princip usmerene hemoterapije. Postoji tendencija porasta pripremanja svih hemoprodukata, u cilju što efikasnije usmerene hemoterapije, prvenstveno koncentrovanih trombocita, filtriranih eritrocita, krioprecipitata i fibrinskog lepka. Kontrola kvaliteta hemoprodukata poklanja se velika pažnja. Pravilo da **"KRV-ČEKA p/o"** je u posmatranom periodu bio osnovni motiv za rad svih zaposlenih u Institutu. Takvim stavom i zalaganjem osoblja ni je dugo trenutka nije, zbog nedostaka krvi, bio ugrožen život bolesnika.

LITERATURA

1. Balint B. Transfuziologija. Beograd: Zavod za udžbenike i nastavna sredstva; 2004.
2. Balint B, Trkuljić M. Osnovi transfuziologije. Beograd: Čigoja štampa; 2002.
3. Gligorović V, Balint B, Čalić B. Osnovi kliničke transfuziologije. Urgentna i elektivna hemoterapija hemobioloških poremećaja. Beograd: ZTK Srbije, 1996.
4. Gligorović V, Balint B. Klinička transfuziologija. Beograd: Zavod za udžbenike i nastavna sredstva; 1998.
5. Mollison PL, Engelfriet CP, Contreras M. Blood transfusion in clinical medicine. 10th ed. Oxford: Blackwell Scientific Publications, 1997.
6. Technical manual, AABB, 15th edition, 2005.



PROMOCIJA REGISTRA DAVALACA KOSTNE SRŽI - ISKUSTVA SLUŽBE ZA TRANSFUZIJU KRV I LOZNICA

Jasmina Rangelov Kulezić¹, Tomislav Mijić¹, Zorana Andrić²

¹Zdravstveni centar Dr Milenko Marin, Loznica

²Institut za transfuziju krvi Srbije, Beograd

SAŽETAK

Svetski registar davalaca kostne srži formiran je 1989. godine sa ciljem da omogući pronalaženje podudarnog davaoca kostne srži što većem broju pacijenata, a time i veći broj alogenih transplantacija matičnih ćelija hematopoeze. Svetski Registar sadrži podatke o više od 19 miliona ljudi. Registar davalaca kostne srži Srbije postoji od 2005. i za sada ima oko 2600 članova. Služba za transfuziju krvi u Loznici godišnje prikupi blizu 4000 jedinica krvi. Za 13 meseci intenzivnog rada u našoj Službi Registru se priključilo 428 osoba uзраста 18-50 godina. Rad je timski, podržan od strane Zdravstvenog centra u Loznici i Odeljenja za HLA tipizaciju Instituta za transfuziju krvi Srbije, i praćen od strane lokalnih medija. Svakodnevni kontakt sa velikim brojem ljudi daje mogućnost zaposlenima da kroz rad u maloj grupi i individualni pristup približe i pojasne potrebu uključivanja stanovništva u Registar. Akcije dobrovoljnog davanja krvi na terenu -u seoskim školama, ambulancama i mesnim zajednicama pružaju priliku terenskoj ekipi naše Službe da priču o Registru približi i dovede u sve sredine i omogućuju registrovanje potencijalnih davalaca u njihovoj sredini. U mogućnosti smo da neposredno informišemo o značaju transplantacije za obolelog, o načinima prikupljanja matičnih ćelija hematopoeze od davaoca, o mogućim rizicima i ishodima transplantacije. Nizom akcija održanih u Službi i na terenu upoznali smo naše sugrađane sa ovim novim vidom humanosti i stvorili povoljnu klimu za buduće aktivnosti koje su već u pripremi. Bolesničke službe za transfuziju krvi u Srbiji treba da budu aktivno uključene u motivaciju i regrutovanje novih članova nacionalnog Registra davalaca kostne srži.

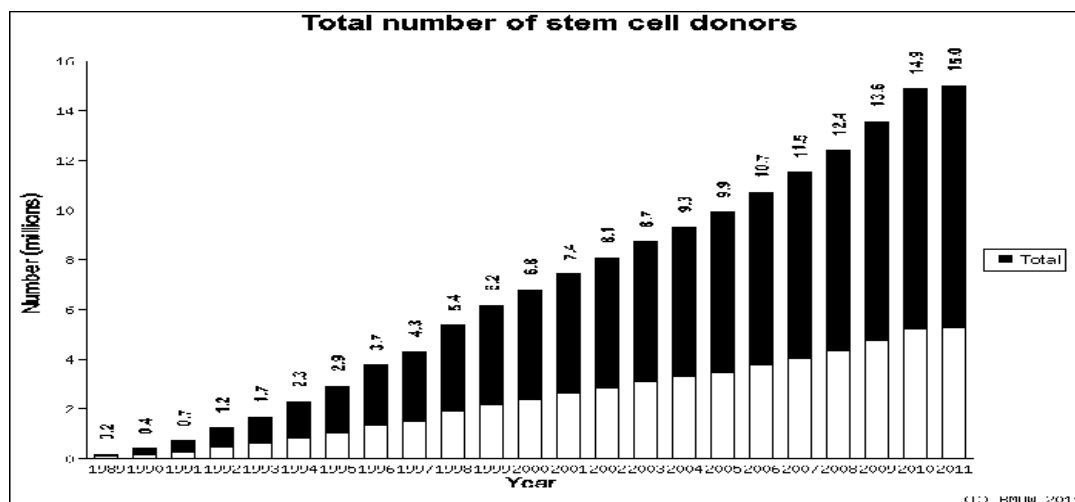
UVOD

Transplantacija matičnih ćelija hematopoeze (MČH) je terapijski metod kojim se obezbeđuje zamena oštećenih, odnosno funkcionalno manje vrednih ćelija hematopoeze zdravim matičnim ćelijama. Osobine pluripotentne matične ćelije hematopoeze su samoobnavljanje, diferencijacija, proliferacija i plastičnost. Mesto stvaranja ćelija krvi se menja tokom embrionalnog, fetalnog i postnatalnog života. Prvo je to žumančana kesa, zatim slezina i jetra, a od petog meseca intrauterinog života kostna srž postaje glavni hematopoezni organ. Transplantacijom MČH obezbeđuje se kompletna i dugotrajna rekonstitucija hematopoeznog sistema koji je oštećen usled urođenog ili stečenog hematološkog ili nehematološkog, benignog ili malignog oboljenja. Transplantacije MČH mogu biti singene, alogene i autologne. Singene transplantacije izvede se kod genetski podudarnih osoba-jednorođjenih blizanaca. Kod autologne transplantacije repopulacija kostne srži vrši se

sopstvenim ćelijama prikupljenim pre intenzivne radio ili hemioterapije. Alogene transplantacije se izvede između genetski neidentičnih osoba, ali uskladjениh na osnovu ispitivanja podudarnosti antigena u sistemu humanih leukocitnih antigena (HLA).

Jedan od ključnih parametara koji utiče na klinički ishod transplantacije je podudarnost HLA davaoca i primaoca. Međutim, verovatnoća pronalaženja podudarnog davaoca je mala zbog velikog polimorfizma sistema HLA. Oko 30% bolesnika ima odgovarajućeg davaoca među članovima porodice. Svi ostali bolesnici upućeni su na Registar davalaca kostne srži.

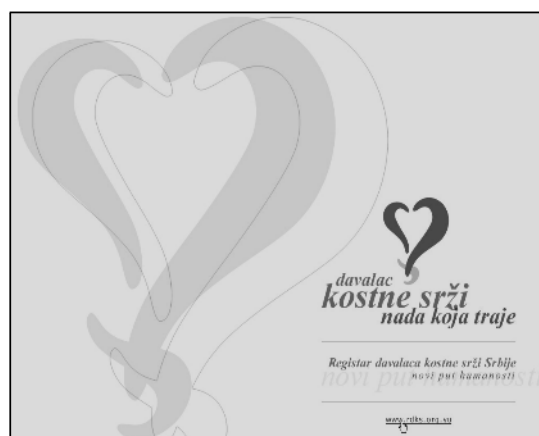
Svetski registar davalaca kostne srži sadrži bazu podataka o tipizacijama HLA davalaca MČH i HLA fenotipove jedinica umbilikalne krvi. Formiran je 1989. godine. Danas sadrži podatke za preko 19 miliona davalaca iz 66 registara iz 47 zemalja i 44 banaka umbilikalne krvi iz 29 zemalja (www.bmdw.org). Na grafikonu 1 prikazan je porast broja davalaca u Svetskom registru od formiranja do danas.



Grafikon 1: Porast broja davalaca u Svetskom registru

Zadatak Svetskog registra je da prikuplja podatke iz nacionalnih registara širom sveta i da omogući pretraživanje i distribuciju podataka nacionalnim registrima i centrima za transplantaciju. U početku je lista sadržavala podatke o serološki definisanim fenotipovima HLA. Od 1993. godine prijavljuju se podaci o molekulskim tipizacijama za klasu II, a od 2001. godine i za klasu I. Po završenom pretraživanju upućuje se zahtev za dalja ispitivanja odabranih potencijalnih davalaca radi potvrde tipizacije molekulskim tehnikama za klasu I i II, kao i za ostala laboratorijska i klinička ispitivanja izabranog davaoca. Preporuka je da se dalja ispitivanja potencijalnog davaoca rade samo ukoliko ne postoji više od jedne nepodudarnosti.

Registar davalaca kostne srži Srbije (RDKS) je formiran 2005. godine u Institutu za transfuziju krvi Srbije a u saradnji sa Ministarstvom za zdravlje Republike Srbije i službama za transfuziju krvi u Srbiji. Za sada sadrži podatke o oko 2600 davalaca, a promovise se pod sloganom „Davalac kostne srži-nada koja traje“ (Grafikon 2).



Grafikon 2: Logo Registra davalaca kostne srži Srbije

Službe za transfuziju krvi u Srbiji zadužene su za regrutovanje novih davalaca. To podrazumeva informisanje davalaca o postupku transplantacije, metodama prikupljanja matičnih ćelija hematopoeze, o svim rizicima uzimanja matičnih ćelija i mogućim ishodima transplantacije. Davalac mora biti potpuno informisan od strane medicinskog osoblja ili preko brošura i internet stranica RDKS -a



(www.rdks.org.rs). Prilikom prijavljivanja u RDKS, davalac popunjava formular saglasnosti i daje uzorak krvi za HLA tipizaciju. Davanje kostne srži zasniva se na istim principima koji važe za davalatstvo krvi - dobrovoljno, solidarno, neplaćeno i anonimno. U bilo kojoj fazi testiranja i pripreme za davanje davalac ima pravo da odustane. Međutim, podudarni davalac je jedinstven za bolesnika. Zbog toga je neophodno davaocu prilikom upisivanja u Registar detaljno objasniti značaj transplantacije za bolesnika, dužinu trajanja postupka pronalaženja odgovarajućeg davaoca i cenu potrebnih testiranja.

METODE

Davaoci krvi su informisani o Registru u Službi za transfuziju krvi Loznica i tokom akcija davanja krvi na terenu lozničkog okruga. Potrebne informacije je davalo medicinsko osoblje, a korišćene su i brošure RDKS-a. U Registar je mogla da se prijavi zdrava osoba uzrasta od 18 do 50 godina. Svaki prijavljeni davalac je popunio formular Prijava u Registar davalaca kostne srži Srbije. Uzorci krvi uzimani su u sterilne vakutejnere (3-4 mL). Na etiketi je napisano ime i prezime davaoca, kao i datum uzimanja krvi. Formulari i uzorci krvi su dostavljani Odeljenju za tipizaciju tkiva Instituta za transfuziju krvi Srbije. Uzorci su transportovani na sobnoj temperaturi do 5 dana od venepunkcije.

REZULTATI

U Službi za transfuziju krvi lozničkog zdravstvenog centra na promociji Registra davalaca kostne srži Srbije intenzivno se radi od januara 2010. Do kraja januara 2011. godine u našoj službi u Registar se prijavilo 428 osoba. U tom periodu bilo je 24 akcije na terenu. DDK je bilo 3415 u službi, a 685 na terenu. Od ukupnog broja davalaca koji su se prijavili u Registar, 29,66% pripada starosnoj grupi 18-30 godina, 40,20% je u grupi 30-40 godina, a 30,14% u grupi 40-50 godina. 79,67% upisanih je muškog pola, a 20,33% su žene. 63,32% registrovanih živi u gradskoj, a 36,68% u seoskoj sredini.

