

СРПСКИ АРХИВ

ЧАСОПИС СРПСКОГ ЛЕКАРСКОГ ДРУШТВА ОСНОВАН 1872. ГОДИНЕ

ЗА ЦЕЛОКУПНО ЛЕКАРСТВО

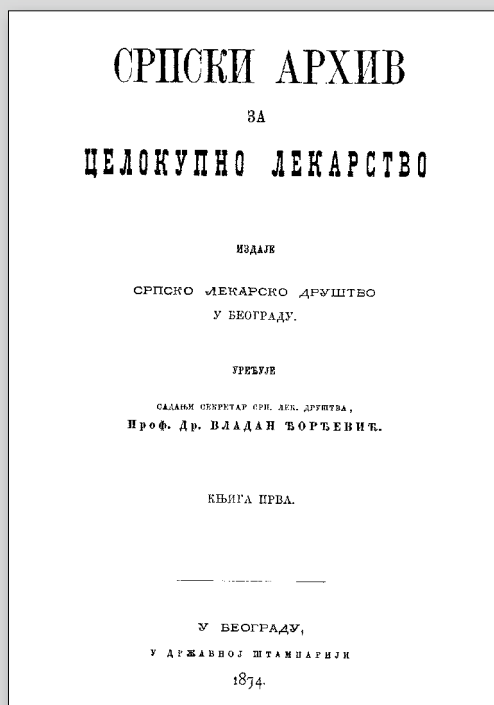


ГОДИШТЕ 142.
ЈАНУАР–ФЕБРУАР 2014.
СВЕСКА 1-2

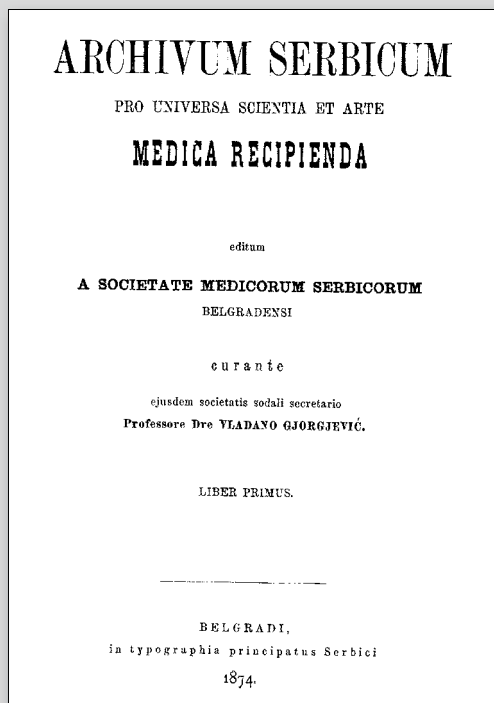
VOLUME 142
JANUARY–FEBRUARY 2014
NUMBER 1-2

SERBIAN ARCHIVES OF MEDICINE

OFFICIAL JOURNAL OF THE SERBIAN MEDICAL SOCIETY FOUNDED IN 1872



Факсимил текста на српском језику на првој страници прве свеске часописа, објављене 1874. године (две године после оснивања часописа).



Facimile of the text in Latin language of the title page of the first Journal edition published in 1874 (two years after the Journal was founded)

Српски архив за целокупно лекарство је часопис Српског лекарског друштва основан 1872. године, у којем се објављују радови чланова Српског лекарског друштва, претплатника часописа и чланова других друштава медицинских и сродних струка. Часопис објављује: оригиналне радове, саопштења, приказе болесника, прегледе литературе, актуелне теме, радове из историје медицине, радове за праксу, радове који се односе на језик медицине, радове из медицинске етике (клиничка етика, етика публиковања, регулаторни стандарди у медицини), извештаје с конгреса и стручних састанака, стручне вести, приказе књига и дописе за рубрике *Сећање*, *In memoriam* и *Promemoria*, као и коментаре и писма Уредништву у вези с објављеним радовима.

Сви рукописи који се разматрају за штампање у „Српском архиву за целокупно лекарство“ не могу да се поднесу или да буду разматрани за публикавање на другим местима. Радови не смеју да буду претходно штампани на другим местима (делимично или у потпуности).

Приспели рукопис Уређивачки одбор шаље рецензентима ради стручне процене. Уколико рецензенти предложе измене или допуне, копија рецензије се доставља аутору с молбом да унесе тражене измене у текст рада или да аргументовано образложи своје неслагање с примедбама рецензента. Коначну одлуку о прихватању рада за штампу доноси главни и одговорни уредник.

За објављене радове се не исплаћује хонорар, а ауторска права се преносе на издавача. Рукописи и прилози се не враћају. За репродукцију или поновно објављивање неког сегмента рада публикованог у „Српском архиву“ неопходна је сагласност издавача.

Радови се штампају на српском језику, ћирилицом, са кратким садржајем на српском и енглеском језику, односно на енглеском језику са кратким садржајем на енглеском и српском језику.

Аутори прихватају потпуну одговорност за тачност целокупног садржаја рукописа. Материјал публикације представља мишљење аутора и није нужно одраз мишљења Српског лекарског друштва. С обзиром на брз напредак медицинске научне области, корисници треба да независно процењују информацију пре него што је користе или се на њу ослањају. Српско лекарско друштво, уредник или Уређивачки одбор „Српског архива за целокупно лекарство“ не прихватају било какву одговорност за наводе у радовима. Рекламни материјал треба да буде у складу с етичким (медицинским) и правним стандардима. Рекламни материјал укључен у овај часопис не гарантује квалитет или вредност оглашеног производа, односно тврдње произвођача.

Поднесени рукопис подразумева да је његово публиковање одобрио одговорни ауторитет установе у којој је истраживање обављено. Издавач се неће сматрати правно одговорним у случају подношења било каквог захтева за компензацију. Треба да се наведу сви извори финансирања рада.

Serbian Archives of Medicine is the Journal of the Serbian Medical Society, founded in 1872, which publishes articles by the members of the Serbian Medical Society, subscribers, as well as members of other associations of medical and related fields. The Journal publishes: original articles, communications, case reports, review articles, current topics, articles of history of medicine, articles for practitioners, articles related to the language of medicine, articles on medical ethics (clinical ethics, publication ethics, regulatory standards in medicine), congress and scientific meeting reports, professional news, book reviews, texts for “In memory of...”, i.e. In memoriam and Promemoria columns, as well as comments and letters to the Editorial Board in relation to the published papers.

All manuscripts under consideration in the Serbian Archives of Medicine may not be offered or be under consideration for publication elsewhere. Articles must not have been published elsewhere (in part or in full).

The submitted manuscripts are forwarded by the Editorial Board to reviewers for editing and evaluation. If the reviewers find that the manuscript needs to be modified or amended, the copy of the report is sent to the author(s), requiring of them to make necessary modifications or amendments of the text or to provide argumentative explanation of their disagreement with the suggested reviewer's remarks. The final decision on acceptance of the article for publication is made by the Editor-in-Chief.

The authors shall not be remunerated for the published articles, and they are required to assign copyright of their papers to the publisher. Manuscripts and enclosures shall not be returned to the authors. Reproduction or repeated publication of any section of the manuscript already published in the “Serbian Archives” requires the publisher's approval.

The articles are printed in the Serbian language, Cyrillic alphabet, with an abstract in Serbian and English, or in the English language with an abstract both in English and Serbian.

Authors accept full responsibility for the accuracy of all content within the manuscript. Material in the publication represents the opinions of the authors and does not necessarily reflect opinions of the Serbian Medical Society. Because of rapid advances in the medical sciences, users should independently evaluate information before using or relying on it. Serbian Medical Society, the Editor or Editorial Board of the Serbian Archives of Medicine does not accept any responsibility for the statements in the articles. Advertising material is expected to conform to ethical (medical) and legal standards. Inclusion of advertising material in this publication does not guarantee the quality or value of such product or claims made by its manufacturer.

Submission of the manuscript implies that its publication has been approved by the responsible authorities at the institution where the work has been carried out. The publisher will not be held legally responsible should be any claims for compensation. Details of all funding sources for the work should be given.



ИЗДАВАЧ

Српско лекарско друштво
Џорџа Вашингтона 19, 11000 Београд, Србија
Председник: академик Радоје Чоловић
Председник Издавачког савета:
прим. др Мирјана Лапчевић
Интернет страна: <http://www.sld.org.rs>

АДРЕСА УРЕДНИШТВА

Српско лекарско друштво
Џорџа Вашингтона 19, 11000 Београд, Србија
Телефон: +381 (0)11 3245 149
Е-пошта: srparhiv@bvcom.net
Интернет страна: www.srp-arh.rs

ПРЕТПЛАТА И ЕКСПЕДИЦИЈА

Српско лекарско друштво
Џорџа Вашингтона 19, 11000 Београд, Србија
Телефон: +381 (0)11 3346 963
Текући рачуни: 205-8041-21 и
355-1009094-22

Чланци су у целости доступни на интернет
страници: www.srp-arh.rs

Цена претплате за календарску годину је 3.000
динара за појединце, 6.000 динара за установе
и 100 евра за читаоце ван Србије. Цена поједи-
начног примерка је 600 динара, а свеске из прет-
ходних година 300 динара.

**Штампање „Српског архива за целокупно
лекарство“ током 2014. године помогли
су Министарство просвете, науке и
технолошког развоја и Министарство
здравља Републике Србије.**

Copyright © 2014 Српско лекарско друштво.
Сва права заштићена.

Није дозвољено да се ниједан део ове публикације користи,
репродукује, чува у датотекама у систему коришћења или
преноси у било којем облику или било каквим средствима
(електронским, механичким, фотокопирањем, преснима-
вањем или било којим другим начином) без претходно до-
бијене писане сагласности издавача. Фотокопије су до-
звољене за личну или институционалну употребу. Више-
струко копирање садржаја публикације је увек противза-
конито.

ISSN 0370-8179; ISSN Suppl 0354-2793

Штампано у Србији
www.sld.org.rs
www.srp-arh.rs

Часопис „Српски архив за целокупно лекарство“ је индексиран у базама:
Science Citation Index Expanded, Journal Citation Reports/Science Edition,
Index Medicus (Medline, PubMed), Web of Science, Scopus, EBSCO, Directory of
Open Access Journals, DOI Serbia.

ГЛАВНИ И ОДГОВОРНИ УРЕДНИК

Проф. др Павле Миленковић

ЗАМЕНИК ГЛАВНОГ И ОДГОВОРНОГ УРЕДНИКА

Проф. др Зоран Радовановић

ПОМОЋНИЦИ ГЛАВНОГ И ОДГОВОРНОГ УРЕДНИКА

Академик Небојша Лалић
Академик Миодраг Чолић
Проф. др Зоран Вукашиновић

ЧЛАНОВИ УРЕЂИВАЧКОГ ОДБОРА

Проф. др Бела Балинт
Проф. др Бранко Белеслин
Академик Владимир Бумбаширевић
Проф. др Марко Бумбаширевић
Др Љиљана Вучковић-Декић, научни саветник
Проф. др Љиљана Гојковић-Букарица
Проф. др Слободан Голубовић
Проф. др Мирјана Готић
Проф. др Љубица Ђукановић
Др сц. мед. Славица Жижић-Борјановић
Проф. др Татјана Илле
Проф. др Љиљана Јаносевић
Проф. др Ђорђе Јевтовић
Академик Владимир Костић
Проф. др Радојка Коцијанчић
Проф. др Јелена Милашин
Проф. др Марија Мостарица-Стојковић
Проф. др Недељко Радловић
Проф. др Небојша Радуновић, дописни члан САНУ
Проф. др Драгослав Стаменковић
Академик Владисав Стефановић
Проф. др Миодраг Стојковић
Проф. др Едита Стокић
Проф. др Милица Чоловић
Академик Радоје Чоловић

МЕЂУНАРОДНИ УРЕЂИВАЧКИ ОДБОР

Prof. dr Achilles Anagnostopoulos (Грчка)
Prof. dr Athanassios Athanassiou (Грчка)
Prof. dr Henry Dushan Edward Atkinson (Велика Британија)
Prof. dr Mila Goldner-Vukov (Аустралија)
Prof. dr Nagy Habib (Велика Британија)
Prof. dr Rajko Igić (САД)
Prof. dr Bernhard Maisch (Немачка)
Prof. dr Gordana Matijašević-Cavrić (Боцвана)
Prof. dr Veselin Mitrović (Немачка),
Prof. dr Andreas Nidecker (Швајцарска)
Prof. dr Ljupčo T. Nikolovski (Македонија)
Prof. dr Dan V. Poenaru (Румунија)
Prof. dr Tatjana Stanković-Taylor (Велика Британија)
Prof. dr Vladan Starčević (Аустралија)
Prof. dr Igor Švab (Словенија)
Prof. dr A. Malcolm R. Taylor (Велика Британија)
Prof. dr Gaetano Thiene (Италија)
Prof. dr Peter H. Wiernik (САД)

Лектор за српски језик: Исидора Илић
Лектор за енглески језик: Невена Симић
Секретар Уредништва: Александар Божић

Прелом текста и припрема за штампу: Саша Бешевић
Штампа: ЈП „Службени гласник“, Београд

Тираж: 700 примерака



SERBIAN ARCHIVES OF MEDICINE

VOLUME 142 JANUARY–FEBRUARY 2014 NUMBER 1-2

The journal "Srpski arhiv za celokupno lekarstvo" (Serbian Archives of Medicine) is indexed in: Science Citation Index Expanded, Journal Citation Reports/Science Edition, Index Medicus (Medline, PubMed), Web of Science, Scopus, EBSCO, Directory of Open Access Journals, DOI Serbia.

EDITOR-IN-CHIEF

Prof. Pavle Milenković, MD, PhD

DEPUTY EDITOR-IN-CHIEF

Prof. Zoran Radovanović, MD, PhD

ASSOCIATE EDITORS

Prof. Nebojša Lalić, MD, PhD, MSASA

Prof. Miodrag Čolić, MD, PhD, MSASA

Prof. Zoran Vukašinović, MD, PhD

MEMBERS OF THE EDITORIAL BOARD

Prof. Bela Balint, MD, PhD

Prof. Branko Beleslin, MD, PhD

Prof. Vladimir Bumbaširević, MD, PhD, MSASA

Prof. Marko Bumbaširević, MD, PhD

Prof. Milica Čolović, MD, PhD

Prof. Radoje Čolović, MD, PhD, MSASA

Prof. Ljubica Djukanović, MD, PhD

Prof. Ljiljana Gojković-Bukarica, MD, PhD

Prof. Slobodan Golubović, MD, PhD

Prof. Mirjana Gotić, MD, PhD

Prof. Tatjana Ille, MD, PhD

Prof. Ljiljana Janošević, MD, PhD

Prof. Djordje Jevtović, MD, PhD

Prof. Radojka Kocijančić, MD, PhD

Prof. Vladimir Kostić, MD, PhD, MSASA

Prof. Jelena Milašin, PhD

Prof. Marija Mostarica-Stojković, MD, PhD

Prof. Nedeljko Radlović, MD, PhD

Prof. Nebojša Radunović, MD, PhD, MSASA

Prof. Dragoslav Stamenković, DDS, PhD

Prof. Vladislav Stefanović, MD, PhD, MSASA

Prof. Miodrag Stojković, DVM, PhD

Prof. Edita Stokić, MD, PhD

Ljiljana Vučković-Dekić, MD, PhD, research professor

Slavica Žižić-Borjanović, MD, PhD

INTERNATIONAL EDITORIAL BOARD

Prof. Achilles Anagnostopoulos, MD, PhD (Greece)

Prof. Athanassios Athanassiou, MD, PhD (Greece)

Prof. Henry Dushan Edward Atkinson, MD, PhD (UK)

Prof. Mila Goldner-Vukov, MD, PhD (Australia)

Prof. Nagy Habib, MD, PhD (UK)

Prof. Rajko Igić, MD, PhD (USA)

Prof. Bernhard Maisch, MD, PhD (Germany)

Prof. Gordana Matijašević-Cavrić, MD, PhD (Botswana)

Prof. Veselin Mitrović, MD, PhD (Germany)

Prof. Andreas Nidecker, MD, PhD (Switzerland)

Prof. Ljupčo T. Nikolovski, MD, PhD (Macedonia)

Prof. Dan V. Poenaru, MD, PhD (Romania)

Prof. Tatjana Stanković-Taylor, MD, PhD (UK)

Prof. Vladan Starčević, MD, PhD (Australia)

Prof. Igor Švab, MD, PhD (Slovenia)

Prof. A. Malcolm R. Taylor, MD, PhD (UK)

Prof. Gaetano Thiene, MD, PhD (Italy)

Prof. Peter H. Wiernik, MD, PhD (USA)

Serbian language lector: Isidora Ilić

English language lector: Nevena Simić

Editorial Office Secretary: Aleksandar Božić

Layout & Prepress: Saša Bešević

Printed by: JP "Službeni glasnik", Beograd

Circulation: 700 copies

Srp Arh Celok Lek
ISSN 0370-8179
UDC 61(497.1)=861
COBISS. SR-ID 3378434

Serbian Archives of Medicine is an official publication of the Serbian Medical Society, and is published six times per year.