DISKUSIJA

Naš rad je timski, uključuje sve zaposlene transfuzijske tehničare i lekare, a podržan je od

strane Zdravstvenog centra u Loznici i Instituta za transfuziju krvi – Odeljenja za HLA tipizaciju. Godišnje se u našoj službi prikupi blizu 4000 jedinica krvi i upravo taj svakodnevni kontakt sa velikim brojem zdravih ljudi daje nam mogućnost da kroz rad u maloj grupi i individualni pristup približimo i pojasnimo potrebu uključivanja stanovništva u Registar. Akcije dobrovoljnog davanja krvi na terenu - u seoskim školama, ambulancama i mesnim zajednicama pružaju priliku da se omogući registrovanje potencijalnih davalaca u njihovoj sredini.

Osim svakodnevnih usmenih izlaganja i razgovora sa davaocima krvi i povremenih obraćanja lokalnim medijima, ovu temu smo predstavili i na internet stranici Zdravstvenog centra Loznice (www.zcloznica.co.rs). Organizovali smo i održali nekoliko akcija u cilju promovisanja nacionalnog Registra na području Loznice. U oktobru 2010. godine učenicima srednje medicinske škole u Loznici održan je deo praktične nastave iz predmeta Hirurgija i zdravstvena nega u prostorijama Službe za transfuziju. Tom prilikom učenici su upoznati sa dobrovoljnim davalatstvom krvi i kostne srži, a neki od njih su tada postali članovi Registra. U novembru 2010. obeležili smo Svetski dan davalaca kostne srži i na konferenciji za novinare, koja je tim povodom održana u našem zdravstvenom centru, predstavili rezultate dotadašnjeg rada i pozvali sugrađane da nam se priključe. U januaru 2011. u našoj ustanovi na inicijativu Eparhije šabačke SPC održana je akcija pod nazivom „Podrška donorskim projektima u oblasti zdravstva“. Predstavljeni su postignuti rezultati i planovi ali i iznet pozitivan stav Crkve o donorstvu krvi i kostne srži i zaveštanju organa.

Prema našim saznanjima, osobe sa kojima se susrećemo u svakodnevnom radu veoma su zainteresovane za ovaj „novi vid humanosti“, sa pažnjom slušaju naša izlaganja i mnogi od njih se rado priključuju Registru. Najčešće nedoumice i pitanja vezana su za dužinu trajanja afereznog izdvajanja matičnih ćelija od davaoca i vreme koje je potrebno za oporavak od intervencije.

U planu je priprema predavanja o ovoj temi za srednjoškolce završnih razreda svih srednjih škola u gradu, kreiranje Facebook profila namenjenog potencijalnim i aktuelnim članovima Registra, kao i priključivanje promocije Registra akcijama dobrovoljnog davanja krvi koje organizuje Opštinska organizacija Crvenog krsta



sa idejom da te akcije ubuduće nose naziv „Akcija DDK i promocija Registra davalaca kostne srži“.

Bolničke službe za transfuziju krvi u Srbiji treba da budu aktivnije uključene u motivaciju i regrutovanje novih članova nacionalnog Registra davalaca kostne srži Srbije. Do ostvarenja ovog cilja dolazi se svakodnevnim, timskim radom koji bi trebalo biti koordinisan od strane Instituta za transfuziju krvi Srbije. Na taj način se u svim sredinama mogu postići ovakvi ili bolji rezultati a time i pružiti šansa što većem broju bolesnika da nadju podudarnog davaoca kostne srži za transplantaciju.

LITERATURA

1. Andrić Z. Izbor davaoca matičnih ćelija hematopoeze - značaj HLA tipizacije. *Bilt Transf* 2010;56:73-7.
2. Andrić Z, Vavić N, Simonović R, Dukić T, Jovičić M, Garić Z, Drašković S. Registar davalaca kostne srži Srbije - novi oblik davalastva kod nas. *Bilt Transf* 2006;52:145-154, A109
3. Balint B, Stamatović D, Andrić Z. Transplantacija matičnih ćelija hematopoeze. U: Balint B, urednik. *Transfuziologija*. Zavod za udžbenike i nastavna sredstva, Beograd; 2004:525-548.
4. Green A. Selection of haematopoietic stem cell donors for transplantation. In: Bidwell JL, Navarrete C, eds. *Histocompatibility testing*. London: Immperial College Press, 2000;363-378.
5. Fischer GF. Molecular genetics of HLA. *Vox Sang* 2000, 78 Suppl 2: 261-4
6. Grgičević D. *Transfuzijska medicina u kliničkoj praksi*. Zagreb: Medicinska na klada, 2006.
7. Hurley C, Raffoux C: Special Report: World Marrow Donor Association: International standards for unrelated hematopoietic stem cell registries. *Bone Marrow Transplantation* 2004;34:103-10.
8. Petersdorf EW. Optimal HLA matching in hematopoietic cell transplantation. *Curr Opin Immunol* 2008;20:588-93.
9. Rosenmayr A, Hartwell L, Egland T. Informed Consent - suggested procedures for informed consent for unrelated haematopoietic stem cell donors at various stages of recruitment, donor evaluation and donor workup. *Bone Marrow Transplantation* 2003;31:539-545.
10. Tiercy JM. Molecular basis of HLA polymorphism: implications in clinical transplantation. *Transplant Immunology* 2002;9:173-80



ZNAČAJ ZBRINJAVANJA DISAJNOG PUTA KOD TRAUMATIZOVANOG PACIJENTA – POVREDE LICA I VRATA

I. Krstić Lečić, M. Veljović, M. Stevović, K. Mladenović, I. Udovičić, A. Popadić
Vojnomedicinska akademija Beograd, Klinika za anesteziologiju i intenzivnu terapiju

SAŽETAK

Specifičnost povreda lica i vrata kara ktere se prisustvom mnogobrojnih vitalnih struktura u ovoj regiji – gornjih disajnih puteva, karotidnih arterija, jugularnih vena, kranijalnih nerava... Teške povrede larinksa, traheje i velikih krvnih sudova vrata, izolovane ili udružene sa povredama farinksa i jednjaka vitalno ugrožavaju bolesnika bilo da su praćene opstrukcijom disajnog puta ili obilnim krvarenjem. Radi se zapravo, o povredama prvog reda hitnosti koje zahtevaju dobru obučenost i pravilnu procenu od strane lekara i tehničara koji ih zbrinjavaju.

Brza procena opšteg stanja traumatizovanog, osim orijentacije o stanju svesti, podrazumeva da se na osnovu prisustva pojedinih simptoma (trizmus, hemoptizije, hemoptoje, kašalj, promuklost, cijanoza, inspiratorni stridor, potkožni emfizem, oslabljeno – nečujno disanje i dr.) donese zaključak o prirodi, lokalizaciji i obimu povrede. Suština anesteziološkog tretmana sastoji se u obezbeđenju disajnog puta, održavanju hemodinamske stabilnosti i prevencije infekcije.

UVOD

Specifičnost povreda lica i vrata karakteriše se prisustvom mnogobrojnih vitalnih struktura u ovoj regiji – gornjih disajnih puteva, karotidnih arterija, jugularnih vena, kranijalnih nerava... Teške povrede larinksa, traheje i velikih krvnih sudova vrata, izolovane ili udružene sa povredama farinksa i jednjaka vitalno ugrožavaju bolesnika bilo da su praćene opstrukcijom disajnog puta ili obilnim krvarenjem. Radi se zapravo, o povredama prvog reda hitnosti koje zahtevaju dobru obučenost i pravilnu procenu od strane lekara i tehničara koji ih zbrinjavaju¹.

Anesteziološko reanimacioni postupci, usmereni u cilju održavanja vitalnih funkcija (uspostavljenje disajnog puta, venska linija), nastavljaju se anestezijom za ogovarajući hirurški zahvat, a završavaju u jedinicama intenzivne nege do potpunog oporavka povređenog.

Ako su ove povrede udružene sa kranocerebralnim povredama, a u slučaju da nisu praćene opstrukcijom disajnog puta i znatnim krvarenjem, mogu se tretirati tek po stabilizaciji vitalnih funkcija povređenog i onda ulaze u kategoriju povreda drugog reda hitnosti¹.

Preoperativna procena

U neposrednom preoperativnom periodu vrši se:

- brza procena opšteg stanja povređenog i obima povrede,
- obezbeđenje prohodnosti disajnog puta,
- oksigeno terapija i
- nadoknada cirkulatornog volume na.

Kod povređenih sa poremećajem svesti, prisustvo stranih tela, koaguluma i koštano - tkivnog detritusa može dovesti do mehaničke opstrukcije, pa je pre primene oksigeno terapije neophodna dobra i efikasna aspiracija².

Brza procena opšteg stanja povređenog, osim orijentacije o stanju svesti podrazumeva da se na osnovu prisustva pojedinih simptoma (trizmus, hemoptizije, hemoptoje, kašalj, promuklost, cijanoza, inspiratorni stridor, potkožni emfizem, oslabljeno - nečujno disanje i dr.) donese zaključak o prirodi, lokalizaciji i obimu povrede.

Prema procentualnoj zastupljenosti, najčešće su povrede¹:

- donje vilice sa dislokacijom fragmenata (20%),



- središnjeg dela lica po tipu Le Fort I, II, III (20%),
- povrede nosne piramide sa epistaksom (40%),
- otvorene i zatvorene povrede vrata (10%)

Kod svesnog i komunikativnog bolesnika uzimaju se podaci značajni za anesteziju (eventualno postojanje alergija, komorbiditet i sl.).

Na osnovu kliničke procene i laboratorijskih parametara, započinje se što pre nadoknada cirkulišućeg volumena infuzionim rastvorima elektrolita, plazma ekspanderima i transfuzijama krvi kroz odgovarajući broj venskih linija³.

Obezbeđenje disajnog puta

Jedan od glavnih anestezioloških problema kod povrede glave i vrata je problem otežane intubacije, kao jedne od najsigurnijih metoda obezbeđenja disajnog puta.

Ukoliko su povređene kosti lica i nosa, primenjuje se orotrahealna intubacija. Intubacija se izvodi nežno, lagano, u tehnici analgo -sedacije uz očuvano spontano disanje³.

Orotrahealna intubacija se primenjuje i kod penetrantnih povreda vrata uz obaveznu preoksigenaciju i razrađen plan za otežanu intubaciju.

Kod izolovanih povreda donje vilice sa ili bez trizmusa treba da se uradi nazotrahealna intubacija.

Poseban oprez postoji kod Le Fort III fra kture, gde postoji opasnost da se pri nazotrahealnoj intubaciji unese strani materijal iz nazofarinksa u subarahnoidalni prostor ili da endotrahealni tubus prodre u moždanu masu i zato se najčešće izvodi preliminarna traheostomija³.

Traheostomija je intervencija koja se primenjuje onda kada se preoperativnom procenom zaključi da intubacija nije moguća ili da bi ona zbog mogućnosti povrede tkiva i krvarenja bila rizična za povređenog. To su obično dramatična stanja, praćena krvarenjem i šokom u kojima bi gubitak vremena zbog neuspešnog pokušaja intubacije mogao da bude poguban po povređenog.

U izuzetno hitnim stanjima radi se krikotireoidotomija – perkutana punkcija krikotireoidne membrane sa primenom ventilacije 100% kiseonika³.

Različiti oblici orofaringe alnih tubusa i laringealnih maski se zbog traumom narušenih anatomskih odnosa, standardno ne primenjuju u zbrinjavanju povreda lica i vrata.

Anestezija

Dalje zbrinjavanje povređenog podrazumeva vođenje anestezije za odgovarajući hirurški zahvat.

Od procene opšteg stanja i vrste povrede zavisi izbor indukcionih tehnika i vrste anestezije.

Indukcija predstavlja kritičnu fazu anestezije zbog problema otežane intubacije i punog stomaka, te uvek treba imati rezervni plan obezbeđenja disajnog puta.

Poželjno je da se uradi tamponada hipofarinksa za sve intervencije na licu i vratu iznad glotisa.

Tehnika balansirane anestezije predstavlja anesteziju izbora za hirurške zahvate kod trauma ove oblasti.