PUBLISHER

Serbian Medical Society

Džordža Vašingtona 19, 11000 Belgrade, Serbia

President: Prof. Radoje Čolović, MD, PhD, MSASA

Chair of the Publishing Council:

Mirjana Lapčević, MD

Web site: www.sld.org.rs

EDITORIAL OFFICE

Serbian Medical Society

Džordža Vašingtona 19, 11000 Belgrade, Serbia

Phone: +381 (0)11 3245 149

E-mail: srparhiv@bvcom.net

Web site: www.srp-arh.rs

SUBSCRIPTION AND DISTRIBUTION

Serbian Medical Society

Džordža Vašingtona 19, 11000 Belgrade, Serbia

Phone: +381 (0)11 3346 963

Bank accounts: 205-8041-21 and
355-1009094-22

Full-text articles are available at web site:
www.srp-arh.rs

Calendar year subscriptions prices are: 3,000 dinars for individuals, 6,000 dinars for institutions, and 100 Euros for readers outside Serbia. The price of a current issue is 600 dinars, and of a back issue 300 dinars.

The publishing of the Serbian Archives of Medicine during 2014 is supported by the Ministry of Education, Science and Technological Development, and the Ministry of Health of the Republic of Serbia.

Copyright © 2014 by the Serbian Medical Society.
All rights reserved.

No part of this publication may be used, reproduced, stored in a retrieval system or transmitted in any form or by any means (electronic, mechanical, photocopying, recording, or otherwise) without the prior written permission of the journal publisher. Photocopies may be made for personal or in-house use. Multiple copying of the contents of the publication is always illegal.

ISSN 0370-8179; ISSN Suppl 0354-2793

Printed in Serbia
www.sld.org.rs
www.srp-arh.rs

САДРЖАЈ • CONTENTS

ОРИГИНАЛНИ РАДОВИ • ORIGINAL ARTICLES

EYE INJURIES CAUSED BY SHOTGUN AND AIR-RIFLES TREATED AT THE UNIVERSITY EYE CLINIC IN BELGRADE 2000–2009	6-9
Miloš B. Jovanović ПОВРЕДЕ ОЧИЈУ ИЗАЗВАНЕ ЛОВАЧКОМ И ВАЗДУШНОМ ПУШКОМ КОД ОСОБА ЛЕЧЕНИХ НА УНИВЕРЗИТЕТСКОЈ ОЧНОЈ КЛИНИЦИ У БЕОГРАДУ 2000–2009. ГОДИНЕ Милош Б. Јовановић	
КЛИНИЧКИ И МИКРОБИОЛОШКИ ЕФЕКТИ КАУЗАЛНЕ ТЕРАПИЈЕ ПАРОДОНТОПАТИЈЕ	10-16
Тања Предин, Миланко Ђурић, Јелена Мирнић, Ивана Гушић, Нађа Николић, Дубравка Марковић, Александра Анђелковић, Јелена Милашин CLINICAL AND MICROBIOLOGICAL EFFECTS OF THE INITIAL PERIODONTAL THERAPY Tanja Predin, Milanko Djurić, Jelena Mirnić, Ivana Gušić, Nadja Nikolić, Dubravka Marković, Aleksandra Andjelković, Jelena Milišić	
BALLOON VALVULOPLASTY AS A TREATMENT OF CONGENITAL AORTIC STENOSIS IN CHILDREN AND ADOLESCENTS.....	17-22
Vojislav Parezanović, Milan Đukić, Ingo Daehnert, Ana Gligić, Igor Stefanović, Ida Jovanović, Tamara Ilić, Slobodan Ilić, Irena Vulićević, Jasna Kalan БАЛОН-ВАЛВУЛОПЛАСТИКА У ЛЕЧЕЊУ КОНГЕНИТАЛНЕ АОРТНЕ СТЕНОЗЕ КОД ДЕЦЕ И АДОЛЕСЦЕНАТА Војислав Парезановић, Милан Ђукић, Инго Денерт, Ана Глигић, Игор Стефановић, Ида Јовановић, Тамара Илисић, Слободан Илић, Ирена Вулићевић, Јасна Калањ	
CHANGING TRENDS IN INCIDENCE OF LUNG CANCER BY HISTOLOGICAL TYPE IN MONTENEGRO	23-28
Milić Medenica, Miraš Medenica, Olivera Bojović, Ivan Soldatović, Ivana Durutović ПАТОХИСТОЛОШКИ ТРЕНДОВИ ПРОМЕНЕ ИНЦИДЕНЦИЈА КАРЦИНОМА ПЛУЋА У ЦРНОЈ ГОРИ Милић Меденица, Мираш Меденица, Оливера Бојовић, Иван Солдатовић, Ивана Дурутовић	
ПОРЕЂЕЊЕ БИОХИМУРАЛНИХ И МОРФОЛОШКИХ ПАРАМЕТАРА КОД АКУТНОГ ПАНКРЕАТИТИСА	29-33
Tomislav Tasić, Saša Grgov, Aleksandar Nagorni, Danijela Benedeto-Stojanov COMPARISON OF BIOCHEMICAL AND MORPHOLOGICAL PARAMETERS IN ACUTE PANCREATITIS Tomislav Tasić, Saša Grgov, Aleksandar Nagorni, Danijela Benedeto-Stojanov	
EVALUATION OF REVERSAL OSTEOFIXATION USING K-WIRES IN DIGITAL REPLANTATION	34-39
Čedomir Vučetić, Zoran Vukašinović, Radovan Manojlović, Goran Tulić, Čedo Vučković, Duško Spasovski, Aleksandar Todorović, Marko Bumbaširević ПРОЦЕНА РЕВЕРЗНЕ ОСТЕОФИКСАЦИЈЕ ПРИМЕНОМ К-ИГАЛА У РЕПЛАНТАЦИЈИ ПРСТА Чедомир Вучетић, Зоран Вукашиновић, Радован Манојловић, Горан Тулић, Чедо Вучковић, Горан Тулић, Душко Спасовски, Александар Тодоровић	
INFLUENCE OF DIFFERENT METHODS OF INTERNAL BONE FIXATION ON CHARACTERISTICS OF BONE CALLUS IN EXPERIMENTAL ANIMALS	40-47
Djordje Gajdobranski, Milorad Mitković, Nada Vučković, Miroslav Milankov, Slobodan Jovanović, Miodrag Manić, Milan Mitković УТИЦАЈ РАЗЛИЧИТИХ МЕТОДА УНУТРАШЊЕ ФИКСАЦИЈЕ КОСТИЈУ НА ОСОБЕНОСТИ КОШТАНОГ КАЛУСА ЕКСПЕРИМЕНТАЛНИХ ЖИВОТИЊА Ђорђе Гајдобрански, Милорад Митковић, Нада Вучковић, Мирослав Миланков, Слободан Јовановић, Миодраг Манић, Милан Митковић	
HIGHER PERCENTAGE OF IN VITRO APOPTOTIC CELLS AT TIME OF DIAGNOSIS IN PATIENTS WITH CHRONIC LYMPHOCYTIC LEUKEMIA INDICATE EARLIER TREATMENT REQUIREMENT: TEN YEARS FOLLOW UP	48-53
Tamara Kravić-Stević, Andrija Bogdanović, Vladimir Bumbaširević ВИСОК ПРОЦЕНАТ АПОПТОТИЧНИХ ЋЕЛИЈА IN VITRO У ТРЕНУТКУ ПОСТАВЉАЊА ДИЈАГНОЗЕ ХРОНИЧНЕ ЛИМФОЦИТНЕ ЛЕУКЕМИЈЕ УКАЗУЈЕ НА РАНИЈУ ПОТРЕБУ ЗА ЛЕЧЕЊЕМ ОСОБА С ОВОМ БОЛЕШЋУ: ДЕСЕТОГОДИШЊЕ ИСПИТИВАЊЕ Тамара Кравић-Стевоић, Андрија Богдановић, Владимир Бумбаширевић	
ИСПИТИВАЊЕ УЛОГЕ ХЛАМИДИЈСКИХ СТРЕС-ПРОТЕИНА У НАСТАНКУ ВАНМАТЕРИЧНЕ ТРУДНОЋЕ	54-58
Maja Vivoda, Biljana Arsić, Eliana Garalejić, Ivana Ćirković, Slobodanka Đukić EXAMINATION OF POSSIBLE ROLE OF THE CHLAMYDIAL STRESS PROTEINS IN PATHOGENESIS OF ECTOPIC PREGNANCY Маја Вивода, Биљана Арсић, Елиана Гаралејић, Ивана Ћирковић, Слободанка Ђукић	
ПРОЦЕНА ПОТРЕБНИХ РЕСУРСА ЗА РЕАЛИЗАЦИЈУ НАЦИОНАЛНОГ ПРОГРАМА РАНОГ ОТКРИВАЊА РАКА ДОЈКЕ	59-66
Nemanja Majstorović, Snežana Simić, Bojana Matejić, Mladen Ćudanov ASSESSMENT OF REQUIRED RESOURCES FOR IMPLEMENTATION OF NATIONAL BREAST CANCER SCREENING PROGRAM IN SERBIA Немања Мајсторовић, Снежана Симић, Бојана Матејић, Младен Ћуданов	

ПРИКАЗИ БОЛЕСНИКА • CASE REPORTS

SURGICAL TREATMENT OF INTRADIPLOIC EPIDERMOID CYST TREATED AS DEPRESSION.....	67-71
Nenad Živković, Marko Marković, Goran Mihajlović, Milan Jovanović ХИРУРШКО ЛЕЧЕЊЕ ИНТРАДИПЛОИЧНЕ ЕПИДЕРМОИДНЕ ЦИСТЕ ЛЕЧЕНЕ КАО ДЕПРЕСИЈА Ненад Живковић, Марко Марковић, Горан Михајловић, Милан Јовановић	
PROPHYLACTIC THYROIDECTOMY FOR ASYMPTOMATIC 3-YEAR-OLD BOY WITH POSITIVE MULTIPLE ENDOCRINE NEOPLASIA TYPE 2A MUTATION (CODON 634)	72-74
Maja D. Ješić, Milana Tančić-Gajić, Miloš M. Ješić, Vladan Živaljević, Silvija Sajić, Svetlana Vujović, Svetozar Damjanović ПРОФИЛАКТИЧКА ТИРЕОИДЕКТОМИЈА КОД АСИМПТОМАТСКОГ ТРОГОДИШЊЕГ ДЕЧАКА С ПОЗИТИВНОМ МУТАЦИЈОМ ЗА МУЛТИПЛУ ЕНДОКРИНУ НЕОПЛАЗИЈУ 2А (КОДОН 634) Маја Д. Јешић, Милина Танчић-Гајић, Милош М. Јешић, Владан Живаљевић, Силвија Сајић, Светлана Вујовић, Светозар Дамјановић	

X-LINKED HYPOPHOSPHATEMIC RICKETS: CASE REPORT	75-78
Vladimir Radlović, Željko Smoljanić, Nedeljko Radlović, Zoran Leković, Dragana Ristić, Siniša Dučić, Polina Pavićević	
X-ВЕЗАНИ ХИПОФОСФАТЕМИЈСКИ РАХИТИС – ПРИКАЗ БОЛЕСНИКА	
Владимир Радловић, Жељко Смољанић, Недељко Радловић, Зоран Лековић, Драгана Ристић, Сениша Дучић, Полина Павићевећ	
A CASE OF HUMAN MONOCYTIC EHRLICHIOSIS IN SERBIA	79-82
Bogdan Arsić, Ana Gligić, Elizabeta Ristanović, Branislav Lako, Aleksandar Potkonjak, Milan Peruničić, Momčilo Pavlović	
СЛУЧАЈ ХУМАНЕ МОНОЦИТНЕ ЕРЛИХИОЗЕ У СРБИЈИ	
Богдан Арсић, Ана Глигић, Елизабета Ристановић, Бранислав Лако, Александар Поткоњак, Милан Перуничић, Момчило Павловић	
POST-TRANSPLANT LYMPHOPROLIFERATIVE DISORDER – CASE REPORTS OF THREE CHILDREN WITH KIDNEY TRANSPLANT	83-88
Brankica Spasojević-Dimitrijeva, Amira Peco-Antić, Dušan Paripović, Divna Kruščić, Zoran Krstić, Maja Čupić, Mirjana Cvetković, Gordana Miloševski-Lomić, Mirjana Kostić	
ПОСТТРАНСПЛАНТАЦИОНА ЛИМФОПРОЛИФЕРАТИВНА БОЛЕСТ – ПРИКАЗ ТРИ ДЕТЕТА СА ПРЕСАЂЕНИМ БУБРЕГОМ	
Бранкица Спасојевић-Димитријева, Амира Пецо-Антић, Душан Париповић, Дивна Крушчић, Зоран Крстић, Маја Чупић, Мирјана Цветковић, Гордана Милошевски-Ломић, Мирјана Костић	
УРОЂЕНА ПСЕУДОАРТРОЗА ПОТКОЛЕНИЦЕ ИЗЛЕЧЕНА ВЕЋ СКОРО ЗАБОРАВЉЕНОМ МЕТОДОМ – ПРИКАЗ БОЛЕСНИКА	89-93
Зоран Вукашиновић, Душко Спасовски, Игор Шешлија, Исмет Гавранкапетановић, Елвир Баждар, Зорица Живковић	
CONGENITAL PSEUDARTHROSIS OF LOWER LEG TREATED BY ALMOST OUTDATED METHOD – CASE REPORT	
Зоран Вукашиновић, Душко Спасовски, Игор Шешлија, Исмет Гавранкапетановић, Елвир Баждар, Зорица Живковић	
АКУТНО НЕКРОТИЗИРАЈУЋЕ ЗАПАЉЕЊЕ ЈЕДЊАКА – ЦРНИ ЈЕДЊАК	94-98
Слободан Николић, Владимир Живковић	
BLACK ESOPHAGUS – CASE REPORT	
Slobodan Nikolić, Vladimir Živković	
ПРЕГЛЕДИ ЛИТЕРАТУРЕ • REVIEW ARTICLES	
ПРИМЕНА ВАЗДУШНЕ АБРАЗИЈЕ У СТОМАТОЛОГИЈИ	99-105
Зоран Мандинић, Зоран Р. Вулићевић, Милош Белоица, Ивана Радовић, Јелена Мандић, Момир Царевић, Јасмина Текић	
THE APPLICATION OF AIR ABRASION IN DENTISTRY	
Zoran Mandinić, Zoran R. Vulićević, Miloš Beloica, Ivana Radović, Jelena Mandić, Momir Carević, Jasmina Tekić	
CURRENT CONCEPTS OF PATHOPHYSIOLOGY, EPIDEMIOLOGY AND CLASSIFICATION OF PRURITUS	106-112
Marina Jovanović	
АКТУЕЛНИ КОНЦЕПТИ ПАТОФИЗИОЛОГИЈЕ, ЕПИДЕМИОЛОГИЈЕ И КЛАСИФИКАЦИЈЕ ПРУРИТУСА	
Марина Јовановић	
RENAL HYPERTENSION AND CARDIOVASCULAR DISORDER IN CHILDREN WITH CHRONIC KIDNEY DISEASE	113-117
Amira Peco-Antić, Dušan Paripović	
РЕНАЛНА ХИПЕРТЕНЗИЈА И КАРДИОВАСКУЛАРНА БОЛЕСТ КОД ДЕЦЕ С ХРОНИЧНИМ ОБОЉЕЊЕМ БУБРЕГА	
Амира Пецо-Антић, Душан Париповић	
МИОМИ УТЕРУСА У ТРУДНОЋИ, ТОКОМ ПОРОЂАЈА И У ПУЕРПЕРИЈУМУ	118-124
Радмила Спарич	
UTERINE MYOMAS IN PREGNANCY, CHILDBIRTH AND PUERPERIUM	
Radmila Sparić	
АКТУЕЛНЕ ТЕМЕ • CURRENT TOPICS	
NUTRITION IN PREGNANCY: BASIC PRINCIPLES AND RECOMMENDATIONS	125-130
Draga Plečaš, Snežana Plešinac, Olivera Kontić Vučinić	
ИСХРАНА У ТРУДНОЋИ: ОСНОВНИ ПРИНЦИПИ И ПРЕПОРУКЕ	
Драга Плећаш, Снежана Плешинац, Оливера Контић Вучинић	
ИСТОРИЈА МЕДИЦИНЕ • HISTORY OF MEDICINE	
ОСНИВАЧИ ИНВАЗИВНЕ КАРДИОВАСКУЛАРНЕ МЕДИЦИНЕ – ЧАРЛС ТЕОДОР ДОТЕР И САРАДНИЦИ: КРАТАК ИСТОРИЈСКИ ПРЕГЛЕД	131-137
Јелена Костић, Бранко Белеслин, Милан Недељковић, Миодраг Остојић	
PIONEERS OF INVASIVE CARDIOVASCULAR MEDICINE – CHARLES THEODORE DOTTER AND COLLEAGUES: SHORT HISTORICAL REVIEW	
Jelena Kostić, Branko Beleslin, Milan Nedeljković, Miodrag Ostojić	
УПУТСТВО АУТОРИМА • INSTRUCTIONS FOR AUTHORS	138-143

Eye Injuries Caused by Shotgun and Air-Rifles Treated at the University Eye Clinic in Belgrade 2000–2009

Miloš B. Jovanović^{1,2}

¹Faculty of Medicine, University of Belgrade, Belgrade, Serbia

²Clinic of Eye Diseases, Clinical Center of Serbia, Belgrade, Serbia

SUMMARY

Introduction Eye injuries caused by shotgun buckshot or air-rifle bullets are not common but are very severe, causing blindness of the injured eye.

Objective By comparison of different parameters, to determine which of these two types of injuries have more serious final effect on vision.

Methods A retrospective comparative analysis of patients with shotgun and air-rifle injuries, treated in the period 2000–2009 at the University Eye Clinic in Belgrade was carried out, with patients being divided in two groups depending of the type of the weapon. Age of patients, occupation, days in the week and part of the day when the accidents happened, presence of the retained foreign body, as well as the visual acuity on admission and final visual outcome were reviewed and analyzed.

Results There were 16 shotgun and 5 air-rifle injuries. Mean age of patients injured by shotgun was 45.5 ± 11.9 years, while those injured by air-rifle bullets were only 15.0 ± 1.0 years old. Shotgun accidents happened in hunters, on weekends, in the morning, while air-rifle accidents were typical for pupils, on working days, in the afternoon. Final visual acuity following buckshot injuries was: NLP in 6 (37.5%), less than 0.1 in 6 (37.5%) and normal (1.0) in 4 (25%) patients. Out of patients hit by air-rifle bullet, no light perception (NLP) was documented in 4 (80%) while visual acuity remained normal in one patient.

Conclusion All injuries by shotgun and air-rifle are very serious, ending in loss of vision in high percent of cases. Prevention is essential.

Keywords: eye injuries; buckshot; air-rifle; visual acuity

INTRODUCTION

Eye injuries by shotgun are not common. They may be caused by gunpowder particles, when usually both eyes, the entire surface of the face and even other parts of the body are affected. Gunpowder particles may penetrate conjunctiva and cornea, and some of them may even penetrate into the eyeball [1, 2, 3]. However, eye injuries from a shotgun can be caused also by buckshot, accidentally during hunting. These injuries are more serious. Buckshot, due to its spherical shape, 5.6 mm caliber, 3.56 g of weight, with a speed up to 1250 m/sec, can penetrate through the eyelids into orbit and stay there or in the surrounding sinuses. Accordingly, the eyeball suffers due to contusion syndrome. A penetrating or perforating injury of the eyeball itself is possible, too [4–7]. Nowadays, eye injuries caused by air-rifles are very rare compared to the period of several decades ago when such accidents were far more common; they were usually very serious, and common reasons for enucleation of the eyeball [8–11]. Air-rifle bullet has a 5.52 mm caliber, 1.52 g of weight, and speed up to 200 m/sec. High number of serious accidents was the main reason for withdrawing air-rifles from free sale. Today, such injuries are the result of abuse of residual illegal weapons as toys. This study was

aimed at determining similarities and differences of eye injuries caused by these two types of weapons, taking into account a variety of parameters.

OBJECTIVE

This study was aimed at determining similarities and differences of eye injuries caused by these two types of weapons in different settings.

METHODS

Patients with eye injuries caused by shotguns and air-rifles, hospitalized at the University Eye Clinic in Belgrade, Serbia, in the period from January 1st, 2000 to December 31st, 2009 were analyzed. All of them were hospitalized as emergency cases. All were examined by an ophthalmologist, their visual acuity was evaluated by Snellen charts, and all had a careful slit lamp and posterior segment examination. The same day, or at least the following day (as soon as possible), x-ray or CT scan was done to confirm or exclude the presence of any orbital foreign body. In the cases where x-ray was sufficient for detection and localization of the foreign body, CT scan was not performed. Dur-

Correspondence to:

Miloš JOVANOVIĆ
Clinic of Eye Diseases
Clinical Center of Serbia
Pasterova 2, 11000 Belgrade
Serbia
milosjov@scnet.rs

ing hospitalization, each patient was treated conservatively, and surgery was performed if required. Intraocular foreign bodies were removed by vitrectomy, while intraorbital ones were not removed. Once discharged, all patients were controlled after 15 days, two months and twice a year later on. There were no outpatients with such an injury.

For the purpose of the study, all patients were divided in two groups: the first group consisted of those injured by buckshot, while another group included people injured by the air-rifle bullet. Sex, age, place of residence, occupation, date and time of injury, nature of eye injury, presence or absence of foreign bodies and their localization were compared, and finally, visual acuity was checked once again.

The analysis of the cases included Fisher's exact test and t-test.

RESULTS

In 10-year period (2000–2009), 3,206 patients with mechanical eye injuries resulting from different causes were admitted and treated. Among them, there were 21 (0.7%) injured by bullet from a shotgun (16) or by air-rifle bullet (5). In all of them, just one eye was injured. Out of 16 cases with shotgun injury, the right eye was injured in 10 of them and the left one in the remaining 6, while in air-rifle injuries, the left eye was wounded in all 5 cases.

The patients were followed up for 24±6 months after hospital treatment.

In the group with shotgun injury, there were 10 contusions of the globe, 4 perforations and 2 penetrating wounds of the eye. In the second group with air-rifle injuries, there was 1 contusion, 2 penetrating and 2 perforating wounds of the eye.

Demographic characteristics and clinical data for individual patients were listed in Tables 1 and 2, respectively, while parametric values for these two groups were compared in Table 3.

DISCUSSION

At the University Eye Clinic in Belgrade, in 10-year period, 16 patients with a shotgun and 5 patients with an air-rifle injury were treated intrahospitally. A small number of air-rifle incidents is understandable, because this kind of weapon is prohibited by law to be used by children, and it is not available in the stores. Similar low incidence of eye injuries by this weapon is reported by other authors [8, 12, 13].

In the group injured by shotgun, out of 16 patients there was just one female, who was taking care of her cows at the time when she was hit accidentally by one of the hunters who did not notice her. All other 15 victims were hunters,

Table 1. Patients with eye injuries caused by buckshot

Patient	Sex	Age	Eye	Place of residence	Occupation	Day of injury	Hour of injury	Type of injury	Foreign body	Initial VA	Final VA
1	M	37	R	T	Ck	Mo	14.00	PN	IOFB	NLP	NLP
2	M	33	R	T	Ck	Su	12.30	CI	WFB	0.5	1.0
3	M	39	L	C	F	Su	09.00	PR	ORFB	NLP	NLP
4	M	44	L	C	W	Su	14.00	CI	ORFB	1.0	1.0
5	M	38	R	C	F	Su	07.30	PN	IOFB	NLP	NLP
6	M	54	R	T	Ck	Su	10.00	CI	ORFB	0.02	0.1
7	M	53	R	C	W	Su	07.30	CI	ORFB	LP	0.06
8	F	73	R	C	Hw	We	11.00	CI	ORFB	0.02	0.1
9	M	55	L	C	Ps	Su	10.30	PR	ORFB	NLP	NLP
10	M	57	L	C	F	Su	12.00	CI	ORFB	0.6	1.0
11	M	60	R	T	Ck	Su	10.30	CI	ORFB	0.02	0.1
12	M	36	R	C	W	Su	13.00	CI	ORFB	0.02	0.1
13	M	38	R	C	W	Sa	11.00	PR	ORFB	NLP	NLP
14	M	36	R	C	F	Su	13.00	PR	ORFB	NLP	NLP
15	M	29	L	C	F	We	14.00	CI	WFB	LP	0.06
16	M	47	L	C	W	Su	08.30	CI	WFB	0.7	1.0

M – male; F – female; R – right; L – left; T – town; C – country; Ck – clerk; F – farmer; W – worker; Hw – hauswife; Ps – pensioner; Mo – Monday; Su – Sunday; We – Wednesday; Sa – Saturday; PN – penetrating injury; PR – perforating injury; CI – contusion injury; IOFB – intraocular foreign body; ORFB – orbital foreign body; WFB – without foreign body; VA – visual acuity; NLP – no light perception; LP – light perception

Table 2. Patients with eye injuries caused by bullet from the air-rifle

Patient	Sex	Age	Eye	Place of residence	Occupation	Day of injury	Hour of injury	Type of injury	Foreign body	Initial VA	Final VA
1	M	14	L	T	P	Tu	16.00	PN	IOFB	NLP	NLP
2	M	15	L	T	P	Sa	16.00	PN	IOFB	NLP	NLP
3	M	14	L	C	P	Th	15.00	CI	ORFB	0.3	1.0
4	F	16	L	C	P	Sa	13.00	PR	ORFB	NLP	NLP
5	M	16	L	T	P	Th	14.00	PR	ORFB	NLP	NLP

P – pupil; Tu – Tuesday; Th – Thursday

Table 3. Some comparative parametric values of both groups of the injured

Parameter		Eye injuries		p value
		Buckshot (n=16)	Air rifle (n=5)	
Gender male		15	4	0.429
Age (years)		45.5±11.9	15.0±1.0	<0.001
Place of residence (town)		4	3	0.280
Type of injury	PN	2	2	
	CI	10	1	
	PR	4	2	
Foreign body		13	5	0.549
Visual acuity	≤0.1 – NLP	12	4	0.212
	1.0	4	1	

PN – penetrating injury; CI – contusion injury; PR – perforating injury; NLP – no light perception

having been hit by another hunter. Roden et al. [14] and Morris et al. [6] report males to be wounded, mainly in the hunt, and in some other sport activities, too (hunting, trap, skeet shooting, and sporting clays) [15]. In the other group with the air-rifle injuries, the majority was males, too: 4 boys and just one girl among 5 patients.

In both groups, all the injuries were unilateral. Other investigators confirm that injuries of this type are unilateral in most of the cases [13, 16, 17], but simultaneous bilateral wounds have been observed as well [12, 13, 15].

The mean age in the first group (shotgun) was 45.5±11.5 years and in the second one (air-rifles) it was only 15.0±1.0 years, so the difference is highly significant ($p<0.001$) (Table 3). Newman and Russo [12] and Schein et al. [17] report that the wounded by air-rifle were 13–15 year old adolescents. Occupation of persons hit by buckshot was as follows: 5 workers, 5 farmers, 4 employees, one retired person and one housewife, while all wounded by air-rifle were pupils (5 cases). It is worth mentioning that all accidents with shotguns in hunters occurred on weekends, in the morning (12 of them on Sunday). The explanation lies in the well known fact that group hunts are always organized on weekends, in the morning, while afternoons are reserved for lunch, socializing and exchange of recognized hunting stories. Pupils used to play with air-rifles in the afternoon on working days, when they were back from school, because the grownups were usually still busy or not at home at that time. In specific, no grownup was present at the time of accident in this group of pupils. In most cases, a schoolmate was the one handling the rifle; the only case when a girl was wounded was when her brother hit her. Schein et al. [17] report that, in the air-rifle incidents, a known person or a friend fired the weapon in 91% of cases and relatives in 40%, while grownups were not present in 11% of the time.

There were 3 kinds of buckshot injuries. Contusions of the eyeball were found in the majority of cases (10 out of 16, or 62.5%). In 7 of them, buckshot penetrated the eyelid, passed the eyeball and remained in the orbit. In all of these 10 patients with contusion of the eye, there was a significant chorioretinal damage, especially in the region of macula, with consecutive cicatrization and corresponding impairment of visual acuity, i.e. 6 of them had final visual acuity of 0.1 or less. Perforation of the eyeball was

found in 4 patients (25%). In all of them, buckshot passed through the eyeball and stayed in the orbit, resulting in the complete loss of function (NLP) in all 4 eyes. A penetrating injury was found in the remaining 2 patients (12.5%) with buckshot within the eyeball and final blindness (NLP) of the injured eye in both cases.

Altogether, patients hit by buckshot had final visual acuity as follows: NLP in 6 (37.5%), 0.1 or less in other 6 (37.5%), while vision remained normal (1.0) in 4 cases (25%) (Table 3).

Other investigators with similar number of patients injured by buckshot found similar percent of contusions, perforations and penetrations, with considerably poor functional outcome [13, 14, 15, 18].

In the air-rifle injured group, 2 patients experienced penetration with a bullet within the eyeball, another 2 had perforation with a bullet in the orbit, while the last one just had contusion of the eyeball with a bullet in the orbit. Final visual outcome was NLP in the first 4 cases, while the vision remained normal in the fifth one (contusion).

Similar percentage of contusions, penetrations and perforations in air-rifle eye injuries with poor visual outcome has been reported by other authors. In Schein et al. series [17], 84% of cases with penetrating injuries from the air-rifle had final visual acuity less than 0.1, while Shattleworth and Galloway [8] report complete loss of vision (NLP) in 53% of their cases with the air-rifle injury. Papers of Assaf et al. [16] and those of Newman and Russo [12] are worthy of note, the first stating that atrophy of the eye is common in the air-rifle injuries, while the second found enucleation as a common outcome. Marshall et al. [18] report that in persons younger than 18 years trauma is the reason for enucleation in 60% of cases, and in 25% of them an air-rifle being the weapon used.

It is obvious that, in both groups of the injured in our series, the complete loss of vision (NLP) was the final functional outcome whenever there was a perforating or a penetrating injury of the eye. Contusions were serious, but functional outcome was better in these cases.

It is significant that not one of the injured in our series had any protective glasses at the moment of accident. Some papers [19, 20, 21] emphasize the importance of wearing appropriate protective polycarbonate glasses for successful prevention of such injuries and effective protection of the eye.

CONCLUSION

It can be concluded that injuries caused by shotgun or air-rifle are mostly seen in males. Injuries caused by buckshot are typical for middle-aged men, on weekend days in the morning, while bullets from air-rifle hurt boys of about 15 years, on weekdays in the afternoon. Injuries caused by buckshot are mostly of contusion type, with better visual prognosis, while injuries by bullets from air-rifle usually cause penetrating or perforating injuries of the eyeball, which invariably ends up with complete loss of vision (NLP).

REFERENCES

- Kotagiri AK, Sundaram V, Khandvala M, Teimory M. Gunpowder injury to the eye. *Clin Exp Ophthalmol*. 2008; 36:190-1.
- Amin K, Keenan J. Ocular gunpowder injury. *Eye*. 2007; 21:119-20.
- Dreizen NG, Stulting RD. Ocular gunpowder injuries. *Am J Ophthalmol*. 1985; 100:852-3.
- Bersudsky V, Kraus E, Rehany U. Unexpected intraocular ricochet path of shotgun pellet. *Acta Ophthalmol Scand*. 2000; 78:237-8.
- Liu SY, Cheng WY, Lee HT, Shen CC. Endonasal transsphenoidal endoscopy-assisted removal of a shotgun pellet in the sphenoid sinus: a case report. *Surg Neurol*. 2008; 70 Suppl 1:S1:56-9.
- Morris RE, Witherspoon CD, Feist RM, Byrne JB Jr, Ottemiller DE. Bilateral ocular shotgun injury. *Am J Ophthalmol*. 1987; 103:695-700.
- Alfaro DV, Tran VT, Runyan T, Chong LP, Ryan SJ, Liggett PE. Vitrectomy for perforating eye injuries from shotgun pellets. *Am J Ophthalmol*. 1992; 114:81-5.
- Shuttleworth GN, Galloway PH. Ocular air-gun injury: 19 cases. *J R Soc Med*. 2000; 94:396-9.
- Endo S, Ishida N, Yamaguchi T. The BB gun is equivalent to the airsoft gun in the Japanese literature. *Arch Ophthalmol*. 2000; 118:732-3.
- Sternberg P, de Juan E, Green WR, Hirst LW, Sommer A. Ocular BB injuries. *Ophthalmology*. 1984; 91:1269-77.
- Harris W, Luterman A, Curreri PW. BB and pellet guns – toys or deadly weapons? *J Trauma*. 1983; 23:566-9.
- Newman TL, Russo PA. Ocular sequelae of BB injuries to the eye and surrounding adnexa. *J Am Optom Assoc*. 1998; 105:535-8.
- Agbeja AM, Osuntokun O. Ocular gun-shot injuries in Abadan. *Afr J Med Sci*. 1991; 20:35-40.
- Roden D, Cleary P, Eustace P. A five-year survey of ocular shotgun injuries in Ireland. *Br J Ophthalmol*. 1987; 71:449-53.
- Warr WF, Cook RA. Shotgun eye injuries. Ocular risk and eye protection efficacy. *Ophthalmology*. 1992; 99:867-72.
- Assaf E, Emadison H, Bendeddouche K, Forestier F, Salvanet-Bouccara A. Pellet guns: a persistent threat to eye (Article in French). *J Fr Ophthalmic*. 2003; 26:960-6.
- Schein OD, Enger C, Tielsch JM. The context and consequences of ocular injuries from air guns. *Am J Ophthalmol*. 1994; 117:501-6.
- Marshall DH, Brownstein S, Addison DJ, Mackenzie SG, Jordan DR, Clarke WN. Air guns: the main cause of enucleation secondary to trauma in children and young adults in the greater Ottawa area in 1974-93. *Can J Ophthalmol*. 1995; 30:187-92.
- Ford JG, Barr CC. Penetrating pellet fragmentation. A complication of ocular shotgun injury. *Arch Ophthalmol*. 1990; 108:48-50.
- John G, Feist RM, White MF, Witherspoon CD, Morris R, Kimble JA. Field evaluation of polycarbonate versus conventional safety glasses. *South Med J*. 1988; 81:1534-6.
- Simmons ST, Krohel GB, Hay PB. Prevention of ocular gunshot injuries using polycarbonate lenses. *Ophthalmology*. 1984; 91:977-83.

Повреде очију изазване ловачком и ваздушном пушком код особа лечених на Универзитетској очној клиници у Београду 2000–2009. године

Милош Б. Јовановић^{1,2}

¹Медицински факултет, Универзитет у Београду, Београд, Србија;

²Клиника за очне болести, Клинички центар Србије, Београд, Србија

КРАТАК САДРЖАЈ

Увод Повреде сачмом из ловачке пушке и дијаболом из ваздушне пушке нису честе, али су веома тешке и често доводе до губитка вида на повређеном оку.