Monitoring vitalnih parametara koji se apsolutno preporučuje je:

- kontinuirano praćenje EKG-a,
- srednjeg arterijskog pritiska,
- srčane frekvence,
- kapnometrije,
- saturacije krvi kiseonikom.

Buđenje iz anestezije i vreme ekstubacije zavise od lokalizacije i opsežnosti operativnog zahvata, kao i njegovog odraza na funkciju ventilacije zbog razvoja lokalnog edema tkiva⁴.

Tamo gde se postoperativno ne očekuju problemi u prohodnosti disajnog puta, vrši se ekstubacija uz potpuno očuvane zaštitne reflekse.

Međutim, tamo gde se ovakvi problemi očekuju operacija se završava traheostomijom ili odloženom ekstubacijom (npr. intermaksilarna fiksacija).

Postoperativni period

Sprečavanje infekcije je od izuzetno velikog značaja. Bliski odnosi vitalnih struktura (mozak i moždanice, veliki krvni sudovi) sa mestom povređivanja nameću potrebu za intenzivnom antibiotskom terapijom.



Standardna preporuka je trojna antibiotska terapija (cefalosporini, aminoglikozidi, metronidazol). Obavezno se sprovodi antitetanusna zaštita.

Gastrična sonda je neophodna zbog primena rane enteralne ishrane kao i održavanje hidro-elektrolitnog i kalorijskog balansa zbog kompromitovane ishrane ovih bolesnika.

ZAKLJUČAK

Povrede lica mogu, zbog blizine disajnih puteva, praviti veliki problem za obezbedjenje adekvatne ventilacije i oksigenacije tim pacijentima. Dobro utrenirana anesteziološka ekipa može te probleme rešiti. Dobru utreniranost prati stalno vežbanje, protokolisanje postupaka kod otežanih intubacija i praćenje savremenih trendova i tehnoloških inovacija.

LITERATURA

1. Bridenbaugh PO, Cruz ME, Helton SH: Anesthesia for Otolaryngologic Procedures, in Paparella: Otolaryngology (vol. IV) W. B. Saunders Co., Philadelphia, London, 2949 - 2971, 1991.
2. Gotta AW, Ferrari LR and Sullivan CA: Anesthesia for ENT Surgery. In Barash PG Cullen BF and Stoelting RK (ed s.): Clinical anesthesia (3rd ed.), Lippincott – Raven, Philadelphia – New York, 929-943, 1997.
3. Pavlović PD, Radošić N, Krejović B, Stojičić G, Stošić S: Specifičnosti anestezije kod trauma glave i vrata, Acta otorinolaringologica Serbica, 2-3: 126-130, 1995.
4. Šimić Lj, I Lalević P: Anestezija u otorinolaringologiji – Medicinska knjiga Beograd, 397-410, 1993.

AIXMED

Beograd, Aleksandra Stambolickog 27, tel: 011/2667 368, fax: 011/3067 774, e: abimed@EUnet.rs

LMA za jednokratnu upotrebu

LMA za višekratnu upotrebu



LMA Supreme™

Prva i jedina LMA za jednokratnu upotrebu sa odvojenim tubusom sa drvenju žaketa.



LMA Unique™

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



LMA Fastrach™

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



LMA Rescue™

Airway Management System
Jedinstven i ekonomski isplativ komplet sa primenu u hitnim situacijama sadrži:
LMA Fastrach Single Use™,
LMA Unique™ Plus pack i
LMA Fastrach™ ET Tube Single Use.

LMA™
Better by Design



LMA Classic™

Originalna, opšta upotreba za obezbeđivanje disajnog puta za rutinske anestezije



LMA ProSeal™

Usavršeni oblik opšteg tipa LMA za rutinsku anesteziju. Dizajniran da obezbedi gastričnu drenazu sa odvojenim tubusom za respiratorni i digestivni tok, poboljšano zaptivanje.



LMA Fastrach™

Dizajniran za upotrebu kod predviđenog ili nepredviđenog teškog disajnog puta. Može se koristiti alternativno ili da obezbedi intubaciju tokom "sa stopa"



LMA Flexible™

Flexibilan LMA dizajniran za upotrebu u hiruriji glave, vrata i mene dublje



LMA CTrach™

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



INHALACIONA POVREDA

K. Mladenović, M. Veljović, I. Krstić-Lečić, B. Kojičić, S. Bajić-Batalo
Vojnomedicinska akademija - Klinika za anesteziologiju i intenzivnu terapiju

SAŽETAK

Inhalaciona povreda je česta kod pacijenata sa opekotinama. Indikator je loše prognoze. Stopa mortaliteta kod prisutne inhalacione povrede je veća od 50%.

Razvija se u tri faze:

- 1. Faza reanimacije traje 48 sati*
- 2. Rana postreanimaciona faza traje 2-6 dana*
- 3. Faza zapaljenja, počinje 7 dana nakon povrede*

Posle termičke povrede, uobičajeni su poremećaji oksigenacije i ventilacije. Respiratorna funkcija se, takođe, može pogoršati inicijalnom nadoknadom volumena rastvorima, dok inhalacija dima i čestica može dovesti do primarne povrede plućnog parenhima.

Procena oštećenog disajnog puta se obavlja direktnom laringoskopijom, fiberoptičkom nazofaringoskopijom i bronhoskopijom, radiografski, kao i analizom gasova u arterijskoj krvi.

Znaci povrede donjih disajnih puteva, obilno se javljaju 24h nakon povređivanja. Anesteziolog bi trebalo da prepozna mogući razvoj opstrukcije. Veoma je važna ta inicijalna procena zbog bezbednosti disajnog puta.

Osnova terapije je oksigenacija putem intubacije. Ako je pacijent budan daje se prednost nazotrahealnoj intubaciji. "Zlatni standard" terapije inhalacionih povreda je i dalje protektivna mehanička ventilacija uz primenu malih disajnih volumena i visok PEEP. Novina je primena azot-monoksida u cilju smanjenja poremećaja ventilaciono-perfuzionog odnosa. Primenuje se i inhalacija nebulizovanog haparina pomešanog sa albuterolom

UVOD

Inhalaciona povreda je česta, naročito kod pacijenata sa teškim opekotinama. Prisutna je kod 3 do 21% opekotina, sa stopom mortaliteta većom od 50%.¹

Sumnja na inhalacionu povredu (požar u zatvorenom prostoru, opekotine lica), apsolutna je indikacija za hitnu endotrahealnu intubaciju. Precizna istorija bolesti, takođe je vrlo važna za postavljanje dijagnoze.

Mehanizam dejstva

Jedna kategorija inhalacionih povreda prouzrokovana je inertnim gasovima, kao što su ugljen-dioksid i naftni gasovi (metan, etan, propan), koji zamenjuju vazduh i kiseonik, izazivajući asfiksiju.² Druga kategorija izazvana je iritantnim gasovima: amonijak, formaldehid, hloramin, azot-dioksid, koji rastvoreni u mukozi respiratornog trakta, dovode do hemijskih

opekotina i inflamatornog odgovora. Gasovi iz prve kategorije, budući da su rastvorljiviji u vodi, više oštećuju gornje disajne puteve, dok ovi drugi, manje rastvorljivi, više oštećuju pluća.³

U treću kategoriju spadaju gasovi koji su sistemski toksini, kao što su ugljen-monoksid, vodonik-cijanid i vodonik-sulfid. Oni onemogućavaju isporučivanje kiseonika neophodnog za ćelijski metaboliizam.

Patofiziologija

Povrede gornjih disajnih puteva posledica su direktnog termičkog dejstva, bilo vrelim vazduhom, bilo u sklopu opekotina lica i vrata težeg stepena. Manifestuju se edemom, eritemom i ulceracijom. Jezik, aritenoidne hrskavice i epiglottis mogu oteći, sužavajući disajni put. Edem se obično povlači posle 4-5 dana.



U gornjim disajnim putevima, dolazi do trenutnog hlađenja vrelih gasova. Jedino vrela para, sa 4000 puta većim toplotnim kapacitetom od vazduha, dospeva do donjih disajnih puteva, vršeći njihovo termičko ostećenje.

Medjutim, povreda samog plućnog parenhima, najčešće je prouzrokovana proizvodima nepotpunog sagorevanja. Najvažniji medju njima su aldehidi i oksidi sumpora i azota. Gorući PVC oslobadja najmanje 75 toksičnih produkata, uključujući hlorovodoničnu kiselinu i ugljen-monoksid.²

Dolazi do deepitelizacije u traheobronhijalnom stablu. Polja edema i kongestije se smenjuju sa poljima kolapsa i pneumonije. Progresivno odvajanje epitela sa stvaranjem pseudomembrana u disajnim putevima, dovodi do njihove delimične ili potpune opstrukcije. Lezije variraju od blage, površne deskvamacije do stvaranja pseudomembrana koje sadrže mukus, ćelijski debris, fibrinski eksudat, polimorfonukleare i bakterije. Plućni parenhim koji okružuje zahvaćene disajne puteve pokazuje kongestiju, intersticijalni i alveolarni edem, neutrofilnu infiltraciju, hijaline membrane i polja atelektaze. Vremenom, ove lezije progrediraju, stvarajući materijal prvenstveno sastavljen od fibrina. Jednom formiran, može dovesti do potpune respiratorne opstrukcije.

Još jedan važan faktor u patofiziologiji inhalacione povrede je i značajno smanjenje plućne komplijanse, koja može biti smanjena i za 50%.²

Inhalaciona povreda dovodi do trenutne inaktivacije surfaktanta, sa posledničnim mikroatektazama i odgovarajućim poremećajem ventilaciono-perfuzionog odnosa. Kod teških povreda, fiziološki šant koji dovodi do duboke hipoksemije i akutna mikrovaskularna povreda sa povećanom transvaskularnom ekstrasvazacijom stvaraju kliničku sliku akutnog respiratornog distress sindroma (ARDS).

Ugljen-monoksid ima mnogo puta veći afinitet za hemoglobin od kiseonika, dovodeći do drastičnog smanjenja u dopremanju kiseonika tkivima, sa pomeranjem krive disocijacije oksihemoglobina u levo i posledničnim razvojem metaboličke acidoze.

Dijagnoza

Često se postavlja indirektnom opservacijom. Ovo podrazumeva opećenost lica, oprljenost

nazalnih dlačica, podatak o požaru u zatvorenom prostoru. Takodje, karbonifikovani sputum, predstavlja još jedan klasičan znak inhalacije dima, mada nije tačan prediktor ozbiljnosti povrede.

Neophodno je uraditi gasne analize arterijske krvi, naime, prisustvo metaboličke acidoze bez nekog drugog razloga, govori u prilog trovanja ugljen-monoksidom ili vodonik-cijanidom. U tom slučaju, treba ispitati nivo cijanida u krvi.

Dispnea, kašalj i vizing, retko su prisutni na prijemu, javljajući se samo u sklopu najtežih povreda i ukazujući na ekstremno lošu prognozu. Rendgenski snimak pluća na prijemu, takodje se pokazao lošim indikatorom. Iako dve trećine pacijenata razviju difuzne ili fokalne infiltrate ili plućni edem u okviru 5-10 dana, film na prijemu retko ima dijagnostički značaj.

Trenutni standard što se dijagnoze tiče je fiberoptička bronhoskopija. Medjutim, korisna je samo kod identifikovanja povrede gornjih disajnih puteva. Bronhoskopija bez kliničkog nalaza, ne isključuje mogućnost povrede plućnog parenhima.

Da bi se to utvrdilo, koristi se skeniranje radioaktivnim Xenonom. To je brz i siguran test koji zahteva minimalnu kooperativnost pacijenta. Prikazuje polja sa smanjenim ispiranjem alveolarnog gasa, što identifikuje mesta obstrukcije malih disajnih puteva.

Terapija

Potrebno je ukloniti pacijenta sa mesta nesreće i postaviti ga u vodoravni položaj.

Ukoliko ne diše adekvatno, ili postoji verovatnoća pogoršanja respiratorne funkcije, treba ga intubirati. Kiseonik se može primeniti i preko kiseonične maske sa protokom od 6 do 12 l/min.