Циљ рада Циљ рада је био да се поређењем различитих параметара утврди која од ове две врсте повреда даје теже последице по функцију вида.

Методе рада Урађена је ретроспективна анализа болесника повређених сачмом из ловачке пушке и дијаболом из ваздушне пушке који су лечени на Клиници за очне болести Клиничког центра Србије у Београду од јануара 2000. до децембра 2009. године. Одвојено по групама, анализирани су старост и занимање испитаника, дани у недељи и време дана када су повреде настале, природа повреде очне јабучице (са постојањем страног тела или без њега) и видна оштрина.

Резултати Било је 16 особа повређених сачмом и пет повређених дијаболом. У обе групе налазила се само по јед-

на повређена жена, остали испитаници били су мушкарци. Просечна старост испитаника повређених сачмом била је $45,5 \pm 11,9$ година, а испитаника повређених дијаболом $15,0 \pm 1,0$ година. Ловци су се повређивали углавном викендом (12 недељом) пре подне, док су се ученици повређивали радним данима у поподневним часовима. Код свих испитаника обе групе који су имали пенетрантну или перфоративну повреду очне јабучице дошло је до амаурозе. Код повређених с контузијом очне јабучице није забележена ниједна амауроza, али их је шест дијагностиковано код ловаца, чија је видна оштрина била мања од 0,1.

Закључак Повреде сачмом из ловачке пушке и дијаболом из ваздушне пушке су веома тешке по око и у великом броју случајева могу да проузрокују губитак вида. Превенција је посебно важна.

Кључне речи: повреде ока; ловачка пушка; ваздушна пушка; видна оштрина

Примљен • Received: 08/06/2012

Ревизија • Revision: 04/11/2013

Прихваћен • Accepted: 13/11/2013

Клинички и микробиолошки ефекти каузалне терапије пародонтопатије

Тања Предин¹, Миланко Ђурић^{1,2}, Јелена Мирнић¹, Ивана Гушић^{1,2}, Нађа Николић³,
Дубравка Марковић^{1,2}, Александра Анђелковић¹, Јелена Милашин³

¹Медицински факултет, Универзитет у Новом Саду, Нови Сад, Србија;

²Клиника за стоматологију Војводине, Нови Сад, Србија;

³Институт за хуману генетику, Стоматолошки факултет, Универзитет у Београду, Београд, Србија

КРАТАК САДРЖАЈ

Увод Пародонтопатија је инфламаторно, деструктивно обољење потпорног апарата зуба узроковано углавном Грам-негативним микроорганизмима. Дезорганизација и уклањање субгингивалног биофилма је примарни циљ каузалне терапије пародонтопатије.

Циљ рада Циљ овог рада био је да се процене клинички и микробиолошки ефекти каузалне терапије код особа с пародонтопатијом.

Методе рада У студију је укључено 40 испитаника с хроничном пародонтопатијом код којих је примењена каузална терапија. Клинички параметри (плак-индекс, гингивални индекс, индекс крварења из папиле, дубина пародонталних џепова и ниво припојног епитела) бележени су на почетку истраживања, као и месец дана и три месеца после терапије, док су узорци субгингивалног денталног плака анализирани на почетку и три месеца после терапије. За изоловање *Porphyromonas gingivalis*, *Tannerella forsythensis*, *Prevotella intermedia* и *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* коришћена је мултиплекс техника реакције ланчаног умножавања ДНК (енгл. polymerase chain reaction – PCR).

Резултати Резултати истраживања показују статистички значајно смањење свих испитиваних клиничких параметара после терапије. Преваленција *A. actinomycetemcomitans* статистички је значајно смањена за 22,5% после лечења. Преваленција *P. gingivalis*, *T. forsythensis* и *P. intermedia* такође је смањена након терапије, али то смањење није било статистички значајно.

Закључак Резултати ове студије показују да се каузалном терапијом пародонтопатије постижу знатна клиничка и микробиолошка побољшања.

Кључне речи: каузална терапија; техника PCR; обрада површине корена зуба; *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*; дентални плак

УВОД

Пародонтопатије се убрајају међу најчешћа обољења човека и главни су узрок губитка зуба после четрдесет и пете године, а одликују се запаљењем и оштећењем потпорног апарата зуба [1]. Кључну улогу у њиховом настанку играју микроорганизми денталног плака. Иако је у денталном плаку откривено више од 500 врста бактерија [2], само неке од њих – пре свега *Porphyromonas gingivalis*, *Tannerella forsythensis*, *Prevotella intermedia* и *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* – доводе се у везу с обољењима пародонцијума [3].

Иако је улога микроорганизама у настанку пародонтопатије од пресудног значаја, степен оштећења пародонталних ткива последица је интеракције микробиолошких фактора и имунског одговора домаћина [4]. Важну улогу имају и фактори ризика, као што су: генетско наслеђе, пол, старост, социоекономски услови, пушење и неке системске болести [5].

Лечење пародонтопатије се састоји од неколико фаза. Прва фаза је етиолошка, односно каузална, а подразумева дезорганизацију бактеријског плака (биофилма), уклањање свих супрагингивалних и субгингивалних наслага, одстрањивање фак-

тора који погодују нагомилавању денталног плака и општих фактора који смањују отпорност организма. Истраживања показују да је каузалном терапијом могуће смањити запаљење гингиве, дубину пародонталних џепова и ниво припојног епитела [6, 7, 8]. Поједини истраживачи чак истичу да успешно примењена каузална терапија и лечење упале доводе до остеокондензације и попуњавања вертикалних коштаных оштећења [9]. Ипак, успех лечења у великој мери зависи од мотивисаности и сарадње пацијента, степена оралне хигијене и штетних навика.

Уклањање свих субгингивалних наслага и механичка обрада површине корена зуба је основни поступак у етиолошкој фази лечења пародонтопатије и кључна је за успех лечења. Уобичајено је да се овај захват обавља по квадрантима или секстантима у интервалу од четири до шест недеља. Међутим, истраживања показују да у раду по квадрантима већ третиранци џепоци могу бити поново колонизовани патогеним бактеријама из нетретираних џепова и других места у усној дупљи. Такво премештање бактерија може довести до поновне инфекције и повратка обољења [10, 11]. Стога су Квиринен (*Quirynen*) и сарадници [12] 1995.

Correspondence to:

Tanja PREDIN
Bulevar Cara Lazara 5/46
21000 Novi Sad
Srbija
tanja.predin@yahoo.com

године предложили једносеански приступ и потпуни механички дебридман током 24 часа, уз коришћење хлорхексидина за субгингивалну иригацију. Они сматрају да се на тај начин знатно смањује број патогених бактерија и тако стварају услови за успешно излечење.

Успешност обраде површине коренова зуба је различита и зависи од почетне дубине џепа, стране зуба на којој се џеп налази и од анатомског изгледа фуркација и корена зуба [13]. Дубоки пародонтални џепои и фуркације су тешко приступачни за манипулацију пародонтолошким инструментима. Што је дубина џепа већа, то се ефекат механичке терапије смањује. Адријенсови (*Adriaens et Adriaens*) [14] су показали да након механичке обраде пародонталних џепова дубине 4–6 mm остаје 15–38% површина корена прекривених конкрементима, а код џепова дубљих од 6 mm чак 19–66%. Такође, мезијалне површине коренова су приступачније за обраду у односу на дисталне. Исто тако, успех лечења је лошији код вишекорених зуба у односу на једнокорене [15].

Уклањање наслага и обрада површине корена зуба доводи до смањења броја Грам-негативних бактерија, омогућавајући истовремено повећање броја Грам-позитивних кока и бацила, чија се преминација везује за здраву гингиву [16]. Ослобађање или одговарајуће сузбијање пародонтопатогена у субгингивалној регији је од кључног значаја за лечење пародонтопатије. На ово посебно указују Дарби (*Darby*) и сарадници [7], који наводе да субгингивална инструментација доводи до значајног смањења *P. intermedia*, *T. forsythia* и *T. denticola*. Међутим, ни овде успех лечења није увек исти. Тако су Момбели (*Mombelli*) и сарадници [17] уочили директну корелацију између броја пародонталних џепова који су након терапије били дубљи од 4 mm и броја страна на којима је и даље био позитиван налаз на *P. gingivalis*. Кристерсон (*Christersson*) и сарадници [18] истичу да је уклањање *A. actinomycetemcomitans* након обраде корена често неуспешно услед способности ове бактерије да изврши инвазију на дентин и цемент корена зуба, што представља резервоар пародонтопатогена који може да доведе до поновне колонизације и инфекције.

ЦИЉ РАДА

Циљ овог рада био је да се испита ефикасност каузалне фазе терапије код особа с хроничном пародонтопатијом.

МЕТОДЕ РАДА

У истраживању је учествовало 40 испитаника с хроничном пародонтопатијом (22 жене и 18 мушкараца), просечне старости од 52,25 година, који су лечени на Клиници за стоматологију Војводине током 2009. и 2010. године. Испитаници су имали најмање 20 зуба с најмање два зуба по квадранту и дубином пародон-

талног џепа од 5 mm и већом, те крварењем након сондирања.

У истраживање нису били укључени пацијенти који су боловали од системских болести, који су користили лекове који могу утицати на стање пародонцијума или антибиотике, који су били лечени од пародонтопатије у протеклих шест месеци, пушачи и труднице.

Сви пацијенти који су задовољили критеријуме за укључивање у студију и добровољно пристали да у њој учествују потписали су писану сагласност. Извођење студије је одобрила Етичка комисија Клинике за стоматологију Војводине у Новом Саду.

За процену стања пародонцијума коришћени су плак-индекс (ПИ) према Силнес–Лоуу (*Silness–Löe*), гингивални индекс (ГИ) према Лоу–Силнесу (*Löe–Silness*), индекс крварења из папиле (ИКП) према Милеману (*Mühlemann*), дубина пародонталних џепова (ДПЦ) и ниво припојног епитела (НПЕ). Индекси су мерени пародонталном сондом према методи Вилијемса (*Williams*) (*Hu-Friedy, Chicago, IL, САД*) у четири тачке на сваком зубу, и то: вестибуломезијални брид, средина вестибуларне стране, ородистални брид и средина оралне стране, изузев индекса крварења из папиле, који је мерен у првом и трећем квадранту са вестибуларне стране, а у другом и четвртм квадранту с оралне стране, при чему су посматране мезијалне папиле.

Уклањање наслага и обрада површине корена зуба рађена је квадрант по квадрант, почев од горњег десног квадранта, у смеру казаљке на сату у четири сеансе у размацима од недељу дана. Радно поље је анестезирано локалном инфилтрационом анестезијом (двопроцентни лидокаин с адреналином у размери 1:100.000). За обраду површине корена зуба коришћене су посебне кирете по Грејсију (*Gracey*) (*Kohler, Аустрија*) и ултразвучни апарат *mini Piezon* (*EMS, Швајцарска*). Клинички преглед и лечење свих испитаника обавио је исти стоматолог.

Узорци денталног плака за микробиолошко испитивање узимани су из најдубљег пародонталног џепа Грејсијевом киретом и чувани у Епендорфовим тубама с физиолошким раствором на температури од -80°C до анализе. Узорци су испитани на Институту за хуману генетику Стоматолошког факултета Универзитета у Београду. За изоловање *P. gingivalis*, *T. forsythensis*, *P. intermedia* и *A. actinomycetemcomitans* у субгингивалном денталном плаку коришћена је мултиплекс техника реакције ланчаног умножавања ДНК (енгл. *polymerase chain reaction – PCR*).

Изолација присутне бактеријске ДНК вршена је третирањем узорка протеиназом К на температури од 56°C током 30 минута, а затим инактивацијом ензима загревањем узорка на температури од 94°C током 15 минута. За извођење технике *PCR* коришћене су познате секвенце прајмера. Секвенце свих прајмера и дужине очекиваних ампликона приказане су у табели 1. *PCR* је рађена у запремини од 25 µl, а реакциона смеша је била следећег садржаја: стерилна вода, *PCR* пуфер, 2,5 mM *MgCl₂*, 200 µM *dNTP*, 5 µM прајмери, 0,1 U *Taq* полимеразе, 4 µl узорка с претпостављеном

Табела 1. Секвенце прајмера за откривање микроорганизама, специфичне температуре хибридације и дужина очекиваних ампликона
Table 1. Sequences of specific primers used for PCR, annealing temperatures and size of the expected PCR products

Микроорганизам Microorganism	Секвенце прајмера Sequences of specific primers	Температура хибридације Annealing temperatures	Дужина ампликона Size of PCR products
<i>Porphyromonas gingivalis</i>	CAA TAC TCG TAT CGC CCG TTA TTC	55°C	400 bp
<i>Aggregatibacter actinomycetemcomitans</i>	CAC TTA AAG GTC CGC CTA CGT GC	55°C	600 bp
<i>Tannerella forsythia</i>	GTA GAG CTT ACA CTA TAT CGC AAA CTC CTA	53°C	840 bp
<i>Prevotella intermedia</i>	GTT GCG TGC ACT CAA GTC CGC C	53°C	660 bp

Табела 2. Температурни профил PCR
Table 2. Cycling profiles for PCR reactions

Иницијална денатурација Initial denaturation	35 циклуса – три корака 35 cycles – three steps			Крајња елонгација Final elongation
	Денатурација Denaturation	Хибридација Hybridization	Елонгација Elongation	
3 min. 95°C	1 min. 94°C	1 min. 55-60°C	1-1.30 min. 72°C	7 min. 72°C

бактеријском ДНК. Температурни профил извођења PCR дат је у табели 2.

Процена стања пародонцијума вршена је пре примене терапије, месец дана и три месеца после лечења, док је микробиолошко испитивање вршено пре терапије и три месеца након лечења.

Подаци прикупљени истраживањем анализирани су помоћу статистичког пакета SPSS 16 for Windows. Дескриптивна статистика укључивала је приказ средњих вредности, опсега, мере варијабилитета за нумеричке податке, односно дистрибуције фреквенција (процента) за атрибутивна обележја. Испитивање разлика између обележја у односу на две групе података или више њих вршено је применом одговарајућих параметријских (Студентов *t*-тест, ANOVA) и непараметријских тестова (Вилкосонов *signed-rank* тест, Макнемаров тест и χ^2 -тест). Повезаност две варијабле мерена је Спирмановим коефицијентом корелације.

РЕЗУЛТАТИ

Резултати клиничког истраживања показују значајно стишавање запаљењских процеса у оболелом пародонцијуму. Средње вредности свих испитиваних пародон-

талних индекса биле су статистички значајно снижене након лечења и остале су ниже током читавог периода испитивања (Табела 3). Ово се посебно односи на индекс крварења из папиле, чија се средња вредност са 1,39 пре терапије смањила на 0,85 после месец дана, односно на 0,81 три месеца после лечења. Дубина пародонталних џепова дубоких 5-7 mm смањена је за 1,68 mm после месец дана, односно за 1,43 mm три месеца након лечења, док је дубина џепова дубљих од 7 mm била мања за 2,08 mm после месец дана а за 2,26 mm после три месеца (Графикон 1). Број пародонталних џепова дубљих од 7 mm смањен је за 51,92%, односно за 42,31%. Истовремено, повећан је број пародонталних џепова плићких од 4 mm за 4,99% након месец дана и за 5,50% три месеца после лечења (Табела 4). Ниво припојног епитела такође бележи статистички значајно ниже вредности, и то за 0,62 mm после месец дана и 0,78 mm после три месеца.

Резултати микробиолошког испитивања показују високу учесталост свих испитиваних бактеријских врста код највећег броја наших пацијената. Тако су *P. intermedia* и *T. forsythensis* изоловане код чак 33 испитаника (82,5%) на почетку истраживања, *A. actinomycetemcomitans* је утврђен код 28 (70%), а *P. gingivalis* код 32 испитаника (80%), док су све четири испитиване

Табела 3. Клинички параметри пре и после терапије ($\bar{x} \pm SD$)
Table 3. Clinical findings before and after therapy ($\bar{x} \pm SD$)

Параметар Parameter	Пре терапије Baseline	После месец дана After 1 month	После три месеца After 3 months	Пре терапије – после месец дана Baseline – after 1 month	Пре терапије – после три месеца Baseline – after 3 months
ПИ PI	1.13±0.42	0.57±0.31	0.42±0.22	0.56±0.37*	0.71±0.35*
ГИ GI	1.01±0.60	0.47±0.46	0.26±0.31	0.54±0.49*	0.75±0.52*
ИКП PBI	1.39±0.78	0.85±0.47	0.81±0.63	0.54±0.71*	0.58±0.73*
ДПЦ (mm) PPD (mm)	2.82±0.67	2.37±0.63	2.31±0.67	0.45±0.46*	0.51±0.58*
НПЕ (mm) CAL (mm)	2.05±1.10	1.43±0.93	1.28±0.86	0.62±0.51*	0.78±0.70*

* $p < 0,001$

ПИ – плак-индекс; ГИ – гингивални индекс; ИКП – индекс крварења из папиле; ДПЦ – дубина пародонталног џепа; НПЕ – ниво припојног епитела

* $p < 0,001$

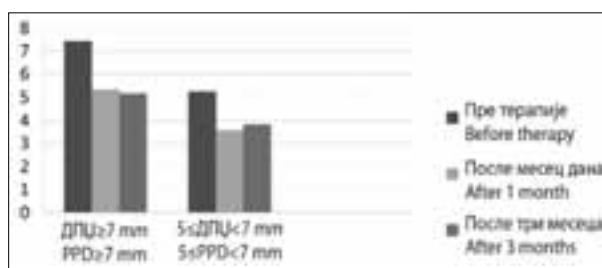
PI – plaque index; GI – gingival index; PBI – papilla bleeding index; PPD – probing pocket depth; CAL – clinical attachment level

бактерије изоловане код половине пацијената (50%). Три месеца након лечења пародонтопатогене бактерије су и даље биле присутне код великог, али ипак мањег, броја испитаника. Тако се број пацијената позитивних на све четири испитиване бактерије статистички значајно смањило са 20 (50%) на почетку истраживања на 10 (25%) после лечења. Успешност искорењивања појединих бактеријских врста била је различита; док је *A. actinomycetemcomitans* изолован код чак 22,5% мање испитаника ($p=0,013$), *T. forsythensis* је искорењена код свега 5% пацијената (Графикон 2).