Bronhijalna higijena je termin koji opisuje nekoliko modaliteta, kojima se postiže čišćenje disajnih puteva. Forsiranje kašljanja, fizioterapija grudnog koša, rano podizanje, aspiracija disajnih puteva, terapijska bronhoskopija i farmakološki agensi, efikasni su u otklanjanju zaostalog sekreta.

Većina lekova koji se koriste u terapiji bronhospazma, smatraju se korisnim u kontroli bronhijalnog mišićnog tonusa. Simpatikomimetici su efikasni na dva načina: dovode do relaksacije bronhijalne muskulature i stimulišu mukocilijarno čišćenje.

Aerosolizirani N-acetilcistein, moćan je mukolitik koji se koristi za respiratornu negu.



Racemski epinefrin koristi se kao aerosolizirani vazokonstriktor, bronhodilatator i sekretolitik.

Na osnovu trenutnih podataka, što se tiče mehaničke ventilacije, služimo se preporukama Američkog Koledža lekara koji se bave grudnim košem⁴:

- Plato primenjenog pritiska ne bi trebalo da bude veći od 35cmO₂.
- Pozitivan endekspiratorni pritisak (PEEP) je značajan u podržavanju oksigenacije
- Da bi se postigao cilj limitiranja plato pritiska, PCO₂ može da raste (permisivna hiperkapnija)
- Veliki respiratorni volumen (8-10ml/kg), sa PEEP-om, može biti neophodan za poboljšavanje oksigenacije.

Kasne komplikacije

Trahealne komplikacije se često vidjaju i podrazumevaju traheitis, trahealne ulceracije, stvaranje granuloma.

Mesto stenozе je gotovo uvek subglotično i javlja se na mestu kafa endotrahealne ili traheostomske tube.

Hronična bolest pluća je relativno retka komplikacija inhalacione povrede i može biti opstruktivnog ili restriktivnog tipa, ili oboje.

ZAKLJUČAK

Inhalaciona povreda udružena sa opekotinama predstavlja izazov za one koji učestvuju u lečenju. Tehnički i fiziološki problemi koji komplikuju respiratornu podršku, zahtevaju sistematični pristup. Uspešni ishod zahteva obraćanje pažnje na lečenje prioriteta, pridržavanje protokola i vođenje računa o detaljima.

LITERATURA

1. Haponik E. Smoke Inhalation Injury: some priorities for respiratory care professionals. *Resp Care* 1992;37:609.
2. Einhorn IN. Physiological and toxicological aspects of smoke produced during the combustion of polymeric materials. *Environ Health Perspect* 1975;11:163-189.
3. Head JM. Inhalation injury in burns. *Am J Surg* 1980;139(4):508-12.
4. Venus B, Matsuda T, Copiozo JB, Mathru M. Prophylactic intubation and continuous positive airway pressure in the management of inhalation injury in burn victims. *Crit Care Med* 1981;9(7):519-23



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 terapiju u svim oblastim

Emergency Care · OR/Anesthesia · Critical Care · Home Care

**PREHOSPITALNA NADOKNADA VOLUMENA KOD TRAUMATIZOVANIH PACIJENATA**

M. Veljović, A. Milovanović, A. Popadić, I. Udovičić, M. Stevović, B. Milutinović
Vojnomedicinska akademija Beograd, Klinika za anesteziologiju i intenzivnu terapiju

SAŽETAK

Primarni cilj u tretmanu politraumatizovanih pacijenata je da minimizira posledice hemoragičkog šoka i tako obezbedi preživljavanje. Agresivna nadoknada volumena može biti štetna zato što dovodi do povećanja krvnog pritiska i cirkulatornog volumena koji može dovesti do razbijanja stvorenog krvnog ugruška, diluirati faktore koagulacije i preokrenuti prirodni odgovor organizma na krvarenje. Koncept dozvoljene hipotenzije sa malim volumenom infuzije, sa hipovolemijom i hipotenzijom koja se toleriše do definitivnog zbrinjavanja krvarenja je strategija koja daje šanse za većim preživljavanjem. Brojna animalna i humana istraživanja podržavaju strategiju dozvoljene hipotenzije.

UVOD

Trauma je vodeći uzrok smrti u populaciji od 4-44 godine¹. Najčešći uzrok smrti je hipovolem ijski šok nastao iskrvarenjem. Šok dovodi do cirkulatorne insuficijencije koja ima za posledicu neadekvatnu perfuziju i oksigenaciju tkiva. Ovi poremećaji dovode do organske insuficijencije i smrti. Primarni cilj tretmana politraumatizovanih pacijenata je da minimizira posledice šoka ili preokrene negativnu kaskadu čime će se omogućiti veće preživljavanje. Traumatizovani pacijenti su heterogena grupa pacijenata pa je teško smisliti jednu strategiju za nadoknadu volumena koja bi bila optimalna za sve situacije. Krajnji cilj terapije traumatizovanog pacijenta bi trebalo da bude što pre definitivna kontrola krvarenja sa normalizacijom tkivne perfuzije

Nadoknada volumena

Nadoknadom volumena postiže se sprečavanje šoknog stanja ili se preokreću već stvoreni štetni mehanizmi kao posledica hipovolemije. Problem nadoknade volumena postoji odavno sa različitim strategijama za rešavanje. Sprovedena su brojna istraživanja na životinjama i ljudima da bi se utvrdio pravi način za nadoknadu volumena kod traumatizovanih pacijenata.

Najveći broj saznanja o korisnim efektima nadoknade volumena je objavljen upotrebom animalnog modela za kontrolu krvarenja u period

od 1950- 1960 godine². Brojnim istraživanjima je potvrđeno da se ekstraćelijski deficit može nadoknaditi samo kristaloidima, volumenom 2-3 puta većim od procenjenog gubitka krvi, zato je tradicionalna strategija nadoknade volumena 3:1, kristaloidi : krv.

Preporučena agresivna nadoknada volumena bazirana na animalnim modelima je problematična. Prvo, animalni model za kontrolu krvarenja ne opisuje tačno patofiziologiju krvarenja kod traumatizovanog pacijenta. Održavanje krvnog pritiska je kontrolisano od strane istraživača što ne predstavlja pravi fiziološki odgovor na krvarenje. Krvarenje na modelu je sporo, pa taj model ne reprezentuje pacijenta sa traumom koji obično umire zbog brzog iskrvarenja, povrede centralnog nervnog sistema, a ne zbog produžene hipotenzije. Drugo, mali je broj randomizovanih istraživanja sa agresivnom nadoknom volumena kod traumatizovanih pacijenata sa nekontrolisanim krvarenjem.

U pokušaju da se poboljša fiziološki model traumatizovanog pacijenta, razvijen je model krvarenja sa nekontrolisanim vaskularnom povredom 80-tih godina. Eksperimenti na ovom modelu su pokazali da nadoknada volumena može biti štetna^{3,4,5}. Nekoliko je štetnih mehanizama koji učestvuju u agresivnoj nadoknadi volumena, npr povećanjem krvnog pritiska i cirkulatornog volumena, kao rezultat nadoknade volumena, nastaje razbijanje krvnog ugruška, dilucija faktora koagulacije i menja se prirodni odgovor organizma na krvarenje (gubi se vazokonstrikcija koja skreće



krv iz periferije za održavanje perfuzije vitalnih organa).

Model povrede unutrašnjeg organa razvijen je da bi se simulirala tupa povreda. U ovim eksperimentima agresivna nadoknada sa kristaloidima povećava gubitak krvi i što je najvažnije ne smanjuje mortalitet^{6,7,8}.

Razvijanjem koncepta hipotenzivne resuscitacije da se malim nadoknadama volumena, sa hipovolemijom i hipotenzijom koja se toleriše kao nužno zlo, do definitivne kontrole krvarenja može postići uspeh u rešavanju traumatizovanih pacijenata. Mali volumen nadoknade (npr 500ml kristaloida) treba da je dovoljan da održava sistolni pritisak od 80-90 mmHg¹⁰.

Walter B Cannon je zaslužan kao prvi koji je predložio kontrolisanu hipotenziju kao mehanizam za smanjenje unutrašnjeg krvarenja tokom nekontrolisanog krvarenja pre definitivnog rešavanja povrede¹⁰.

Postoje dve moguće strategije kontrolisane hipotenzije za rešavanje traumatizovanih pacijenata:

1. Odložena resuscitacija, gde se hipotenzivni period namerno produžava bez nadoknade volumena, dok se operativno ne napravi definitivna hemostaza ili
2. Dozvoljena hipotenzija, gde se vrši nadoknada volumena ali održavanje krvnog pritiska manjeg od normotenzije (normotenzija se definiše kada je srednji arterijski pritisak 80 mmHg ili veći).

U praksi, ova dva načina se mogu kombinovati i prilagoditi individualnim potrebama pacijenata.

Radi lakšeg praćenja traumatizovani pacijenti su podeljeni prema vrsti povrede na pacijente sa penetrantnim povredama, na pacijente sa tupim povredama i pacijente sa karniocerebralnim povredama. Različiti oblici povreda zahtevaju i različiti tretman.

Kod penetrantnih povreda na postoje randomizovana klinička istraživanja koja bi uporedila hipotenzivnu i normotenzivnu nadoknadu volumena. Neka sprovedena istraživanja su pokazala povećanje mortaliteta kod rane u odnosu na kasnu nadoknadu volumena¹¹ i povećanje preživljavanja kod hipotenzivne nadoknade volumena¹².

Kod tupa povreda istraživanja na životinjama su pokazala superiornost hipotenzivne u odnosu na agresivnu nadoknadu volumena. Istraživanja na ljudima su veoma limitirana, nema randomizovanih

kliničkih istraživanja koja bi uporedila hipotenzivnu sa normotenzivnom strategijom.

Postoje brojna istraživanja na životinjama koja podržavaju gledište da hipotenzivna resuscitacija smanjuje gubitak krvi i samim tim smanjuje potrebe za transfuzijom u svim subgroupama trauma. U istraživanjima na ljudima kod penetrantnih povreda gubitak krvi je veći kod pacijenata koji su imali agresivnu nadoknadu volumena¹². Kod tupih povreda značajno veća količina krvi je upotrebljavana kod pacijenata koji su imali agresivnu nadoknadu volumena u odnosu na pacijente koji su imali restriktivnu nadoknadu volumena¹³.

Ne postoje klinička istraživanja na ljudima za hipotenzivnu nadoknadu volumena kod trauma glave i efekat na volumen krvarenja i potrebe transfuzije. Udruženja, Brain Trauma Foundation, American Association of Neurological Surgeons i Joint Section on Neurotrauma and Critical Care, preporučuju da kod povreda glave sa hemoragičnim šokom nadoknadom volumena treba održavati sistolni pritisak od 100 mmHg¹⁵.

Postoje dve dileme o upotrebi strategije hipotenzivne nadoknade volumena. Prvo, iskrvarenje može biti tako da se malim volumenom ne može prevenirati srčani zastoj kao posledica hipovolemije. Drugo, preživljavanje može biti smanjeno zbog kasnih komplikacija koje nastaju kod multiorganske disfunkcije i sepse kao oštećenja koja nastaju u periodu hipotenzivne resuscitacije.

Skorasnji vodici bazirani su na mišljenjima eksperata u patofiziološkoj racionalnosti prema istraživanjima na ljudima i životinjama. Cilj je ograničeno davanje volumena tečnosti prema niskom sistolnom pritisku koji je bezbedan u određenoj situaciji. Titracija tečnostima je u volumenu od 250 do 500 ml kristaloida. Ovo je u suprotnosti sa tradicionalnom nadoknadom volumena davanjem u startu 2l kristaloida u cilju održavanja normotenzije. Nadoknadu volumena kod hipotenzivne resuscitacije treba početi kada su ispunjena tri uslova¹⁴:

1. Promena senzorijuma
2. Nemogućnost palpacije radijalnog pulsa
3. Sistolni pritisak manji od 80 mmHg

Ponavljati infuziju od 250 ml kristaloida sa kontinuiranim monitoringom, cilj je obnova svesnosti, radijalnog pulsa i sistolnog pritiska od 80 mmHg.



ZAKLJUČAK

Hipotenzivna nadoknada volumena smanjuje gubitke krvi i transfuziološke potrebe. Istraživanja na životinjama pokazala su da obilna nadoknada krvi povećava cirkulatorni volumen i sistolni pritisk i time povećava ili restartuje krvarenje.

Kao i sa većinom tretmana u medicini i ovde postoje neželjeni efekti. Hipotenzivna resuscitacija može poboljšati preživljavanje u ranom period, ali kasne komplikacije koje nastaju kao posledica hipoperfuzije mogu potencijalno izazvati organske disfunkcije i kasnije smrt.

LITERATURA

1. National Statistics. Mortality Statistics, causes 2005. DH2: no32, London. Office for National Statistics, 2006
2. Wiggers C. Experimental haemorrhage shock. *Physiology of Shock* Commonwealth Fund 1950;121-43.
3. Krausz M, Bar-Ziv M, Rabinovici R et al. "Scoop and Run" or stabilize hemorrhagic shock with normal saline or small-volume hypertonic saline? *J Trauma* 1992;33:6-10.
4. Chudnofsky C, Dronen SC, Syverud SA et al. Early versus late fluid resuscitation: lack of effect in porcine hemorrhagic shock. *Ann Emerg Med* 1989;18:122-26.
5. Bickell W, Bruttig S, Millnamow G et al. The detrimental effects of intravenous crystalloid after aortotomy in swine. *Surgery* 1991;110:529-36.
6. Solomonov E, Hirsch M, Yahya A et al. The effect of vigorous fluid resuscitation in uncontrolled hemorrhagic shock after massive splenic injury. *Crit Care Med* 2000;28:749-54.
7. Krausz MM, Bashenko Y, Hirsch M. Crystalloid or colloid resuscitation of uncontrolled hemorrhagic shock after moderate splenic injury. *Shock* 2000;13:230-35.
8. Matsuoka T, Hildreth J, Wisner D. Uncontrolled hemorrhage from parenchymal injury: Is resuscitation helpful? *J Trauma* 1996;40:915-21.
9. Joint Royal Colleges Ambulance Liaison Committee. Clinical practice guidelines for use in UK ambulance services. London. 2004.
10. Cannon W, Frasen J, Cowell E. The preventive treatment of wound shock. *JAMA* 1970;223:618-21.
11. Kwan I, Bunn F, Roberts I, on behalf of the WHO Pre-Hospital Trauma Care Steering Committee. Timing and volume of fluid administration for patients with bleeding following trauma. *The Cochrane Database of Systematic Reviews* 2003. Issue 3. Art. No.: CD002245.
12. Bickell WH, Wall MJ, Jr., Pepe PE et al. Immediate versus delayed fluid resuscitation for hypotensive patients with penetrating torso injuries. *New Engl J Med* 1994;331:1105-09.
13. Turner J, Nicholl J, Webber L et al. A randomized controlled trial of prehospital intravenous fluid replacement therapy in serious trauma. *Health Technol Assess* 2000;4:1-57.
14. Blumenfeld A, Melamed E, Kalmovich B et al. Prehospital fluid resuscitation I trauma: the IDF-MC Consensus Panel Summary. *J Israel Milit Med* 2004;1:6-10.
15. The Brain Trauma Foundation, The American Association of Neurological Surgeons The Joint Section on Neurotrauma and Critical Care. Resuscitation of blood pressure and oxygenation. *J Neurotrauma* 2000;17:471-82.

**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 setove, 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



TRAUMA I ANESTEZIJA

B. Đorđević, M. Veljović, J. Obradović, A. Popadić, I. Udovičić, A. Milovanović
Vojnomedicinska akademija Beograd, Klinika za anesteziologiju i intenzivnu terapiju

SAŽETAK

Pristup traumatizovanom pacijentu (TP) je kompleksan, multidisciplinaran, gde vreme i brzina reaganovanja imaju presudnu ulogu u njihovom preživljavanju. Anesteziološko vodjenje TP ima za cilj da spreči pet smrtonosnih HIPO: hipoksiju, hipovolemiju, hipoperfuziju, hipotermiju i hipoterpiju, sve u često ograničenom vremenu od 20 min i manje i da optimizira stanje TP pre hirurške obrade. SCOR sistemima i trijažom TP usmeravaju se ka neodložnoj ili odloženoj hirurškoj kontroli oštećenja sve u cilju sprečavanja letalne trijade. Anesteziološki princip podrazumeva kod uvida u opštu anesteziju, brz uvid, imobilizaciju vratne kičme i održavanje hemodinamske stabilnosti TP, a kod održavanja anestezije, rešavanje očekivanih i neočekivanih promena stanja TP. Regionalna anestezija takodje ima ulogu u zbrinjavanju TP. Postoperativni tretman u jedinicama intenzivne nege podrazumeva monitoring, laboratoriju, analgeziju i prevenciju komplikacija.

UVOD

Zbrinjavanje TP predstavlja veliki izazov za svakog lekara a posebno anesteziologa, jer zahteva kompleksan i multidisciplinarn pristup sa liderom tima u cilju da se brzo i na vreme dijagnostikuju i rešavaju povrede, što je presudno u preživljavanju i prevenciji komplikacija TP. Primarna reanimacija TP počinje na mestu povredjivanja i podrazumeva: obezbeđivanje disajnog puta, ventilaciju i oksigenaciju TP, održavanje cirkulacije, zaštitu cervikalne kičme i imobilizaciju a nastavlja se u jedinicama intenzivnog lečenja (JIN).

Anesteziološko vodjenje

Anesteziološko vodjenje TP podrazumeva početnu procenu opšteg stanja povredjenog, monitoring, laboratorijske analize i dijagnostičke procedure, uvid u anesteziju, vodjenje anestezije, povratak i praćenje povredjenog u JIN-e.

Monitoring i dijagnostičke metode

TP se priključuje na osnovni monitoring koji podrazumeva merenje krvnog pritiska (NIBP), temperature tela, SpO₂, EKG, ukoliko vreme dozvoljava invazivni monitoring omogućuje praćenje CVP-a, PCWP-a i direktno merenje arterijskog pritiska. Laboratorijske analize svedene

su na osnovne: kompletna krvna slika, krvna grupa i Rh faktor, INR, urin, ukoliko vreme dozvoljava TP se podvrgava Rtg-u glave, grudnog koša, karlice i ekstremiteta, radi se CT, MR, MSCT, ultrasonografija i Dopler krvnih sudova, dijagnostičko peritonealno ispiranje, konsultacije sa lekarima drugih specijalnosti.

Početna procena disanja

TP u JIN-e najčešće dolazi intubiran, što nije uvek slučaj, kada proveravamo pozicioniranje endotrahealnog tubusa (ETT) koji je zlatni standard u obezbeđivanju disajnog puta, vršimo zamenu COMBI tubusa ETT ili kod nazotrahealne intubacije pacijenta proveravamo da li postoji povreda baze lobanje¹. Ukoliko je pacijent neintubiran stiga u JIN-e, obezbeđivanje disajnog puta (DP) kod TP predstavlja veliki izazov i za iskusnog anesteziologa, posebno ako imamo pacijenta sa povredom maksilofacijalne regije, disajnog puta i vratne kičme gde asimetrični pokreti grudnog koša, cijanoza, potkožni emfizem, SpO₂, EtCO₂ ukazuju da se radi o neadekvatnoj ventilaciji, što zahteva torakalnu drenažu ili punkciju II međjurebarnog prostora kod pneumo, hemato-toraksa i obezbeđivanje ventilacije sa oksigenacijom².



Procena cirkulacije

TP najčešće umiru od hemoragijskog šoka. Ovi pacijenti mogu biti i u kardiogenom i spinalnom šoku. Neophodna je brza procena kakva je kontrola cirkulacije na osnovu EKG-a, NIBP-a, kapilarnog punjenja, diureze, temperature, distenzije vena na vratu, znakova šoka i obezbediti adekvatnu nadoknadu volumena. Ovo podrazumeva obezbeđivanje venskog puta bilo perifernog ili centralnog i primenu kristaloida, koloida, krvi i krvnih derivata zagrejanih od 38-40°C, Brzina infuzije može biti do 1500ml/min, preko više venskih puteva, pomoću sistema koji su prenosivi zbog transporta TP³. Agresivnom nadoknom volumena raste arterijska tenzija, smanjuje se viskoznost krvi, vrednost Hct i faktora koagulacije, smanjuje imuni odgovor, dovodi do elektrolitnog disbalansa i rane reperfuzije, što potvrđuju kliničke studije da je održavanje umerene hipotenzije značajno za ranu koagulaciju⁴.

Neurološka procena

Neurološka procena TP podrazumeva procenu oštećenja CNS-a na osnovu Glazgov koma skale (GCS), pa tako razlikujemo lako oštećenje mozga kada je GCS 13-15, umereno oštećenje kada je GCS 9-12 i teško oštećenje mozga kada je GCS manji od 9, na osnovu motornih i senzitivnih ispada i refleksije pupila³.

Cilj reanimacije

Sve preduzete mere i postupci imaju za cilj da spreče pet smrtonosnih HIPO: hipoksiju, hipovolemiju, hipoperfuziju, hipotermiju, hipotermiju, što podrazumeva održavanje sistolnog pritiska između 80-100mmHg, vrednosti Hct od 25-30%, trombocita preko 50000, PT/APTT u granicama normale, temperature tela preko 35 °C, normalizaciju Ca²⁺ i laktata³.

Trijaža

U kliničkoj praksi se koristi nekoliko različitih SCOR sistema kojima se boduju vitalne funkcije i objektivizuje stanje pacijenta na prijemu i u toku lečenja, kao i trijažiranje TP. Trijaža je podela pacijenata na osnovu individualnih terapijskih potreba i raspoloživih sredstava na životno

ugrožene pacijente, koji zahtevaju neodložno hirurško zbrinjavanje (HCO) i na one koji nisu životno ugroženi, koji zahtevaju odloženu HCO.

Hirurška kontrola oštećenja

Urgentne hirurške intervencije za spašavanje života TP moraju se sprovesti bez odlaganja. U te postupke spadaju: hirurško obezbeđivanje distalnog puta-traheotomija, eliminisanje patološki povišenog intratorakalnog pritiska, pleuralnom drenažom, punkcijom II m.p., rešavanje tamponade srca-punkcijom perikarda ili torakotomijom, normalizovanjem patološkog intrakranijalnog pritiska (IKP)-kraniotomijom i hirurško zbrinjavanje masivnih krvarenja⁴. Odložena kontrola oštećenja odnosi se na zbrinjavanje intraabdominalnih i intratorakalnih krvavljenja⁵, lezije šupljih organa, povrede kičmenog stuba, compartment sindroma, otvorenih preloma, fraktura dugih kostiju i karlice, evakuaciju intrakranijalnih hematoma. HCO ima za cilj da spreči pogoršanje metaboličkog stanja TP, stanje šoka i time letalnu trijadu: acidozu, koagulopatiju i hipotermiju⁶.

Anestezija

TP koji zahteva neodložnu HCO najčešće se uvodi u opštu anesteziju (OA). Premedikacija ovih pacijenata podrazumeva sedaciju i analgeziju. Kao indukcionim agensima mogu se koristiti propofol u dozi 2mg/kg, tiopenton u dozi 3-4mg/kg, koji imaju depresivno dejstvo na KVS, zbog čega se primenjuju u manjim dozama i titrirano, midazolam u dozi 0,2mg/kg, ketamin 0,5-1mg/kg koji obezbeđuje analgeziju uz simpatičku stimulaciju što mu daje prednost kod pacijenata u šoku ali povećava IKP što ga čini nepoželjnim kod TP sa povredom glave. Etomidat 0,1-0,3mg/kg pruža najveću stabilnost KVS. Inhalacioni anestetici nisu indikovani za uvod u opštu anesteziju TP ali po postizanju HD stabilnosti, mogu se koristiti za održavanje anestezije. Od mišićnih relaksanata sukcinil-holin 1,5mg/kg je relaksant izbora za brz uvod u anesteziju TP i sumnje na pun stomak. Njegova neželjena dejstva, hiperkalijemija, aritmije, porast IKP i intokulacionog pritiska ograničavaju njegovu upotrebu kod pacijenata sa masivnom traumom, opekotinama, povredom kičmene moždine, kraš povredom, nervacionih povreda. Alternativa ovom relaksantu



jeste rokuronijum 1,2mg/kg ili vekuronijum , 2mg/kg³.