Резултати корелације клиничких и микробиолошких параметара након примене каузалне терапије показују статистички значајну корелацију између *T. forsythensis* и дубине пародонталних џепова. Корелација других клиничких и микробиолошких параметара није била на статистички значајном нивоу (Табела 5).

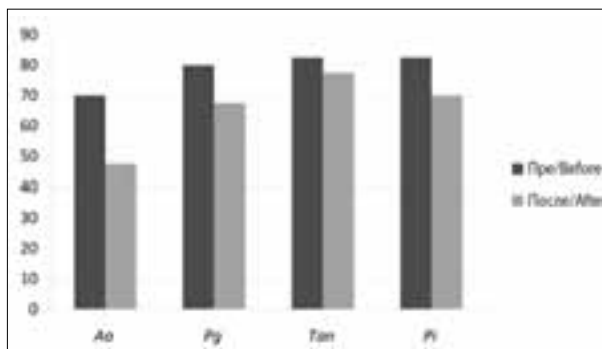
ДИСКУСИЈА

Резултати наше студије показују значајно смањење вредности свих испитиваних клиничких параметара након терапије и њихово задржавање на нижим нивоима током читавог периода испитивања. Тако је плак-индекс смањен са 1,13 пре терапије на 0,57 месец дана после лечења, односно на 0,42 три месеца касније. Смањење плак-индекса и побољшање оралне хигијене пацијената значајно су смањили и вредности гингивалног индекса и индекса крварења из папиле. Стишавање запаљењских процеса у оболелом пародонцијуму утицало је и на смањење дубине пародонталних џепова. Тако је средња вредност дубине пародонталних џепова смањена за 0,45 mm после месец дана, односно за 0,51 mm после три месеца. Средња вредност џепова дубине 5–7 mm смањена је са 5,24 mm на 3,57 mm, док је средња вредност џепова дубљих од 7 mm смањена са 7,42 mm на 5,16 mm. Ови резултати су слични резултатима других студија. Тако Коб (Cobb) [19] бележи смањење дубине пародонталних џепова



Графикон 1. Средње вредности дубине пародонталних џепова (ДПЦ) пре терапије, после месец дана и три месеца лечења

Graph 1. Mean values of probing pockets depth (PPD) before, 1 month and 3 months after therapy



Графикон 2. Преваленција пародонталних патогена пре и после терапије

Graph 2. Prevalence of periodontal pathogens before and after therapy

Aa – *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*; Pg – *Porphyromonas gingivalis*; Tan – *Tannerella forsythensis*; Pi – *Prevotella intermedia*

од 1,29 mm за умерене и 2,16 mm за дубоке џепове, док Бадерстен (Badersten) и сарадници [20] извештавају о смањењу дубине пародонталних џепова од 2,30 mm до 3,00 mm. За разлику од наше, студија Бадерстена и сарадника [20] обухватила је само једнокорене зубе, док су у наше истраживање били укључени и молари с тешко приступачним фуркацијама коренова. И док се резултати клиничких студија међусобно значајно не разликују, резултати микробиолошких испитивања показују велика одступања због разлике у примењеној методологији истраживања. Различите студије користе

Табела 4. Број пародонталних џепова пре и после терапије

Table 4. Number of periodontal pockets before and after therapy

Дубина пародонталног џепа (mm) Probing pocket depth (mm)	Број пародонталних џепова (%) / Number of periodontal pockets (%)		
	Пре терапије Before therapy	После месец дана After 1 month	После три месеца After 3 months
≤4	3144 (89.73)	3301 (94.20)*	3317 (94.66)*
5–7	308 (8.79)	176 (5.02)*	165 (4.71)*
≥7	52 (1.48)	27 (0.77)	22 (0.63)

* $p<0.05$

Табела 5. Корелација између клиничких и микробиолошких параметара три месеца након лечења

Table 5. Correlations between clinical and microbiological parameters 3 months after treatment

Микроорганизам Microorganism	ПИ PI	ГИ GI	ИКП PBI	ДПЦ PPD	НПЕ CAL	5 ≤ ДПЦ < 7 mm 5 ≤ PPD < 7 mm	ДПЦ ≥ 7 mm PPD ≥ 7 mm
<i>Aggregatibacter actinomycetemcomitans</i>	-0.065	-0.037	-0.074	0.269	0.256	-0.078	0.446
<i>Porphyromonas gingivalis</i>	-0.067	0.072	-0.120	0.032	0.153	0.088	-0.207
<i>Tannerella forsythia</i>	-0.003	0.026	0.013	0.389*	-0.148	0.368*	0.033
<i>Prevotella intermedia</i>	-0.052	-0.118	-0.092	0.191	-0.288	0.267	0.099

* статистички значајна позитивна корелација (Спирманова корелација)

* significant positive correlations (Spearman correlation)

различите методе за узорковање бактерија (пљувачка, слузница, субгингивална регија) и различите методе анализирања (култура ћелија, микроскопија тамног поља, PCR), што знатно отежава поређење добијених резултата [21]. Тако су Лау (*Lau*) и сарадници [22] применом технике PCR установили *A. actinomycetemcomitans* код 18,8% испитаника, *P. gingivalis* код 81,3%, а *T. forsythensis* код свих пацијената. Користећи културу ћелија, ова група аутора изоловала је поменуте микроорганизме код 6,3%, 18,8%, те код 25% испитаника. Вршећи идентификацију бактерија техником PCR у различитим биолошким материјалима, Милићевић и сарадници [23] су утврдили *A. actinomycetemcomitans* у денталном плаку код 28,5% пацијената, у ткиву пародонцијума код 12%, а у пљувачки код 3,3% испитаника.

У нашој студији техником PCR вршено је откривање четири врсте пародонтопатогених бактерија (*A. actinomycetemcomitans*, *P. gingivalis*, *T. forsythensis* и *P. intermedia*) у субгингивалном плаку пре лечења и три месеца након примењене пародонтолошке терапије.

A. actinomycetemcomitans је изолован код чак 70% испитаника упркос чињеници да се ова бактерија углавном везује за агресивни облик пародонтопатије, док се код особа с хроничном пародонтопатијом јавља у 25–30% случајева [24]. Такође, учесталост ове бактерије смањује се са годинама, те би се њена учесталост од 74,4% очекивала код пацијената узраста од 15 година до 24 године [25]. Милићевић и сарадници [23] су применом технике PCR изоловали ову бактерију код свега 28,5% одраслих испитаника. Узрок овако велике разлике могао би, према нашем мишљењу, да буде узнапредовали облик пародонтопатије код наших пацијената. Наиме, студије показују да се учесталост *A. actinomycetemcomitans* повећава с порастом дубине пародонталних џепова [26, 27]. Тако је у нашој студији ова бактерија откривена код чак 11 од 12 испитаника с пародонталним џеповима дубљим од 7 mm. И Тан (*Tan*) и сарадници [28] забележили су високу преваленцију *A. actinomycetemcomitans* и известили о 69% пацијената с хроничном пародонтопатијом, али и 78% здравих испитаника позитивних на ову бактерију, што су објаснили обележјима расне и етничке припадности испитаника. *A. actinomycetemcomitans* је уједно и једина бактерија код које се бележи статистички значајно смањење учесталости након лечења. Наиме, бактерија је пре примене терапије изолована код 47,5% пацијената, што представља смањење од чак 22,5%, што би могло да се доведе у везу са значајним смањењем дубине пародонталних џепова који су пре лечења били дубљи од 7 mm.

P. gingivalis је у нашој студији забележен код 80% испитаника на почетку лечења. То је у складу с налазима већине аутора који су примењивали технику

PCR за идентификацију ове бактерије. Наиме, Лау и сарадници [22] су изоловали ову бактерију код 81,3% испитаника, а Круз (*Cruz*) и сарадници [29] код 80%. Три месеца након лечења *P. gingivalis* је утврђен код 12,5% мање пацијената, што је близу границе статистичке значајности.

T. forsythensis и *P. intermedia* утврђене су у истом проценту, код чак 82,5% пацијената. Истраживања показују да *P. intermedia* реагује добро на пародонтолошку терапију, док је искорењивање *T. forsythensis* знатно мање успешно [7, 8, 30]. Наши резултати потврђују оваква запажања, будући да је *P. intermedia* искорењена код 12,5% испитаника, а *T. forsythensis* код само 5% пацијената.

Треба напоменути да примењена техника PCR у нашој студији није вршила квантитативну, већ само квалитативну анализу пародонтопатогена, те стога није могуће закључити у којој мери је заправо смањен број микроорганизама. Квантитативна анализа би свакако помогла у утврђивању стварног утицаја терапије на број бактерија. Оваква анализа, према нашем мишљењу, могла би показати да је и код пацијената код којих поједина бактеријска врста није искорењена ипак дошло до значајног смањења броја бактерија.

Налази наше студије такође показују у дужем временском интервалу добре клиничке резултате, јер се и три месеца након лечења бележи значајно смањење вредности испитиваних параметара. Мање смањење испитиваних параметара три месеца после терапије у односу на мерење након месец дана може се објаснити могућом бактеријском реколонијацијом која је уследила између два мерења. Нажалост, нисмо вршили микробиолошку процену месец дана после терапије, што би могло бити значајно у даљем тумачењу добијених резултата.

ЗАКЉУЧАК

Каузална терапија је прва и основна фаза лечења особа с пародонтопатијом. Добијени резултати потврђују ефикасност ове процедуре у стишавању запаљењских процеса у оболелом пародонцијуму и позитивне ефекте у искорењивању најзначајнијих пародонтопатогених бактерија.

НАПОМЕНА

Овај рад је финансиран средствима пројекта број 175075 Министарства просвете, науке и технолошког развоја Републике Србије.

ЛИТЕРАТУРА

- Đajić D, Đukanović D, Stanić S, Kovačević K. Bolesti usta, parodontologija, atlas. Beograd: Elit Medica; 2001.
- Zambon J. Periodontal diseases: microbial factors. *Ann Periodontol*. 1996; 1:879-925.
- Consensus Report. Periodontal diseases: Pathogenesis and microbial factors. *Ann Periodontol*. 1996; 1:926-32.
- Wolff L, Dahlen G, Aeppli D. Bacteria as risk markers for periodontitis. *J Periodontol*. 1994; 65:498-510.
- Kinane DF. Causation and pathogenesis of periodontal disease. *Periodontol*. 2000; 2001; 25:8-20.
- Van der Weijden, GA, Timmerman, MF. A systematic review on the clinical efficacy of subgingival debridement in the treatment of chronic periodontitis. *J Clin Periodontol*. 2002; 29:55-71.
- Darby I, Mooney J, Kinane D. Changes in subgingival microflora and humoral immune response following periodontal therapy. *J Clin Periodontol*. 2001; 28:796-805.
- Renvert S, Wikstrom M, Dahlen G, Slots J, Egelberg J. Effect of root debridement on the elimination of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* and *Bacteroides gingivalis* from periodontal pockets. *J Clin Periodontol*. 1990; 17:345-50.
- Nibali L, Pometti D, Tu YK, Donos N. Clinical and radiographic outcomes following non-surgical therapy of periodontal infrabony defects: a retrospective study. *J Clin Periodontol*. 2011; 38:50-7.
- Jervoe-Storm PM, Semaan E, Al Ahdab H, Engel S, Fimmers R, Jepsen S. Clinical outcomes of quadrant root planing versus full-mouth root planing. *J Clin Periodontol*. 2006; 33:209-15.
- Bollen CML, Mongardini C, Papaioannou W, van Steenberghe D, Quirynen M. The effect of a one-stage full-mouth disinfection on different intra-oral niches: Clinical and microbiological observations. *J Clin Periodontol*. 1998; 25:56-66.
- Quirynen M, Bollen CM, Vandekerckhove BN, Dekeyser C, Papaioannou W, Eysen H. Full- vs. partial-mouth disinfection in the treatment of periodontal infections: short-term clinical and microbiological observations. *J Dent Res*. 1995; 74(8):1459-67.
- Darby I. Non-surgical management of periodontal disease. *Aust Dent J*. 2009; 54(1 Suppl):86-95.
- Adriaens PA, Adriaens LM. Effects of nonsurgical periodontal therapy on hard and soft tissues. *Periodontol*. 2000; 2004; 36:121-45.
- Loos B, Claffey N, Egelberg J. Clinical and microbiological effects of root debridement in periodontal furcation pockets. *J Clin Periodontol*. 1988; 15:453-63.
- Haffajee AD, Cugini MA, Dibart S, Smith C, Kent RL Jr, Socransky SS. The effect of SRP on the clinical and microbiological parameters of periodontal diseases. *J Clin Periodontol*. 1997; 24:324-34.
- Mombelli A, Schmid B, Rutar A, Lang NP. Persistence patterns of *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia/nigrescens*, and *Actinobacillus actinomycetemcomitans* after mechanical therapy of periodontal disease. *J Periodontol*. 2000; 71:14-21.
- Christersson LA, Slots J, Rosling BG, Genco RJ. Microbiological and clinical effects of surgical treatment of localized juvenile periodontitis. *J Clin Periodontol*. 1985; 12:465-76.
- Cobb CM. Non-surgical pocket therapy: mechanical. *Ann Periodontol*. 1996; 1:443-90.
- Badersten A, Nilveus R, Egelberg J. Effect of nonsurgical therapy II. Severely advanced periodontitis. *J Clin Periodontol*. 1984; 11:63-76.
- Swierkot K, Nonnenmacher CL, Mutters R, Flores-de-Jacoby L, Mengel R. One-stage full-mouth disinfection versus quadrant and full-mouth root planing. *J Clin Periodontol*. 2009; 36:240-9.
- Lau L, Sanz M, Herrera D, Morillo JM, Martin C, Silva A. Quantitative real-time polymerase chain reaction versus culture: a comparison between two methods for the detection and quantification of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis* and *Tannerella forsythensis* in subgingival plaque samples. *J Clin Periodontol*. 2004; 31:1061-9.
- Miličević R, Brajović G, Nikolić-Jakoba N, Popović B, Pavlica D, Leković V, et al. Identification of periodontopathogen microorganisms in PCR technique. *Srp Arh Celok Lek*. 2008; 136(9-10):476-80.
- Kornman, KS, Robertson PB. Clinical and microbiological evaluation of therapy for juvenile periodontitis. *J Periodontol*. 1985; 56:443-6.
- Slots J, Feik D, Rams TE. *Actinobacillus actinomycetemcomitans* and *Actinobacillus Bacteroides intermedius* in human periodontitis: age relationship and mutual association. *J Clin Periodontol*. 1990; 17:659-62.
- Ebersole JL, Cappelli D, Sandoval MN. Subgingival distribution of *A. actinomycetemcomitans* in periodontitis. *J Clin Periodontol*. 1994; 21:65-74.
- Wolff LE, Aeppli DM, Pihlstrom B, Anderson L, Stoltenberg J, Osborn J, et al. Natural distribution of 5 bacteria associated with periodontal disease. *J Clin Periodontol*. 1993; 20:699-706.
- Tan KS, Woo CH, Ong G, Song KP. Prevalence of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* in an ethnic adult Chinese population. *J Clin Periodontol*. 2001; 28:886-90.
- Cruz GA, Toledo S, Sallum EA, Sallum AW, Ambrosano GMB, Sardi JCO, et al. Clinical and laboratory evaluations of non-surgical periodontal treatment in subjects with diabetes mellitus. *J Periodontol*. 2008; 79:1150-7.
- Mombelli A, Nyman S, Bragger U, Wennström JL, Lang NP. Clinical and microbiological changes associated with an altered subgingival environment induced by periodontal pocket reduction. *J Clin Periodontol*. 1995; 22:780-7.

Clinical and Microbiological Effects of the Initial Periodontal Therapy

Tanja Predin¹, Milanko Djurić^{1,2}, Jelena Mirnić¹, Ivana Gušić^{1,2}, Nadja Nikolić³, Dubravka Marković^{1,2}, Aleksandra Andjelković¹, Jelena Milašin³

¹Faculty of Medicine, University of Novi Sad, Novi Sad, Serbia;

²Dental Clinic of Vojvodina, Novi Sad, Serbia;

³Department of Human Genetics, School of Dentistry, University of Belgrade, Belgrade, Serbia

SUMMARY

Introduction Periodontitis is a destructive inflammatory disease of the tooth-supporting tissues, primarily caused by Gram-negative microorganisms. Thus, the primary objective of cause-related initial periodontal therapy is disruption and removal of the subgingival biofilm.