Održavanje anestezije

TP u toku OA se utopljava grejačima i zagrevanjem infuzionih tečnosti i krvi. Održavanje anestezije vrši se kod HD stabilnih pacijenata kombinacijom O₂/gas/inhalacioni anestetik, N₂O se ne primenjuje kod pneumo-toraksa, encefalusa, peritoneuma. Kod HD nestabilnih TP o bezbedjenje hemodinamske stabilnosti zahteva primenu inotropa, vazopresora posle rešavanja hemostaze. Primena krvi i volumena, stalni monitoring TP kod koga se stanje može menjati, ne dozvoljavaju opuštanje anesteziologa kod rešavanja ovakvih pacijenata. Pacijenti kod kojih su ispunjeni kriterijumi za ekstubaciju treba ekstubirati⁷. Ne treba ekstubirati pacijente koji su intoksicirani, starije sa edemom, HD nestabilne, sa teškim opekotinama, povredama grudnog koša i glave, koji su primili masivnu transfuziju...

Regionalna anestezija

Pacijenti sa bilo kojom vrstom povrede, često imaju apsolutnu ili relativnu kontraindikaciju za primenu regionalne anestezije (RA). Međutim, kod pacijenata sa traumom mogu biti prisutne različite povrede i za zbrinjavanje nekih od njih RA (centralni i periferni blokovi) nudi određene prednosti i može biti primenjena kao samostalna anestezija ili uz OA⁸.

Postoperativno praćenje

Praćenje TP u postoperativnom periodu u JIN-e, podrazumeva monitoring, laboratorijske analize, analgeziju, koja je često zapostavljena, gde adekvatna terapija bola smanjuje kratkoročni i dugoročni morbiditet i mortalitet kod pacijenata

koji trpe različite traume tkiva kao i prevenciju komplikacija tipa atelektaze, hipotermije i koagulopatije⁹.

ZAKLJUČAK

Od mesta povredjivanja do postoperativnog praćenja TP u JIN-e, učestvuje čitav tim lekara, srednjeg medicinskog kadra i bolničara. Anesteziološki tim ima vodeću ulogu u trauma timu u rešavanju vemo problematičnih TP. Dobra uvežbanost i praćenje savremenih trendova u lečenju teško povredjenih pacijenata smanjiće broj komplikacija i smrtnih slučajeva.

LITERATURA

1. Bryden DC, Gwinnutt CL. Airway management: the difficult airway. *Trauma* 2000; 2: 113-123
2. Karch SB, Lewis T, Young S. Field intubation of trauma patients: complications and outcomes. *Am J Emerg Med* 2001; 32-37
3. Dutton RP, McCunn M. Anesthesia for trauma. *Miller Rd, ed Anesthesia 6ed. Elsevier Churchill Livingstone* 2005
4. Katz Lm, Manning E, McCurdys, et al. HBOC - 201 Improves survival in a swine model of hemorrhagic shock and liver injury. *Resuscitation* 2002; 54: 77-87
5. Moore FA, Mc Kinley BA, Moore EF. The next generation in shock resuscitation *The lancet* 2004; 363: 1988-96
6. Wilson WC. Anesthesia. *Cousi durations for Abdominal Trauma In: Charles E. Smith Trauma Anesthesia* 2008; 155-171
7. Nada Popovic; Anestezija u trauma 2010;
8. Elliot JM. Regional anesthesia in trauma. *Trauma* 2001; 3: 161-174
9. Williamson S, Kumar CM. Paravertebral block in head injured patient with chest trauma. *Anesthesia* 1997; 284-285

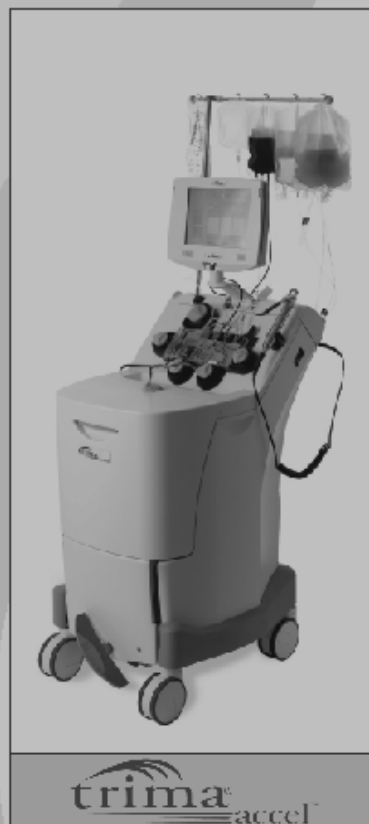


EKSKLUZIVNI  ZASTUPNIK I DISTRIBUTER



*Bezbednost...
Efikasnost...
Jednostavnost...*

**Očigledan izbor za
redukciju patogena!**



*Fleksibilnost...
Prilagodljivost...
Produktivnost...*

Više od inovacije!

www.medicon.rs



TROMBOEMBOLIJSKE KOMPLIKACIJE KOD TRAUMATIZOVANIH PACIJENATA

I. Popović, M. Veljović, B. Djordjević, J. Obradović, M. Stevović, I. Udovičić

Vojnomedicinska akademija Beograd, Klinika za anesteziologiju i intenzivnu terapiju

SAŽETAK

Venska tromboembolija (VTE) u traumi bolesnika, je ozbiljan problem u jedinicama intenzi vnog lečenja. VTE uglavnom nastaje trombozom dubokih vena, čije komplikacije dovode do mort aliteta kod više od 50% pacijenata. Farmakološka prevencija od VTE s antikoagulansima, često su kontraindikovana kod politraumatizovanih pacijenata zbog rizika od krvarenja. Mehanička profilaksa u obliku venske kompresijske čizme, često je neizvodljiva fizički, zbog vrste povrede, spoljašnjih fiksatora, otoka, itd. Pružanje efikasne VTE profilakse, dok se u isto vreme pruža definitivni tretman politraumatizovanog pacijenta, može biti noćna mora. Venski tromboembolizam, ostaje u prostoru aktivnog istraživanja, fokusiranog na dijagnostičke tehnike, nove metode hemijske i mehaničke profilakse, poboljšanje razumevanja etioloških faktora za razvoj postrauma t-skih tromboembolijskih komplikacija

UVOD

Tromboembolijske komplikacije, duboka venska tromboza (DVT) i plućna tromboembolija (PTE) su značajan uzrok morbiditeta i mortaliteta kod politraumatizovanih pacijenata. Klinička dijagnostika je nepouzdana i lečenje može biti kasno, neadekvatno ili čak štetno, tako da je prevencija ovih komplikacija od suštinskog značaja¹.

Etiologija

Tromboembolijske komplikacije nastaju zbog oštećenja endotela krvnih sudova, venske staze i hiperkoagulabilnosti krvi, što čini Virhovljevu trijadu. Kod politraumatizovanih pacijenata postoji povišen rizik zbog produžene imobilizacije, tj. produžene venske staze, ili zbog intraoperativne manipulacije hirurškim instrumentima i prolongiranog pritiska pneumatske manžetne².

Rizične grupe

Postoje četiri visoko rizične grupe politraumatizovanih pacijenata za nastanak tromboembolijskih komplikacija. To su pacijenti sa povredom glave, kičmene moždine, kompleksnom povredom karlice i prelomom kuka i butne kosti. Učestalost pojave DVT kod politraumatizovanih pacijenata je 58%. Inače incidenca DVT prema mnogim autorima ne zavisi samo od vrste povrede, već i od dijagnostičke procedure i vrste profilakse^{3,4}.

Postoji vodič kliničkog predviđanja prema Wells-u, koji određuje verovatnoću nastanka DVT

i kliničarima omogućava da klasifikuju pacijente na pacijente visokog, srednjeg i niskog rizika. Vodič kliničkog predviđanja po Wells-u, uzima u obzir faktore rizika, kliničke znake i prisustvo ili odsustvo alternativne dijagnoze.

Gradacija rizika za nastanak tromboembolijskih komplikacija kod hirurških pacijenata:

- nizak rizik- ukoliko pacijent ima manje od 40 godina starosti, a obavlja se hirurška intervencija koja nije komplikovana i koja zahteva minimalnu postoperativnu imobilizaciju
- umeren rizik- ukoliko pacijent ima manje od 40 godina starosti, a obavlja se opsežan hirurški zahvat ili ukoliko pacijent ima između 40 i 60 godina starosti i jedan ili više faktora rizika, a obavlja se manji hirurški zahvat.
- visoki rizik- ukoliko pacijent ima više od 60 godina, a obavlja se opsežna hirurška intervencija ili ukoliko pacijent ima između 40 i 60 godina i ima više faktora rizika.
- veoma visok rizik- ukoliko pacijent ima preko 40 godina starosti i predistoriju venskog tromboembolizma, a obavlja se opsežna ortopedska operacija ili pacijent ima multiplu traumu. U pacijente veoma visokog rizika spadaju i pacijenti sa akutnom povredom kičme.

U svetu su rađene tri velike studije (Class I, II, III), koje su imale za cilj da formulišu vodiče za profilaksu tromboembolijskih komplikacija kod politraumatizovanih pacijenata⁵. One su pokazale



da su pacijenti sa prelomom kičme i posledičnom povredom kičmene moždine, veoma izloženi riziku za nastanak DVT^{6,8}. Takođe je pokazana povezanost između starosti i rizika za nastanak DVT^{3,6,7}. Studije su pokazale i da donedavno smatrani visoko rizičnim, pacijenti sa prelomom butne kosti, karlice ili glave nisu tako podložni dobijanju tromboembolijskih komplikacija⁹.

Profilaksa

Profilaktičke mere podrazumevaju one za sprovođenje postupaka kojima se sprečava nastanak komplikacija - primarna profilaksa i sekundarna, primena mera i postupaka kod već ispoljenih tromboembolijskih komplikacija, tj. opšta i specifična profilaksa. Pod opštim merama tromboprofilakse podrazumevaju se mere koje sprečavaju nastanak posttraumatskog šoka, dehidracije, hemokoncentracije i povećanja viskoziteta krvi, kao i atraumatska tehnika rada i rano podizanje pacijenta iz kreveta. Specifične mere tromboprofilakse su mehanička sredstva i medikamenti. Mehanička sredstva su ona koja se koriste za sprečavanje nastanka venske staze i ona potpomažu vensku drenažu iz donjih ekstremiteta. To su kompresivni zavoji i čarape, pneumatske naprave za sekvencijalnu kompresiju mišića, (sequential compression devices – SCD), elektrostimulatori mišića i IVC filteri (inferior vena cava filters). Rezultati koji su postignuti primenom mehaničkih sredstava su dobri, a njihova primena je veoma značajna ukoliko postoje kontraindikacije za primenu medikamenata.

Prevenција tromboembolijskih komplikacija medikamentima, zasniva se na primeni lekova sa antikoagulantnim efektima. Najčešće se koriste derivati kumarina, kao i heparin, odnosno niskomolekularni heparin (Low Molekular Weight Heparin- LMWH). Zbog efikasnosti i sigurnosti, jednostavnosti primene, kao i prihvatljive cene, niskomolekularni heparini danas predstavljaju lekove izbora za profilaksu i lečenje tromboembolijskih komplikacija.

Primena malih doza heparina LDH, 2-3 puta dnevno 5000 ij sc, pokazala se međutim malo efikasnom¹⁰. LDH povećava aktivnost antitrombina III, koji je potentan prirodni inhibitor faktora X, pa samim tim utiče na spoljašnji i na unutrašnji put koagulacije.

Sa druge strane, primena LMWH u profilaksi DVT se preporučuje naročito ako se radi o povredama koje zahtevaju prolongirano ležanje (npr. prelom karlice, kompleksni prelomi kostiju donjih ekstremiteta, prelom kičme sa povredom kičmene moždine, gde ne postoje udružene povrede koje mogu dovesti do krvavljenja), ali se ne preporučuje kod pacijenata sa teškom povredom glave, gde postoji rizik od intrakranijalnog krvarenja, ili kod pacijenata kod koga se plasira ili je nedavno uklonjen epiduralni kateter¹¹.

Kod politraumatizovanih, prevencija tromboembolijskih komplikacija je kompleksna, pa apsolutne kontraindikacije za primenu madikamentozne profilakse su: povreda glave sa intrakranijalnim hematomom, povreda kičmene moždine, akutna hemoragija i poremećaj koagulacionog statusa. U tom slučaju se pribegava primeni nekih od mehaničkih sredstava za prevenciju DVT, kao što su SCD^{12,13}, ili IVCF (inferior vena cava filter)^{14,15}.

Klinička slika i dijagnoza DVT

Veoma često, DVT ostaje neprepoznata, zato što su simptomi suptilni i skriveni. Može se primetiti hladan, izrazito bolan ekstremitet, pretibijalni edem ili induracija kože.

Dijagnostikuje se uz pomoć Dopler sonografije krvnih sudova, zatim MSCT angiografije, kao suverenije metode.

Sekundarna profilaksa DVT

Sekundarna profilaksa obuhvata mere i postupke za uklanjanje već stvorenog tromba u dubokim krvnim sudovima donjih ekstremiteta i male karlice i sprečavanje nastanka ozbiljnije i potencijalno smrtonosne plućne tromboembolije (PTE).

Pribegava se uklanjanju tromba, trombektomiji, primeni trombolitika (streptokinaza, lanetoplaza, retaplaza, urokinaza), ili primeni heparina, kao najznačajnijeg antikoagulantnog leka.

Peroralni antikoagulantni lekovi su derivati kumarina i inandiona i primenjuju se posle parenteralne heparinske terapije. Tokom oralne terapije, neophodno je praćenje vrednosti protrombinskog vremena, PT-INR testom



(Prothrombin Time-International Normalised Ratio).

Plućna embolija

To je najozbiljnija komplikacija DVT sa visokom smrtnošću u toku prvih nekoliko sati, a kod pacijenata koji su preživeli inicijalni napad, rekurentne embolije i smrtni ishod se mogu sprečiti brзом dijagnostikom i adekvatnom terapijom, a propusti su mogući zbog nespecifičnih simptoma i znakova. Ako se ne leči, trećina pacijenata koji su preživeli inicijalnu PE, umire od narednih tromboembolijskih komplikacija.

Respiratorne posledice PE su: poremećaj alveolarnog mrtvog prostora, vazokonstrikcija, hipoksija, hiperventilacija, a kasnije se mogu javiti dve dodatne posledice: regionalni gubitak surfaktanta i infarkt pluća.

Hemodinamske posledice su: smanjenje poprečnog preseka plućnog vaskularnog korita, povećanje plućnog vaskularnog otpora, povećanje afterloada desne komore, poremećaj rada i otkazivanje desne komore.

Težina kliničke slike zavisi od toga koliki je deo plućne cirkulacije zahvaćen trombom, pa se može razviti masivna plućna embolija, kao najteži oblik, akutni infarkt pluća, akutna embolija bez infarkta ili multiple plućne embolije.

Najčešći fizički znakovi su: dispneja, bol u grudima, kašalj, hemoptizije, tahikardija, hipotenzija, poremećaj senziorijuma i groznica.

Od dijagnostičkih procedura validni su: EKG, grudna radiografija, CT, plućna scintigrafija i plućna angiografija.

Od laboratorijskih testova korisni su: D-dimer test, gasne analize krvi, troponin, moždani natriuretski peptid.

Masivna plućna embolija manifestuje se nalazom na EKG zapisu (QRS-kompleks i T-talas). Klasično se opisuje prominjajući S talas u standardnom I odvodu, dubok Q, negativni T talas i blaga elevacija ST segmenta u III odvodu, negativan T u desnim prekordijalnim odvodima (V1-V3), što se skraćeno beleži S1-Q3-T3 i takav nalaz je prisutan samo kod 20% pacijenata sa plućnom embolijom. EKG nije dijagnostičko sredstvo izbora za dijagnostikovanje plućne embolije, jer takav nalaz može biti prisutan i ukoliko je u pitanju bronhospazam, pneumotoraks ili bilo koji drugi uzrok nastanka Cor pulmonale, ali

je koristan da bi se isključilo postojanje infarkta miokarda.

Na radiografskom snimku pluća se ne može uvek potvrditi dijagnoza PE, ali ukoliko je prisutna masivna PE može se videti klinasta ili trouglasta senka na plućima, linearna atelektaza ili pleuralni izliv. Za konačno postavljanje dijagnoze, potrebno je uraditi kompjuterizovanu plućnu angiografiju.

Terapija obuhvata 100% oksigenaciju i primenu heparina i to inicijalno 70 ij/kg, a zatim kontinuirano u infuziji 18 ij/kg/h, uz monitoring efikasnosti, 6-8h posle inicijalnog bolusa. Vrednost APTT-a treba da se kreće između 51 i 68s.

Vecina pacijenata kod kojih nastane masivna plućna embolija umire u toku prva dva sata od nastanka te komplikacije, pa je prevencija veoma važna.

ZAKLJUČAK

Venski tromboembolizam i plućna tromboembolija, kao najteža komplikacija su veoma opasne i potencijalno smrtonosne kod politraumatizovanih pacijenata. Obzirom na vrstu i težinu povrede, moguću hemoragiju, treba pronaći adekvatno rešenje za prevenciju ovih komplikacija, što je nekada veoma teško. Buduća istraživanja u sferi medikamentata i mehaničkih sredstava će, nadamo se, pomoći u smanjenju morbiditeta i mortaliteta politraumatizovanih pacijenata.

LITERATURA

1. Knudson MM, Collins JA, Goodman SB, et al. Thromboembolism following multiple trauma, J Trauma 1992;92:2-11.
2. Rogers FB. Venous thromboembolism in trauma patients: a review. Surgery 2001;130:1-12.
3. Geerts WH, Code KI, Jay RM et al. A prospective study of venous thromboembolism after major trauma Am J Surg. 1994;331:1601-1606.
4. Shackford SR, Davis JW, Hollingsworth Frielund P, et al. Venous thromboembolism in patients with major trauma Am J Surg. 1990;159:365-369.



5. Interim Manual for Clinical Practice Guideline Development. Rockville, MD: Agency for Health Care Policy and Research; May 1991.
6. Meyer CS, Blebea J, Davis K Jr, Fowl R, Kempsczinski RF, Surveillance venous scans for deep venous thrombosis in multiple trauma patients. *Ann Vasc Surg.* 1995;9:109-114.
7. Piotrowski JJ, Alexander JJ, Brand CP, et al. Is deep vein thrombosis surveillance warranted in high risk patients? *Am J Surg.* 1996;172:210-213.
8. Napolitano LM, Garlapati VS, Heard SO, et al. Asymptomatic deep venous thrombosis in trauma patient; is an aggressive screening protokol justified? *J Trauma.* 1995;39:651-659.
9. Abelseth G, Buckley RE, Pineo GE, et al. Incidence of deep venous thrombosis in patients with fractures of the lower extremity distal to the hip *J Orthop. Trauma.* 1996;10:230-235.
10. Greenfield LJ, Proctor MC, Rodriguez JL, et al. Posttrauma thromboembolism prophylaxis. *J Trauma.* 1997;42:100-103.
11. Green D, Lee MY, Lim AC, et al. Prevention of thromboembolism after spinal cord injury using low molecular weight heparin. *Ann. Intern Med.* 1990;113:571-574.
12. Gersin K, Grinlindger GA, LEE V, et al. The efficacy of sequential compression devices in multiple trauma patients with severe head injury. *J Trauma* 1994;37:205-208.
13. Jacobs DG, Piotrowski JJ, Hoppesteadt DA, et al. Hemodynamic and fibrinolytic consequences of intermittent pneumatic compression: preliminary results. *J Trauma.* 1996;40:710-716.
14. Rogers FB, Shakford SR, Ricci MA, et al. Routine prophylactic vena cava filter insertion in severely injured trauma patients decreases incidence of pulmonary embolism. *J Am Coll Surg.* 1995;180:641-647.
15. Wilson JT, Rogers FB, Wald SL, et al. Prophylactic vena cava filter insertion in patients with traumatic spinal cord injury: preliminary results. *Neurosurgery.* 1994;35:234-239.



SINDROM MASNE EMBOLIJE KOD POLITRAUMATIZOVANIH PACIJENATA

Jovana Obradović, Milić Veljović, Žaklina Spasić

Vojnomedicinska akademija Beograd - Klinika za anesteziologiju i intenzivnu terapiju

SAŽETAK

Sindrom masne embolije karakterisan je trijadom simptoma, a to su: res piratorna insuficijencija, neurološka disfunkcije i prisustvo petehija na koži i sluznici u gornjim partijama tela.

Najčešće je posledica traume, pre svega preloma dugih kostiju i preloma kostiju karlice, ali može da se javi, mnogo ređe, i netraumatska masna embolija.

Ne postoje jasno definisani kriterijumi za dijagnozu, ona se zasniva na nizu nespecifičnih i nesenzitivnih testova, pa je teško odrediti i tačnu incidencu.

Ipak, sindrom masne embolije je značajan uzrok morbiditeta i mortaliteta što zahteva dalji istraživanja u smislu usavršavanja terapijskih i profilaktičkih mera.

Znamo da rana fiksacija značajno umanjuje mogućnost nastanka masne embolije, ali postoji nedoumica oko tehnika fiksacije. Isto tako, poznato je da kortikosteroidi imaju uticaj na prevenciju nastanka embolije kod visokorizičnih pacijenata, ali još ne postoji definitivna potvrda o njihovoj efikasnosti. Na žalost, ne postoji specifična terapija, već se terapijske mere zasnivaju na nizu suportativnih mera.

UVOD

Sindrom masne embolije je značajan uzročnik morbiditeta i mortaliteta kod politraumatizovanih pacijenata¹. Masna embolija predstavlja okluziju malih krvnih sudova masnim kapima koji najčešće potiču iz povredene butne kosti ili različitih kostiju. Vrlo često ne izazivaju značajnije poremećaje u zahvaćenom organu. Međutim, u slučaju masivne okluzije bivaju zahvaćeni svi organi u organizmu i dolazi do razvoja niza simptoma koje zajedničkim imenom nazivamo Sindromom masne embolije. Kompromitovani organi su oni isti koji su zahvaćeni i masnom embolijom, pre svega pluća i mozak, što znači da u kliničkoj slici dominiraju simptomi respiratorne insuficijencije i oštećenja moždanog parenhima.

Sredinom 19. veka, Zenker³ prvi opisuje ovaj sindrom na autopsiji kod torakoabdominalne povrede radnika na železnici, desetak godina kasnije, von Bergman⁴ klinički dijagnostikuje sindrom masne embolije po prvi put kod pacijenta sa frakturom femura, što je nakon toga i potvrdio na obdukciji. Daljim proučavanjem ovog fenomena, početkom dvadesetog veka, Lehman i Moore su definisali patofiziološki mehanizam nastanka ovog sindroma biohemijskom teorijom.

Tačna učestalost sindroma masne embolije je nepoznata kako zbog submanifestne kliničke slike, tako i zbog pratećih oboljenja i povreda, i nedostatka visokospecifičnih i senzitivnih testova koji bi potvrdili dijagnozu ovog sindroma. Smatra se da se sindrom masne embolije razvija kod skoro svih pacijenata sa frakturama dugih kostiju i/ili tokom ortopedskih procedura i ona je asimptomatska.

Sindrom masne embolije se razvija kod malog broja pacijenata i rezultuje disfunkcijom organa i mortalitetom u 10-20% (prema novim istraživanjima 11% u specijalizovanim zdravstvenim ustanovama).

Etiologija

Najčešći uzroci sindroma masne embolije su traumatskog porekla, pre svega prelom butne kosti, prelom karlice, ortopedske procedure (ugradnja veštačkih proteza kuka, kolena)^{5,6,7}, liposukcija⁷.

Međutim, ovaj sindrom se može dijagnosticovati i kod akutnog pankreatitisa, šećerne bolesti, opekotina, kardiopulmonalnih gubitaka, bolesti srpastih ćelija itd.



Veoma retko može biti posledica egzogenog unosa lipidnih emulzija kao što su parenteralna ishrana, infuzija propofola i limfografijom.

Predisponirajući faktori

Sindrom masne embolije se najčešće javlja kod mladih muškaraca, takođe je veća učestalost pojave kod zatvorenih preloma u odnosu na otvorene, kod multiplih fraktura i odložene imobilizacije fraktura.