Objective The aim of this study was to evaluate the clinical and microbiological effects of the initial therapy in patients diagnosed with chronic periodontitis.

Methods Forty patients with chronic periodontitis were included in the study. As a part of the clinical assessment undertaken prior to the initial therapy, as well as one month and three months post-therapy, plaque index, gingival index, papilla bleeding index, probing pocket depth and clinical attachment level were recorded. Microbiological testing was performed prior to the initial therapy and three months after

therapy. Polymerase chain reaction assays were used to determine the presence of *Porphyromonas gingivalis*, *Tannerella forsythensis*, *Prevotella intermedia* and *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*.

Results All clinical parameters were significantly reduced after therapy. The prevalence of *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* was reduced by 22.5%, which was a statistically significant decrease compared to the baseline. The prevalence of *Porphyromonas gingivalis*, *Tannerella forsythensis* and *Prevotella intermedia* tended to decrease after therapy; however, the difference did not reach statistical significance.

Conclusion The results of the present study demonstrated the beneficial effects of the initial periodontal therapy on both the clinical and microbiological parameters.

Keywords: cause-related periodontal therapy; periodontitis; PCR; *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*; dental plaque

Примљен • Received: 23/07/2012

Прихваћен • Accepted: 09/12/2013

Balloon Valvuloplasty as a Treatment of Congenital Aortic Stenosis in Children and Adolescents

Vojislav Parezanović^{1,2}, Milan Djukić^{1,2}, Ingo Daehnert³, Ana Gligić², Igor Stefanović²,
Ida Jovanović^{1,2}, Tamara Ilić², Slobodan Ilić^{1,2}, Irena Vulićević², Jasna Kalanj²

¹Faculty of Medicine, University of Belgrade, Belgrade, Serbia;

²University Children's Hospital, Belgrade, Serbia;

³Herzzentrum, Leipzig, Germany

SUMMARY

Introduction Balloon valvuloplasty (BVP) is one of the primary therapies for congenital aortic stenosis in children and adolescents. The aim of this interventional procedure is to gain time before possible surgical therapy (aortic valve replacement) until adulthood.

Objective The aim of this study was to evaluate the efficacy, safety and mid-term results of transcatheter BVP in children and adolescent in our Center.

Methods From 2004 to 2011, 50 patients, aged 18 days to 18 years (mean 6.3 years) underwent BVP. Retrospective analysis of the echocardiographic and hemodynamic parameters were performed before and after procedure, especially peak pressure gradient (PG) across the aortic valve, semiquantification of the aortic regurgitation (AR) after the BVP as well as the left ventricle dimensions and functions.

Results The mean peak PG in the whole group decreased from 74.80 ± 27.72 mm Hg to 27.86 ± 13.04 mm Hg ($p < 0.001$) after BVP. In 39 patients (78%), residual PG was lower than 30 mm Hg just after dilation. At the end of follow-up period, 25 patients (50%) had PG above 50 mm Hg, measured by Doppler technique, and four of them underwent re-dilation. Eight patients (16%) had severe AR. During the follow-up period (12-80 months, mean 51 months), six patients (12%) were referred to cardiac surgeons for aortic valve replacement or Ross procedure.

Conclusions This retrospective study analyzes our first experience of BVP as primary therapy of the congenital aortic stenosis. The results confirmed that BVP effectively postponed the need for surgery in children and adolescents toward the adulthood.

Keywords: congenital aortic stenosis; balloon valvuloplasty; children

INTRODUCTION

Balloon valvuloplasty (BVP) is one of the therapeutic solutions in the initial treatment of the congenital aortic stenosis in children and adults [1-6]. This interventional procedure is alternative to surgical valvotomy (commissurotomy). Both procedures usually serve as the first step in treatment of infants and children with the aortic stenosis (AS), tending to postpone definite surgery (i.e. artificial valve replacement) until the adulthood [2, 5]. Although BVP is well-known and accepted method in treatment of AS, there are still controversies about advantages and disadvantages of BVP compared to the surgical valvotomy, regarding successfulness (residual stenosis), complications (i.e. aortic regurgitation) and long-term results. Distinctions between these two procedures were summarized in Table 1.

OBJECTIVE

The aim of this study was to evaluate the efficacy of BVP in children with a severe congenital aortic stenosis based on our own data, to analyze reliability of the method and frequency of serious complications as well as to estimate

long-term success of BVP based on freedom from surgery.

METHODS

Fifty children and adolescents with the congenital aortic stenosis, treated with BVP in the period between October 2004 and June 2011 at the University Children's Hospital in Belgrade, were included into retrospective analysis.

The major criteria for BVP procedure was the maximum pressure gradient (PG) measured across the aortic valve, achieved by echocardiography, and other criteria were the presence of heart failure, impaired systolic function of the left ventricle or increased myocardial hypertrophy and the presence of effort related symptoms.

All patients were examined by echocardiography at three different occasions: immediately prior to heart catheterization, the day after BVP and on the last check-up visit during follow-up. Concerning the amount of echocardiographic parameters, the following were analyzed for the purpose of study: left ventricular wall thickness and mass (end-diastolic and end-systolic), assessment of systolic function by fractional shortening (FS), dimensions of aortic annulus

Correspondence to:

Vojislav PAREZANOVIĆ
University Children's Hospital
Tiršova 10, 11000 Belgrade
Serbia
vparezan@gmail.com

Table 1. Advantages and disadvantages of balloon valvuloplasty compared with surgical valvotomy

Procedure	Advantages	Disadvantages
Balloon valvuloplasty	– avoidance of CPB – short hospitalization – avoidance of chest opening	– uncontrolled valvotomy (higher incidence of aortic regurgitation) – local complications (femoral artery thrombosis)
Surgical valvotomy	– valvotomy under visual control (lower incidence of aortic regurgitation)	– weaning from CPB (especially in newborns with the congestive heart failure) – higher residual stenosis

CPB – cardiopulmonary bypass

indexed to body surface, the maximum PG measured across the aortic valve, and the degree of aortic regurgitation assessed by semi-quantitative method.

Interventional catheterization was performed in all patients after detailed explanation of the procedure and obtaining the parental informed consent form. All patients were treated under general anesthesia, and previously were administered antibiotics according to recommended infective endocarditis prevention. Arterial access was obtained through the femoral artery (catheter was placed retrogradely through the stenotic valve into the left ventricle). The heparin was intravenously injected immediately after the puncture of femoral artery (in a single dose of 75-100 IU/kg), and continuous heparin infusion was extended in the next 18-24 hours (15-20 IU/kg/h).

Aortography and left ventriculography, conducted before the intervention, enabled adequate choice of the initial balloon catheter size. Thus, the appropriate initial balloon catheter size was 1-2 mm smaller than the diameter of the aortic valve annulus. In the majority of patients older than one year, during the balloon inflating, the fast right ventricle stimulation was performed with the frequency of 220-250 beats/min (through the temporary pacemaker wire which was inserted through the femoral vein), with the purpose to stabilize the balloon catheter. In case of an inadequate fall in PG recorded after the initial dilation, proce-

dure was repeated by using balloon catheter 1-2 mm larger than the first one. In this study, the following parameters achieved by catheterization were analyzed: diameter of the aortic valve annulus, annulus size to balloon catheter size ratio, PG between aorta and left ventricle measured by the direct manometry before and after BVP, as well as degree of the aortic regurgitation before and after the intervention.

For the purpose of determination of the safety of method, development of some of the following complications in patients before and immediately after the intervention was particularly analyzed: serious arrhythmia during the procedure, severe aortic regurgitation after BVP, need for blood transfusion or transfer to intensive care unit after the intervention or thrombosis of femoral artery.

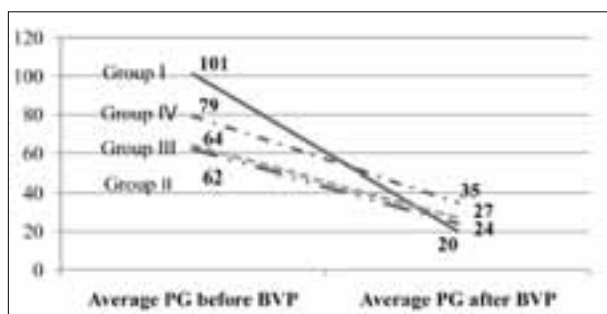
At the end of the follow-up period, degree of the residual aortic stenosis and aortic insufficiency were analyzed, as well as freedom from surgery (artificial valve implantation or Ross procedure), as parameters of efficacy of procedure. In patients who were referred to surgical intervention, period between BVP and operation, as well as factors that contributed to surgical intervention were analyzed.

Statistical analyses of data were performed by using the student's t-test and χ square-test. Furthermore, freedom from surgery result was achieved by Kaplan-Meier curve analysis. All data were analyzed using SPSS program (version 17.0).

Table 2. Demographic and diagnostic data of analyzed population

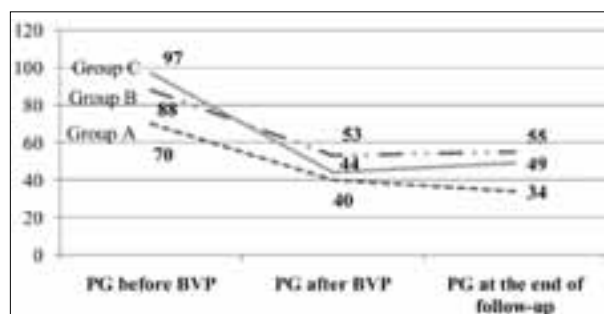
Parameter		Number of patients (%)		
Sex	Male	37 (74.0)		
	Female	13 (26.0)		
Age	0-3 months (Group I)	9 (18.0)		
	3-12 months (Group II)	8 (16.0)		
	1-10 years (Group III)	18 (36.0)		
	10-18 years (Group IV)	15 (30.0)		
Severity of the aortic stenosis before BVP (according to PG measured invasively during catheterization)	38-50 mmHg (Group A)	6 (12.0)		
	51-80 mmHg (Group B)	26 (52.0)		
	>80 mmHg (Group C)	18 (36.0)		
Severity of the residual aortic stenosis just after BVP (according to PG measured invasively during catheterization)	<30 mmHg	39 (78.0)		
	31-50 mmHg	8 (16.0)		
	>50 mmHg	3 (6.0)		
			Balloon/aortic annulus ratio (measured by ECHO)	
Severity of the aortic regurgitation at the end of follow-up compared to the balloon size	None (trivial)	19 (38.0)	0.90	NS
	Mild (grade I)	10 (20.0)	0.91	NS
	Moderate (grade I to II)	13 (26.0)	0.89	NS
	Significant (more than grade II)	8 (16.0)	0.87	NS

BVP – balloon valvuloplasty; PG – pressure gradient



Graph 1. Average peak pressure gradient (PG) among different age groups before and after balloon valvuloplasty (BVP), measured by catheterization

Group I: age 0-3 months; Group II: age 3-12 months; Group III: 1-10 years; Group IV: 10-18 years



Graph 2. Average peak pressure gradient (PG) among different groups according to severity of stenosis, measured before balloon valvuloplasty (BVP), just after procedure and at the end of follow-up period (by ECHO)

PG before procedure: Group A – 38-50 mmHg; Group B – 51-80 mmHg; Group C – >80 mmHg (according to catheterization measurements)

RESULTS

From October 2004 to June 2011, a total of 52 children and adolescents underwent BVP of the aortic valve at the University Children's Hospital (later on, two patients were lost during the follow-up). Among 50 patients, there were 37 boys (74.0%) and 13 girls (26.0%). At the time of intervention, the youngest patient was 18 days old, and the oldest 18 years old (mean age 6.3 years). Age distribution of patients was presented in Table 2.

Peak pressure gradient at the aortic valve, measured by echocardiography, was 44-143 mm Hg (mean 88.90 ± 20.65). Two neonates with the critical aortic stenosis had dilated left ventricle with diminished systolic function ($FS < 0.28$) and clinical signs of heart failure, while in all other patients, size and systolic function of the left ventricle were normal before BVP. Myocardial hypertrophy indexed to body surface was present in 36 patients (72.0%).

Peak pressure gradient at the aortic valve measured by direct manometry during catheterization ranged from 38 mm Hg to 145 mm Hg (mean 74.80 ± 27.72 mm Hg). Considering severity of obstruction, patients were categorized into three groups (Table 2). Most patients (44 of them or 88.0%) had relatively severe stenosis with peak PG across the aortic valve higher than 50 mm Hg, under sedation and general anesthesia.

Residual peak PG at the aortic valve measured by direct manometry at the end of procedure was from 7 to 68 mm Hg (mean 27.86 ± 13.04). Most patients (39 of them or 78.0%) had residual gradient less than 30 mm Hg (Table 2). The best results were achieved in the youngest group (infants below 3 months), while no significant differences were found among other age groups (Graph 1).

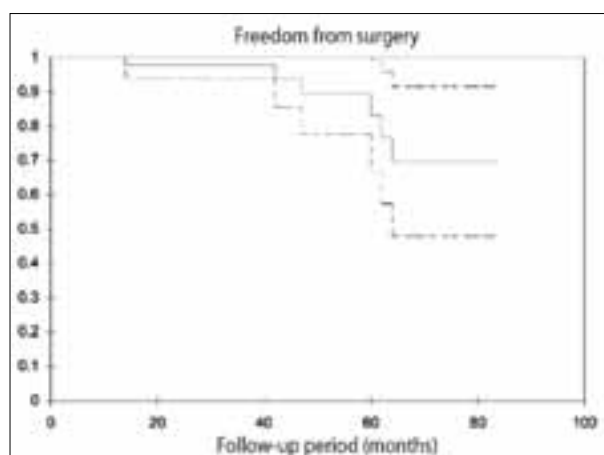
At the end of the follow up period, half of patients (25 of them or 50%) had peak residual PG more than 50 mm Hg. There was no significant difference among groups according to severity of stenosis before dilation (Graph 2). BVP was repeated in four patients with the highest residual PG (9 to 48 months after the first BVP, mean 24.75 months), and only one of them had high residual PG after the second intervention, which required surgical correction.

Degree of aortic regurgitation (AR) was estimated by echocardiography. The distribution of patients according

to severity of AR at the end of the follow up period (the last echocardiography examination) was shown in Table 2. More than a half of patients (29 of them or 58.0%) had trivial or mild AR, moderate AR was present in 13 patients (26.0%) and 8 patients (16.0%) had significant AR.

The number of patients with complications during or immediately after BVP was minor. Two patients (4.0%) had severe arrhythmias during procedure (only one required treatment, while another was spontaneously converted to the sinus rhythm), and two more patients (4.0%) required blood transfusion after the procedure. One patient (2.0%) had procedural complication (rupture of the guide wire), resolved during the same catheterization, and did not require surgical intervention. Due to hemodynamic instability, one newborn was transferred to the intensive care unit during the first 24 hours after the procedure, while all other patients were transferred back to the cardiology department after the procedure. None of the patients had complications at the site of the artery puncture (i.e. femoral artery thrombosis), and none of the patients had severe aortic regurgitation which required early surgical intervention.

At the end of follow-up period, which was 51 months on average (12-86 months), 44 patients (88.0%) had moderate residual stenosis and/or moderate aortic regurgitation,



Graph 3. Kaplan-Meier curve depicting freedom from surgery in study group of 50 patients with the congenital aortic stenosis after balloon valvuloplasty

Table 3. Data of patients requiring surgery during follow-up: age at BVP, PG measured by ECHO and catheterization before BVP, residual PG and AR at the last ECHO control, time between BVP and surgery and type of surgery

Patient	Age at BVP	PG ECHO	PG CATH	Residual PG ECHO	AR	Time to surgery (months)	Type of surgery
1	1 month	87	84	45	+3	64	Ross
2	6.5 years	90	65	38	+3	42	Ross
3	8.5 years	72	50	71	+2	60	AVR
4	16.5 years	77	58	69	+3	14	AVR
5	3 month	98	130	56	+3	62	Ross
6	10 years	104	74	66	+2	47	AVR

BVP – balloon valvuloplasty; PG – pressure gradient; AR – aortic regurgitation; ECHO – data obtained by echocardiography; CATH – measurement obtained by catheterization; Ross – Ross procedure; AVR – artificial valve replacement

without significant left ventricular hypertrophy or dilation, and without clinical symptomatology, so they have not been candidates for surgical intervention yet. Freedom from surgery was shown in Graph 3.

Six study patients (12.0%) were operated, three had Ross procedure and three had artificial aortic valve implantation (Table 3). Period from BVP to surgery in these patients varied from 14 to 64 months (mean 48.17 ± 18.92). Table 3 shows age of patients during initial BVP, period from BVP to surgery and main indication for surgery.

DISCUSSION

The initial treatment of congenital aortic stenosis in children can be either surgery (commissurotomy) or interventional catheterization procedure (BVP). Many studies in the last few decades compared safety and efficacy of these two methods and concluded that BVP had absolute advantage in newborns and young infants with heart failure because of avoidance of cardiopulmonary bypass, while in other children and adolescents the method of choice is up to experience of certain cardiology and cardiac surgery center [1, 2, 3, 5, 7, 8].