Patofiziologija

Oslobođene masne kapljice u cirkulaciji do ciljnih organa mogu dospeti na različite načine: kroz anatomske arteriovenske šantove, samom deformacijom kapi, koje formiraju izduženu formu koja može da prođe kroz plućne kapilare ili pak kroz "Foramen Ovale", kao posledica povećanog intrapulmonalnog pritiska koji nastaje u toku masivne masne embolije, što je slučaj u 25 - 30% pacijenata.

I pored toga što je sindrom masne embolije jako složen fenomen, njegov nastanak možemo tumačiti kroz dve teorije koje se međusobno nadopunjuju. Prva je mehanička teorija, i ona objašnjava razvoj sindroma masne embolije kao posledicu višestruke mehaničke opstrukcije krvnih sudova slobodnim masnim kapljicama, koje ne mogu da prođu kroz male kapilare, izazivaju lokalnu ishemiju i oštećenje tkiva. Za razliku od ostalih embolijskih događaja, embolija masnim kapljicama je privremena i prolazna zbog fizičkih karakteristika masnih kapljica^{8,9}.

Druga je biohemijska teorija koja objašnjava toksični uticaj slobodnih masnih kiselina na pneumocite i kapilarni endotelijum u plućima, uzrokujući intersticijalno krvarenje, edem i hemijski pneumonitis i razvoj kliničke slike 24 -72 h od traume. Naime, hormonske promene uzrokovane traumom i/ili sepsom indukuju sistemsko oslobađanje slobodnih masnih kapljica i hilomikrona. Hidrolizom masnih kapljica pod dejstvom fosfolipaze A2 oslobađaju se slobodne masne kiseline koje po kreću inflamatornu kaskadu, oslobađajući dalje medijatore zapaljenjske reakcije, slobodne radikale, proinflamatorne citokine koji dalje dovode do oštećenja tkiva.

Slobodne masne kiseline imaju i direktno toksično dejstvo na pneumocite i endotelne ćelije plućnih kapilara. Takođe, imaju svojstvo i da aktiviraju

tkivni tromboplastin i tako pokrenu koagulacionu kaskadu, izazivajući i poremećaj koagulacije do eventualnog nastanka DIK-a.

Medijatori akutne faze menjaju fizičko hemijska svojstva lipida, normalno prisutnih u cirkulaciji, utučujući na njihovu solubilnost i dovodeći do aglutinacije hilomikrona u veće partikule, što dodatno izaziva mikrovaskularnu opstrukciju, razvoj ishemije i dodatnog oštećenja tkiva.

Većina autora danas smatra da je patofiziološki mehanizam nastanka sindroma masne embolije kombinacija mehaničke i biohemijske teorije.

Klinička slika

Kliničkom slikom dominiraju simptomi od strane respiratornog trakta, centralnog nervnog sistema i kože.

Rana manifestacija potiče od respiratornog sistema (75% slučajeva), u vidu dispneje, tahipneje, cijanoze i hipoksije. Javlja se 12 -72 h od povrede i posledica je poremećenih ventilaciono perfuzionih odnosa.

Hipoksemija može biti dijagnostikovana pre pojave respiratornih simptoma. U 10 % slučajeva klinička slika može se pogoršati do slike akutne plućne insuficijencije (ARDS).

Neurološki simptomi se javljaju kod 85% pacijenata, obično su nespecifični i najčešće se ogledaju u izmeni mentalnog statusa, izuzetno su retki neurološki ispadi. Inicijalno se manifestuju agitiranišću, konfuzijom, somnolencijom koja može da progredira do razvoja stupora i kome.

Dermatološke znake karakterišu crvenkasto braon nepalpabilne petehije pretežno na gornjoj polovini tela (fizička osobina masnih kapljica da plutaju), naročito u predelu aksila, vrata, gornje polovine grudnog koša i ruku. Javljaju se 24-36sati, traju od 6h-7 dana, patognomonična su za sindroma masne embolije, ali se javljaju u samo 20 -50% pacijenata.

U kliničkoj slici možemo primetiti i Purtscher's-ovu retinopatiju, koja predstavlja retinalnu hemoragiju sa masnim kapljicama u arterijskim krvnim sudovima koja se može videti funduskopskim pregledom očnog dna.

Od nespecifičnih znakova kliničkoj slici se pridružuju tahikardija i hiperpireksija.

Klinički tok može biti: akutni fulminantni, pod slikom akutnog popužavanja srca, plućne insuficijencije i najčešće završava letalno, subakutni, sa asimptomatskim periodom od 12 -48



h i spontanom evaluacijom simptoma, u 10% je praćen teškim komplikacijama, a koji uz pravovremenu terapiju završava izlečenjem bez sekvela i konačno subklinički, u vidu tranzitorne kratkotrajne hipoksemije, uz diskretnu promenu mentalnog statusa koji se koriguje primenom kiseonične terapije.

Dijagnoza

Dijagnoza se pre svega zasniva na kliničkoj slici^{10,11}. Postoje različiti kriterijumi, koji pomažu u dijagnozi, ali ne postoji univerzalni. Najčešće se koristi Guard-ovi kriterijumi¹², koji podrazumevaju podelu simptoma na minor i major kriterijume. U major kriterijume ubrajamo: aksilarna, subkonjuktivalne petehije, hipoksemija sa $\text{PaO}_2 < 60 \text{ mmHg}$, depresija centralnog nervnog sistema i plućni edem. U minor kriterijume ubrajamo: tahikardiju $> 120/\text{min}$, hipertenzija, masni embolusi u retini, masne kapljice u urinu, trombocitopenija, pad hematokrita, masne kapljice u sputumu.

Za dijagnozu je potrebno da postoji najmanje jedan major i 4 minor simptoma. Takođe postoje i Shonfeld-ovi kriterijumi⁹ koji imaju kvantitativno značenje, pa tako petehije nose 5, RTG promene -4, hipoksemija -3, hipertenzija $> 38^\circ \text{C}$ -1, tahipneja $> 30/\text{min}$ -1, konfuzija -1. Kumulativni skor > 5 je odgovarajući za dijagnozu.

Laboratorijske analize su uglavnom nespecifične i ne postoji patognomotičan test¹³. Masne kapljice u urinu su česte posle traume, tako da nisu specifičan ili senzitiv nalaz koji ukazuje na opasnost nastanka ili na sam sindrom masne embolije.

Trombocitopenija, anemija i hipofibrinogemija su indikativne za sindrom masne embolije.

U toku akutne faze sindroma masne embolije može biti pozitivan D-dimer test, trombocitopenija i drugi poramećaji koagulacionog statusa.

Hipokalcijemija može biti posledica saponifikacije.

Arterijske gasne analize, zavise od stanja pacijenta.

Citološka ispitivanja urina, sputuma, krvi i cerebrospinalne tečnosti ukazuju na prisustvo masnih kapljica.

Bronhoalveolarna lavaža, sa nalazom masnih mrlja u alveolarnim makrofagima, ukazuje

na postojanje, ili na opasnost od razvoja sindroma masne embolije, međutim invazivna priroda same procedure ograničava njenu upotrebu.

RTG grudnog koša pokazuje difuzna mrljasta zasenčenja koja se opisuju kao "snežna mećava", a kasnije slika može biti prisutna i kod infekcije ili plućnog edema.

CT glave može biti normalan ili sa znacima difuznog petehijalnog krvarenja u beloj moždanoj masi. CT grudnog koša može da pokaže parenhimalne promene u plućima.

MRI glave prikazuje kofluentne difuzne promene u sivoj moždanoj masi, čiji broj korelira sa težinom kliničke slike, i ima veliki dijagnostički značaj⁸.

Transkranijalni dopler, u toku operativnog zahvata može da dijagnostikuje moždane mikroembolije.

Terapija

Ne postoji specifična medikamentozna terapija, već samo suportativna i simptomatska, koja podrazumeva održavanje vitalnih funkcija, održavanje adekvatne oksigenacije i ventilacije, odnosno korekcija hipoksemije i hiperkapnije (neinvazivna i invazivna oksigenoterapija), postizanje i održavanje hemodinamske stabilnosti (nadoknada volumana i krvnih derivata, korekcija acidobazne ravnoteže).

U slučaju razvoja kliničke slike ARDS-a lečenje podrazumeva odgovarajuće protokole. Neki autori preporučuju upotrebu albumina¹⁴, kako zbog održavanja volumena, a više zbog sposobnosti da vežu slobodne masne kiseline, i na taj način spreče dalja oštećenja tkiva. Heparin stimuliše lipaze koje smanjuju količinu masnih kapljica u serumu, ali postoji visoki rizik od krvarenja zbog traume.

Adekvatna analgezija je veoma značajna jer ograničava simpatomimetski odgovor na povredu. Primena dekstrana, hipertone glikoze i aspirina nije dala zadovoljavajuće rezultate. Drugi aspekt podrazumeva profilaktičke mere, koje možemo podeliti u dve grupe - hiruške i medikamentozne mere prevencije nastanka i razvoja sindroma masne embolije.

Hiruške mere podrazumevaju ranu fiksaciju preloma¹⁵ i hiruške tehnike koje manje utiču na porast intramedularnog pritiska u toku rada.



Što se medikamentozne prevencije tiče, još uvek nije potvrđena korist kod primene kortikosteroida⁵.

ZAKLJUČAK

Sindrom masne embolije je značajan uzročnik morbiditeta i mortaliteta kod politraumatizovanih pacijenata, ali i kod pacijenata u elektivnim ortopedskim procedurama. I pored određenih laboratorijskih i radioloških analiza, klinička slika je dominantna u dijagnozi ovog sindroma. Pravovremena i odgovarajuća terapija dovodi do potpunog oporavka.

Ipak i dalje stoji nepoznanica zašto samo mali procenat pacijenata sa masnom embolijom razvija kliničku sliku sindroma masne embolije? Odgovor zahteva dalja istraživanja i ispitivanja patofiziologije ovog poremećaja.

LITERATURA

1. Masood Jawaid, Muhammad Naseem, An update on Fat Embolism Syndrome (FES). Pakistan journal of medical science, March 2005.
2. Behrman SW, Fabia TC, Kudsk KA, Taylor JC (1990) Improved outcome with femur fractures: early vs. delay fixation. J Trauma 30: 792-798
3. Zenker FA. Beiträge zur normalen und pathologischen Anatomie der Lungen, Dresden (DE): J. Braunundsdorf; 1862. p. 31.
4. Von Bergman E. Ein fall todlicher fettenbolie. Berl Klin. Wochenscher 1873;10:385
5. Sconfeld SA, Ploysongsang Y, Dilisio R, Crissman JD, Miller E, Hammerschmidt DE et al. Fat embolism prophylaxis with corticosteroids. A prospective study in high risk patients. Ann Intern Med, 1983;99:438-43.
6. Aandeep Gupta, Charles S. Reilly. Fat embolism syndrome: a case report; J Postgrad Med Instl, 2007;21:311-3
7. Hruza GJ. Fat embolism from Autologous Fat Injection, Journal Watch Dermatology, 1998.
8. Marshall GB, Heale VR, Heux L, et al. Magnetic resonance diffusion weighted imaging in cerebral fat embolism, Can J Neurol Sci, 2004;31:417-21
9. Altaf Hussain: A Fatal Fat Embolism. The internet Journal of Anesthesiology, 2004. Volume 8 Number 2.
10. Georgopoulos & Bouros. Fat Embolism Syndrome: Clinical Examination is still the preferable Diagnostic Method. Chest 2003;123(4):982-3.
11. Newman P.H. The clinical diagnosis of fat embolism, Nursing, Jun 2004.
12. Guard AR, Wilson RE. The fat embolism syndrome. J Bone Joint Surg, 1974;56:408-16
13. Kirsten Odegaard. Department of Anesthesiology New York University Medical centre, Fat embolism: Diagnosis and Treatment. GASNet Anaesthesiology, 9/28/2000
14. Glossing H., Pellegrini VD Jr. Fat embolism syndrome: A review of pathology and physiological basis of treatment. Clin Orthop Relat Res, 1982;165:68-82.
15. Takeshi K, Toshiaki E, Mitsuru T, Hinorori I, Akimoto M. Rapid improvement of respiratory symptoms associated with fat embolism by high dose methylprednisolone: a case report. Anesth. 2003;17(3):186-191.