This study analyzed first seven years of experience of our institution with BVP of the aortic stenosis in children. Out of 50 patients one third was younger than one year, and 9 of them (18.0%) were younger than 3 months. Whenever clinical condition of a patient allowed, BVP was performed after the neonatal period, because of significantly higher incidence of complications reported (like femoral artery thrombosis or need for reintervention) in children younger than one month [6, 9]. Only in two patients BVP was done during the first month of life as emergency procedure because of severe systolic dysfunction of the left ventricle and heart failure.

The final criterion in decision-making for BVP was peak pressure gradient (PG) at the aortic valve above 60 mm Hg, while other criteria in decision-making for optimal time of the procedure were the clinical signs of heart failure, left ventricular dysfunction, myocardial hypertrophy and/or fatigue during exertion. Only one patient underwent BVP though PG was less than 50 mm Hg, but this patient was one of the most difficult patients in this study (a newborn with the critical aortic stenosis, severe left ventricular dysfunction, and falsely low PG).

It is well known that values of PG obtained by echocardiography are different from those obtained by direct manometry during cardiac catheterization for at least two reasons [2-5]. The first, PG obtained by cardiac catheterization is maximal pressure difference (so called “peak to peak” gradient) which does not occur simultaneously in real time cardiac cycle, while Doppler echocardiography measures the highest pressure difference in certain moment of time. The second reason is the fact that echocardiography measurements are obtained while the child is awake and more or less excited, while PG during the catheterization is obtained under the conditions of sedation and general anesthesia. In our study, peak echocardiography PG was slightly higher than that measured during cardiac catheterization (average 88.9 ± 20.65 vs. 74.80 ± 27.72 mm Hg, $p < 0.001$).

Though PG obtained by echocardiography is used in long term follow up because of simplicity and safety, for the estimation of immediate result and efficacy of BVP, we used residual PG obtained by direct manometry (catheterization), just after the intervention. Most of authors agree that good result after BVP is if residual PG is less than 30 mm Hg [2-6]. If the residual PG is higher (especially more than 40 mm Hg), the suggestion is to try dilation again with 1-2 mm larger balloon, if there is no significant aortic regurgitation after the first attempt. Using this criterion, we can say that in our study BVP was successful in 78.0% patients. At the remaining 11 patients, residual gradient was not optimal, though there was a significant fall in PG values comparing to the initial PG. We decided not to perform another BVP with larger balloon in these 11 patients, because of major aortic regurgitation or their young age. During the follow up period, BVP was performed again in 4 of these 11 patients, 9 to 48 months after the first interventional procedure (mean 24.75 months). Good results were achieved in 3 patients, while only one patient had to undergo surgery after the second BVP.

The results of our study are comparable with other studies regarding average PG, which was reduced from 74.80 ± 27.72 mm Hg to 27.86 ± 13.04 ($p < 0.001$). Efficacy of BVP, measured by degree of residual PG did not depend on patient's age, but on severity of stenosis before the intervention. In a large multicenter study from many German centers [6], an average value of peak PG in the studied group dropped from 65 ± 24 mm Hg to 26 ± 16 mm Hg (though in this study, out of 1004 patients 58.2% were

younger than one year). In another large study from Boston authors, which evaluated 563 patients with similar age distribution like in our study, 51% of patients had residual PG less than 30 mm Hg after BVP while 21% (108 patients) had residual PG greater than 40 mm Hg [4]. Author's opinion is that in newborns with the critical aortic stenosis and clinical signs of heart failure one should not strive for obtaining perfect result, but for reducing PG enough to achieve relief to the left ventricle without producing major aortic regurgitation.

Significant aortic regurgitation is the most common and most serious complication during BVP [1-9]. For this reason, procedure should be started with the balloon diameter 1-2 mm smaller than aortic annulus. Mild to moderate aortic regurgitation (AR) is usual after the uncontrolled splitting of the valve after dilation but generally is not significant hemodynamic problem in these patients. On the other hand, major aortic regurgitation is one of the most important reasons for surgery (artificial aortic valve implantation or Ross procedure) [10]. In our study, 8 patients (16) had significant AR and four of them had to be operated, while other four are still at regular follow up because they are without symptoms or significant hemodynamic consequences (i.e. left ventricular dilation or divergent blood pressure).

For many years it was believed that the degree of the aortic regurgitation after BVP was directly related to the size of the balloon, but many large studies rejected this correlation [4-6]. On the other hand, long term follow ups have shown that significant residual stenosis is a more frequent cause for early surgery than AR, and is also much poorly tolerated by patients than moderate AR (limited physical activity, inability for sport competition). So, the conclusion of these studies was that in case of borderline residual PG (between 30 and 40 mm Hg), it might be better to choose dilation with larger balloon diameter than leave such significant residual gradient unsolved [4, 5, 6]. One of the important factors that may contribute to the reduction of AR due to BVP is the stabilization of the balloon during the inflation, so some centers use temporary pacing in the majority of patients (except in young infants) [6]. The degree of AR also depends on patient's age, because it has been proven that adolescents have more severe AR before dilation than infants and small children, most probably because of valve degeneration [6]. Our study also failed to find correlation between the size of the balloon compared to aortic annulus and the degree of the aortic regurgitation (Table 2).

Other complications during BVP in this study were rare, two patients required blood transfusion, and one patient needed conversion of ventricular tachycardia. In our study, the safety of the procedure was confirmed by the fact that all patients but one were returned to the cardiology ward immediately after the procedure (intensive care was not necessary) and most of them was discharged the following day after the intervention. There were no patients with the occlusion of the cannulated femoral artery, due to the protocol by which all patients, apart from the bolus of heparin

during the intervention, received continuous infusion of heparin 18-24 hours after the procedure.

The main goal of this study was to estimate the efficacy of the procedure during the midterm follow up based on the freedom from surgery. The basic purpose of BVP in childhood is to postpone surgery as much as possible, either artificial valve implantation or complex Ross procedure. During the follow up period lasting from 12 to 86 months (average 51 ± 22.73 months), only 6 patients (12.0%) had to be operated on. Main reason for surgery in three patients was a significant aortic regurgitation, two had severe residual stenosis, and one had both severe stenosis and regurgitation. Surgery was performed within the period of 14-64 months after BVP (mean 48.17 ± 18.92), meaning that even in these children such interventional procedure delayed artificial valve implantation or Ross procedure for average 4 years. In other patients (44 of them or 88.0%), degree of residual aortic stenosis and/or regurgitation is mild to moderate, they have no symptoms, and therefore, at this point there are no definite indications for surgery.

Our results are in accordance with much larger world-wide studies. One of the largest studies conducted in 20 German, Austrian and Swiss centers analyzed 1004 children and adolescents who were submitted to BVP in 21-year period [6]. Freedom from surgery in this big cohort study was about 70% in 5 years after BVP, and about 50% in 10 years after the intervention. Similar results were published by Boston group of authors (563 patients for the period of 23 years) – freedom from artificial valve implantation was 90% in the first 5 years, and 79% in 10 years after BVP [4].

CONCLUSION

Initial experience of our center confirm that BVP of aortic valve is efficient and safe method in children and adolescents with the congenital aortic stenosis. Though in most cases this is not a final treatment, BVP enables normal physical activity of these patients and good effort tolerance, as well as a significant time delay towards the adulthood of the final surgical intervention.

Despite the fact that BVP is world widely accepted as reliable method of the congenital aortic stenosis treatment, there are still no exact criteria in decision making for optimal first step in treating these children. The choice between BVP and surgical commissurotomy remains the decision of each individual center, based on exchange of experiences and agreement among interventional cardiologists and cardiac surgeons.

The primary limitation of this study was a period of follow up, which is rather short, and secondary limitation is the fact that this was a retrospective study. In addition, in seven year follow up period, surgical commissurotomy was performed in only 7 patients in our center, so the results of these two methods cannot be compared.

REFERENCES

- Maskatia SA, Ing FF, Justino H, Crystal MA, Mullins CE, Mattamal RJ, et al. Twenty-five year experience with balloon aortic valvuloplasty for congenital aortic stenosis. *Am J Cardiol.* 2011; 108:1024-8.
- Kasten-Sportes CH, Piechaud JF, Sidi D, Kachaner J. Percutaneous balloon valvuloplasty in neonates with critical aortic stenosis. *J Am Coll Cardiol.* 1989; 13:1101-5.
- Zain Z, Peads M, Zadine M, Menahem S, Brizard C. Neonatal isolated critical aortic valve stenosis: balloon valvuloplasty or surgical valvotomy. *Heart Lung Circ.* 2006; 15:18-23.
- Brown DW, Dipilato AE, Chong EC, Lock JE, McElhinney DB. Aortic valve reinterventions after balloon aortic valvuloplasty for congenital aortic stenosis. *J Am Coll Cardiol.* 2010; 56(21):1740-9.
- Holzer RJ, Cheatham JP. Shifting the balance between aortic insufficiency and residual gradients after balloon aortic valvuloplasty. *J Am Coll Cardiol.* 2010; 56(21):1750-1.
- Ewert P, Bertram H, Breuer J, Dahnert I, Dittich S, Eicken A, et al. Balloon valvuloplasty in the treatment of congenital aortic valve stenosis – a retrospective multicenter survey of more than 1000 patients. *Int J Card.* 2011; 149:182-5.
- Jindal RC, Saxena A, Juneja R, Kothari SS, Shrivatsava S. Long-term results of balloon aortic valvulotomy for congenital aortic stenosis in children and adolescents. *J Heart Valv Dis.* 2000; 9(5):623-8.
- Pedra CA, Sidhu R, McCrindle BW. Outcomes after balloon dilation of congenital aortic stenosis in children and adolescents. *Cardiol Young.* 2004; 14(3):315-21.
- Kachaner J, Worms AM, Bourlon F, De Geeter B, Rey C. Percutaneous valvotomy of aortic valve stenosis in children. *Arch Mal Coeur Vaiss.* 1996; 89(5):525-31.
- Elder RW, Quaegebeur JM, Bacha EA, Chen JM, Bourlon F, Williams IA. Outcomes of the infant Ross procedure for congenital aortic stenosis followed into adolescence. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 2013; 145(6):1504-11.

Балон-валвулопластика у лечењу конгениталне аортне стенозе код деце и адолесцената

Војислав Парезановић^{1,2}, Милан Ђукић^{1,2}, Инго Денерт³, Ана Глигић², Игор Стефановић², Ида Јовановић^{1,2}, Тамара Илисић², Слободан Илић^{1,2}, Ирена Вулићевић², Јасна Калањ²

¹Медицински факултет, Универзитет у Београду, Београд, Србија;

²Универзитетска дечја клиника, Београд, Србија;

³Центар за кардиохирургију, Лајпциг, Немачка

КРАТАК САДРЖАЈ

Увод Балон-валвулопластика (БВП) је једна од примарних терапијских опција код деце и адолесцената с конгениталном аортном стенозом. Њена улога је у растерећењу леве коморе срца и одлагању уградње вештачке валвуле до одраслог доба.

Циљ рада Циљ рада је био да се ретроспективно анализирају делотворност и сигурност БВП код деце и адолесцената с конгениталном аортном стенозом који су лечени у нашем центру.

Методе рада У раду је анализирано 50 болесника узраста од 18 дана до 18 година (просечно 6,3 године) код којих је у периоду 2004–2011. године урађена БВП на Универзитетској дечјој клиници у Београду. Код свих болесника анализирани су параметри добијени ехокардиографијом и катетеризацијом пре и после БВП, првенствено максимални градијент притиска (ГП) на аортној валвули, степен аортне регургитације (АР) после интервенције и величина и функција леве коморе.

Резултати Просечна вредност ГП после БВП смањена је са $74,80 \pm 27,72$ mm Hg на $27,86 \pm 13,04$ mm Hg ($p < 0,001$). Код 39 болесника (78%) резидуални ГП је непосредно после дилатације био испод 30 mm Hg. На крају испитивања 25 болесника (50%) имало је ехокардиографски ПГ већи од 50 mm Hg, а код четворо њих била је потребна поновна интервенција. Осам болесника (16%) имало је релативно значајну АР. На крају периода испитивања, који је просечно трајао 51 месец (12–86 месеци), шест болесника (12%) је подвргнуто хируршком лечењу (уградња вештачке валвуле или операција према методи Роса).

Закључак Почетна искуства нашег центра потврђују да је БВП аорте ефикасна и сигурна метода у лечењу деце и адолесцената с конгениталном аортном стенозом, која им омогућава значајан период одлагања коначне хируршке корекције до одраслог доба.

Кључне речи: конгенитална аортна стеноза; балон-валвулопластика; деца

Примљен • Received: 17/01/2013

Прихваћен • Accepted: 17/04/2013

Changing Trends in Incidence of Lung Cancer by Histological Type in Montenegro

Milić Medenica¹, Miraš Medenica², Olivera Bojović¹, Ivan Soldatović³, Ivana Durutović⁴

¹Special Hospital for Lung Diseases, Brezovik, Montenegro;

²Student of Medicine at the University of St Andrews, St Andrews, Fife, UK;

³Institute for Medical Statistics and Informatics, Faculty of Medicine, University of Belgrade, Serbia;

⁴Oncological Clinic, Clinical Center of Montenegro, Podgorica, Montenegro

SUMMARY

Introduction Lung cancer is one of the most common malignant neoplasms, as well as the most common cause of death cancer. Most lung cancers are squamous cell carcinomas, small cell carcinomas or adenocarcinomas.

Objective Examining changes in trends of lung cancer incidence in Montenegro by histological type during a 15-year period, from 1997 to 2011.

Methods During the study period, histopathological confirmation was obtained for all primary lung cancer cases in the only hospital for lung diseases in the country. Based on the data from medical records, patients were classified by time period, sex, age groups and smoking history. Descriptive method was used.

Results Ratio between incidences of adenocarcinoma and squamous cell carcinoma changes in males, with a significant increase in the incidence rate of adenocarcinoma and drop in the rate of squamous cell carcinoma ($p < 0.001$). In addition, statistically significant ($p < 0.05$) decrease in the incidence of NSCLC (non-small cell lung cancer) and an increase in the incidence of SCLC (small cell lung cancer) was found. A statistically significant increase in linear trend in the incidence of small cell carcinoma was noted in females ($p < 0.005$).

Conclusion Incidence rates of adenocarcinoma and small cell carcinoma have increased during the study period.

Keywords: cancer; histological types; trends

INTRODUCTION

Cancer is the second leading cause of death in economically developed countries [1]. Its global health burden is increasing due to aging and growth of the world population which is catalyzed by behaviors that represent a risk factor of cancer development. GLOBOCAN 2008 estimated that about 12.7 million cancer cases and 7.6 million cancer deaths occurred in 2008 [2]. Fifty-six percent of these cases and 64% of deaths took place in the economically developed countries [1, 2, 3]. Lung cancer incidence differs by geographic area, sex and age, being less common in developing countries, especially in Africa and South America [4]. Leaving apart the skin, lung is the most commonly affected organ by cancer in men; it comprises 17% of the total new cancer cases, and it accounts for 23% of the total cancer deaths [2]. The epidemic of lung cancer among women came after that among men, with rates rising steeply from the 1960s to the present [5, 6].

Breast carcinoma is the most commonly diagnosed type of cancer and the leading cause of cancer-related death among women, comprising 23% of the total cancer cases and 14% of the cancer deaths. Colorectal cancer is the second most frequently diagnosed cancer in women, while it is the third most frequently diagnosed cancer in men. Prostate cancer is the second most commonly diagnosed cancer and it is the

sixth leading cause of cancer-related death in men [2].

Lung cancer is classified into two subgroups: small-cell lung cancer (SCLC) and non small-cell lung cancer (NSCLC). Histological identification and tumor staging are immensely important in achieving optimal management of lung cancer. In the initial decades of the 20th century when the smoking-caused epidemic of lung cancer occurred, squamous cell carcinoma was the most frequent type of lung cancer that was observed in the population at risk, while the next most frequent type was small cell carcinoma [4].

Trends in incidence have varied by type in relation to exposures to other lung carcinogens and differences in smoking patterns [5-8].

OBJECTIVE

This study aims at examining the trends in incidence of lung cancer by histological types in Montenegro from 1997 to 2011.

METHODS

Study group comprised patients with the histopathological confirmation of primary lung cancer who were hospitalized in the Special Hospital for Lung Diseases "Brezovik" from

Correspondence to:

Milić MEDENICA
Special Hospital for Lung Diseases
Brezovik
Montenegro
miras.medenica@gmail.com

Table 1. Number of new cases, crude and standardized incidence rates per 100,000 population in Montenegro in the period from 1997 to 2011

Year	Male			Female			All		
	Cases	Crude rate	Standard rate*	Cases	Crude rate	Standard rate*	Cases	Crude rate	Standard rate*
1997	151	49.5	35.7	22	6.9	4.5	173	27.9	18.6
1998	152	49.8	35.7	24	7.6	4.6	176	28.3	18.6
1999	166	54.3	38.8	27	8.5	5.7	193	31.1	20.5
2000	134	41.1	31.7	34	10.3	6.2	168	25.6	17.1
2001	139	42.4	35.2	28	8.4	5.9	167	25.3	19.1
2002	167	54.7	44.0	33	10.5	7.0	200	32.8	24.4
2003	149	48.8	37.4	27	8.6	5.8	176	28.4	20.6
2004	150	49.0	38.6	42	13.3	9.8	192	30.9	22.9
2005	160	52.1	38.6	38	12.0	7.2	198	31.7	21.4
2006	137	44.6	31.9	33	10.4	6.6	170	27.2	17.9
2007	149	48.4	34.2	40	12.5	7.3	189	30.1	19.3
2008	138	44.6	31.8	37	11.6	7.8	175	27.8	18.5
2009	143	46.0	32.5	35	10.9	7.0	178	28.2	18.6
2010	127	41.4	27.9	39	9.2	5.8	156	25.1	15.9
2011	132	43.1	28.8	31	9.8	5.7	163	26.2	16.0
Average	146	41.6	34.8	32	10.0	6.4	178	28.4	19.2

* Segi's world population used as a standard.

1997 to 2011. Montenegro has one hospital for lung diseases, so all medical data concerning this study have been found there. Based on the data from medical records, patients were classified by the following characteristics: time period, sex, age group and smoking status. Ex-smokers were included in the group of smokers. Descriptive epidemiological method was used. Montenegro had a population of 620,145 in 1993 and 625,266 in 2011.

There were 1,000 more males than females. Registry personnel extracted information from the medical records department and pathological laboratory. All lung cancer patients were residents of Montenegro. Data that were extracted for each case included gender, histological subtype of cancer, age when diagnosis was established and date of diagnosis. Cases were grouped into the following histological subtypes based on morphological characteristics of the tumor: squamous cell carcinoma, adenocarcinoma, and other carcinomas including small cell and large cell carcinoma. Incidence rates were reported separately for males and females. Incidence rates were age- and sex-standardized by direct method based on the Segi's world population (from 0 to 44, from 45 to 54, from 55 to 64 years and people that are 65 years of age and older) [9].

Rates were calculated for both sexes separately for squamous cell carcinoma, adenocarcinoma and small cell carcinoma.

The linear regression was performed in the analysis of the incidence trends.

RESULTS

During the study period, two types of lung cancer were established in patients, SCLC (24%) and NSCLC (76%). Two most important types of NSCLC-squamous cell carcinoma and adenocarcinoma, accounted for approximately 78% and 22% of all NSCLC cases, respectively.

In the period 1997–2011, a total of 2,675 new lung cancer cases were diagnosed (2,194 males and 481 females). The most frequent histopathological type in males was

squamous cell carcinoma (62.6%) followed by SCLC (22.6%), and then adenocarcinoma (14.8). In women, the most common type of cancer was squamous cell carcinoma (43.6%), followed by SCLC (29.8%) and adenocarcinoma (26.6%) and SCLC (29.8%).

Average crude incidence rate in the population was 28.4 per 100,000 p/y. The incidence peaked in 2002 (32.8 per 100,000 p/y) and thereafter the rates began to fall. Standardized incidence rates ranged from 15.9 per 100,000 p/y in 2010 to 24.4 per 100,000 p/y in 2002.

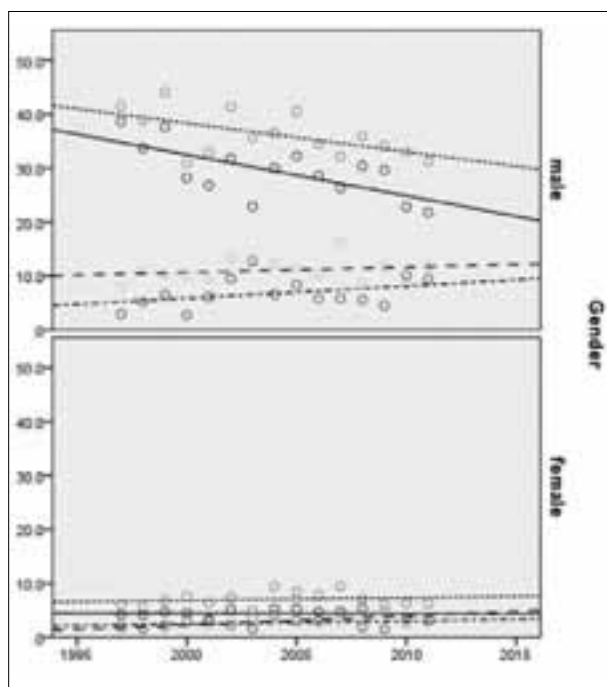
Average crude incidence rate in males was 41.6 per 100,000 p/y with its peak in 2002 (54.7 per 100,000 p/y). Standardized incidence rates in males ranged from 27.9 (2010) to 44 (2002) per 100,000 p/y and average standardized incidence rate was 34.8 per 100,000 p/y.

Average crude incidence rate in females was 10.0 per 100,000 p/y. Standardized incidence rates in the female population ranged between 4.5 (1997) and 9.8 (2004) per 100,000 p/y. Average standardized incidence rate was 6.4 per 100,000 p/y (Table 1).

Ratio between males and females was 5:1 in 1997 and fell to 4.5:1 in 2011.

In males, linear trend shows a significant decrease in the incidence ($p < 0.01$) ($SQL = 1552.46 - 0.760 \cdot \text{Year}$; $R^2 = 0.466$; $t = -3.365$; $p = 0.005$) of squamous cell carcinoma. Incidence rate was the highest in 1997, at 38.6 per 100,000 p/y and thereafter began to fall (Graph 1). In 2011, the incidence of squamous cell carcinoma was 21.8 per 100,000 p/y. In females, incidence of squamous cell carcinoma ranged from 4.1 in 1997 to 5.3 per 100,000 p/y in 2003 and 2004. In 2011, the incidence was 3.1 per 100,000 p/y. During the study period, change in linear trend was not statistically significant ($p > 0.05$) ($SQL = 17.250 - 0.006 \cdot \text{Year}$; $R^2 = 0.001$; $t = -0.132$; $p = 0.897$) (Graph 1).

In males and females, linear trend shows an increase in the incidences of adenocarcinoma, but it is not significant ($p > 0.05$) (Males: $ADL = -447.705 + 0.227 \cdot \text{Year}$; $R^2 = 0.135$; $t = 1.426$; $p = 0.178$) (Females: $ADL = -108.282 + 0.055 \cdot \text{Year}$; $R^2 = 0.065$; $t = 0.953$; $p = 0.358$) (Graph 1). In males, the incidence of adenocarcinoma ranged from 2.9 per 100,000 p/y

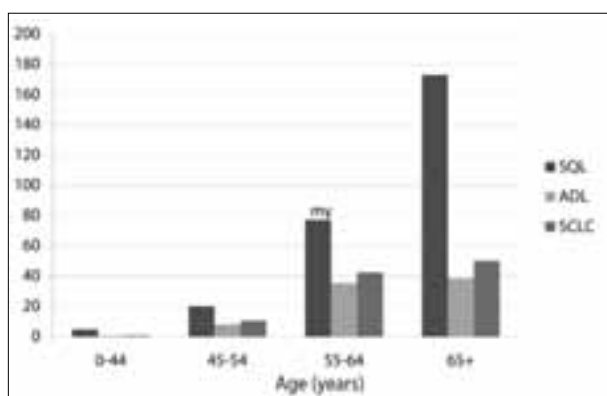


Graph 1. Linear trend in the incidence rates per 100,000 p/y for males and females of SQL, ADL and SCLC in the period from 1997 to 2011

(...) – non small cell carcinoma (NSCLC)
 (---) – small cell lung carcinoma (SCLC)
 (—) – squamous cell carcinoma of lung (SQL)
 (---) – adenocarcinoma of lung (ADL)

in 1997 to 12.7 in 2003. In 2011, the incidence rate was 9.4 per 100,000 p/y. In females, in 2001 adenocarcinoma was the most predominant histological type of lung carcinoma (3.3 per 100,000 p/y; ratio SQL:ADL=0.9). Incidence rates ranged from 1.9 in 1997 to 4.7 in 2007.

Incidence of small cell carcinoma in males has increased, but not significantly ($p>0.05$) (linear trend: $SCLC = -192.230 + 0.101 \cdot \text{Year}$; $R^2=0.042$; $t=-0.759$; $p=0.462$). Incidence of small cell carcinoma ranged from 7.8 per 100,000 p/y in 1997 to 11.7 per 100,000 p/y in 2011, peaking in 2007 (16.2 per 100,000 p/y). In females, linear trend shows a significant increase of small cell carcinoma ($p<0.005$) ($SCLC = -336.322 + 0.169 \cdot \text{Year}$; $R^2=0.540$; $t=3.909$; $p=0.002$) (Graph 1). Incidence of small cell carcinoma ranged from 0.9 per 100,000 p/y in 1997 to 3.5 per 100,000 p/y in 2011, peaking in 2009 (4.6 per 100,000 p/y).



Graph 2. Average age-standardized incidence rates for males in the period from 1997 to 2011

During the study period, ratio between the incidences of adenocarcinoma and squamous cell carcinoma changed in males, with a significant increase in the incidence rate of adenocarcinoma and a drop in the rate of squamous cell carcinoma ($p<0.001$) ($t=-3.5721$) (Graph 1). Ratio between the incidences of squamous cell carcinoma and adenocarcinoma in males varied from 13.0 in 1997 to 2.3 in 2011.

Linear trends of squamous cell carcinoma and adenocarcinoma did not show a significant difference in females ($p>0.05$) ($t=-0.8146$) (Graph 1). Ratio between the incidences of squamous cell carcinoma and adenocarcinoma ranged from 2.1 in 1997 to 1.0 in 2011.

During the study period ratio between the incidences of NSCLC and SCLC changed in males, with a significant decrease in the incidence rate of NSCLC and an increasing drop in the rate of SCLC ($p<0.05$) (linear trend: $NSCC = 1104.755 - 0.533 \cdot \text{Year}$; $R^2=0.572$; $t=-2.517$; $p=0.026$) ($SCLC = -192.230 + 0.101 \cdot \text{Year}$; $R^2=0.206$; $t=0.759$; $p=0.462$; $t=-2.533$) (Graph 1). During the study period ratio NSCLC / SCLC in males ranged from 5.0 in 1997 to 2.6 in 2011.

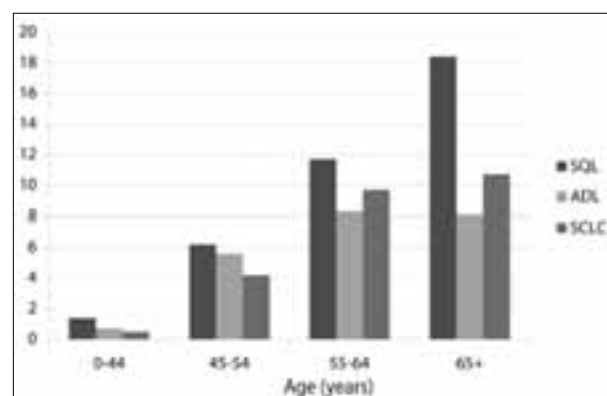
It was found that difference between trends of NSCLC and SCLC in females was not statistically significant ($p>0.05$) (linear trend: $NSCC = -91.033 + 0.049 \cdot \text{Year}$; $R^2=0.028$; $t=0.613$; $p=0.550$; $SCLC = -336.322 + 0.169 \cdot \text{Year}$; $R^2=0.735$; $t=3.909$; $p=0.002$; $t=-1.325$) (Graph 1). Ratio between the incidence rates of NSCLC* and SCLC* changed from 6.6 in 1997 to 1.1 in 2003 and 1.8 in 2011.

Age-standardized incidence rates rose steeply for people aged 45 to 54, peaking in the oldest age group (Graphs 2 and 3). In men, lung cancer was most frequently diagnosed in the group 65+ years (51%, 1,128 persons), followed by 55-64 (34.5%, 756 persons) and 45-54 (11.6%, 225 persons).

In females, lung cancer was also most frequently diagnosed in the group 65+ years (41%, 197 persons), followed by 55-64 (38%, 185 persons) and 45-54 (17%, 84 persons).

The smokers to nonsmokers ratios in both males and females were high for squamous cell carcinoma (9.1:1; 3:1) ($p<0.001$) and SCLC (15.5:1; 8:1) ($p<0.001$). For adenocarcinoma, these ratios were 5.6:1 and 1.5:1 ($p<0.05$) in males and females, respectively.

In Montenegro, the incidence of lung cancer ranged from 27.9 per 100,000 per year (p/y) in 1997 to 26.2 per 100,000 p/y in 2011. The rate peaked at 32.8 per 100,000 p/y in 2002. Average number of new cases per year was 178.



Graph 3. Average age-standardized incidence rates for females in the period from 1997 to 2011

DISCUSSION

In a number of developed countries, histological characteristics of lung cancer have changed in the past few decades so that the frequency of adenocarcinoma has risen while squamous cell carcinoma has become less frequent [8, 10]. Small cell carcinoma rates decreased less rapidly [5]. In Europe, squamous cell carcinoma remains the most predominant cell type of lung cancer but substantial increase in the adenocarcinoma frequency has occurred over time [10].

During the study period, lung cancer was the most commonly diagnosed cancer in men in Montenegro. The incidence of lung cancer has continued to fall in men from 54.7 per 100,000 p/y in 2002 to 43.1 per 100,000 p/y in 2011. The most frequent type of cancer in Montenegrin women was breast cancer. Estimated incidence of breast cancer in 2012 was 75.9/100,000 p/y [11].

Incidence range of lung cancer in women was between 6.9 per 100,000 p/y in 1997 and 12.5 per 100,000 p/y in 2007 and 9.8 per 100,000 p/y in 2011 (Table 1). In course of the study period, the histological types of lung cancer have also changed. These changes, as presented in the Results, are consistent with the results published by Devessa et al. [5] in 2005.

The increase in incidence of adenocarcinoma is not likely explained by changes brought about in classification system of lung cancer. As found by Campobasso et al. [12], the largest changes resulted from the reclassification of many large cell carcinomas to adenocarcinomas. Poorly differentiated adenocarcinomas and large cell carcinomas may overlap. The accuracy of histological diagnosis is dependent on the specimen size received by a pathologist. The introduction of flexible bronchoscope resulted in the increased use of sputum cytology [13] and fine-needle aspiration biopsy [14], and all have resulted in smaller biopsies. These diagnostic tools may have resulted in an increase in the number of positive diagnoses of lung cancer, while sacrificing accurate histological typing.

Approximately 85% of all cases of lung cancer occur in people that are smoking, or smoked at some point in their lives. A predominant cause of lung cancer is exposure to tobacco smoke, with active smoking being the biggest contributor, while passive smoking is also an identified contributor to the lung cancer burden. Cigarette smoking is identified as the major cause of all histological types of lung cancer. The risk of developing lung cancer is related to the following factors: number of cigarettes smoked, age at which the individual started smoking and duration of smoking [15]. Between exposure to tobacco smoke and development of lung cancer there is normally a long latent period. The relative risk of dying from cancer in smokers is 11-20 times higher than in nonsmokers [16].

Our results are consistent with results of Freedman's et al. study, where the strongest association with cigarette smoking has been demonstrated for squamous cell carcinoma and small cell carcinoma, whilst adenocarcinoma has not been as strongly correlated to smoking [17]. Rates

of all lung cancer types among women and adenocarcinoma among men have continued to rise in the past few decades in spite of declining cigarette use in many Western countries and shift to filtered/low-tar cigarettes [5]. Changes in cigarette design could have changed the location and histological distribution of lung cancers [18, 19, 20]. Rise in the incidence of adenocarcinoma has been mainly due to the dissemination of low-tar filter cigarettes which enabled the smoke to be inhaled deeper in the respiratory tract compared to earlier unfiltered cigarettes and release of higher concentrations of tobacco-specific carcinogens [21, 22]. Skuladottir et al. hypothesized that filter cigarettes remove large particles in cigarette smoke, thus reducing the deposition of these particles in the central airway where squamous cell carcinoma occurs, therefore exposing the peripheral part of the lung to carcinogenic smoke where adenocarcinoma develops more frequently [23].

There is a question if an increase of adenocarcinoma incidence in Montenegro could be explained only by changes in cigarette design though a shift to filtered and low-tar cigarettes was not much apparent in the last few decades; it took place over a period of 4-5 decades, what is still relevant for considering exposure. There would still be a remote theoretical possibility that changes in the incidence of histological types of lung cancers may indicate changes in the exposure to causal factors.

Factors such as occupational exposures to asbestos, radon and nitrogen oxide have been found to increase the risk of lung cancer [24, 25]. The most common type of lung cancer seen in asbestos and "scar"-related cancers is adenocarcinoma [24].

Out of the total number of lung cancers in the US, proportion of SCLC decreased from 17.26% in 1986 to 12.95% in 2002 [26, 27]. This decrease in incidence can most probably be explained by successful anti-smoking campaign that took place. However, in Montenegro, the incidence of SCLC has increased during the study period; it may most likely be explained by limited success of anti-smoking campaign in this country which began only in the previous decade. Furthermore, in this study, the association between cigarette smoking and histological type of lung cancer was different. In the smoking population, the most frequent histological type of lung cancers are small cell carcinomas and squamous cell carcinomas. SCLC mostly affects smokers and ex-smokers [27, 28]. Correlation between SCLC and smoking is very strong as it affects mostly patients with a clear smoking history.

Lung cancer is strongly related to age. In Montenegro, the peak incidence of all types of lung cancer in males and in females was in the seventh decade (Graphs 2 and 3).

CONCLUSION

During the study period, the incidence rates of adenocarcinoma and small cell carcinoma have increased over time but squamous cell carcinoma remains the predominant type of lung cancer in Montenegro.

REFERENCES

- Jemal A, Center MM, DeSantos C, Ward EM. Global patterns incidence and mortality rates and trends. *Cancer Epidemiol Biomarkers*. 2010; 19:1887-93.
- Ferlay J, Shin HR, Bray F, Forman D, Mathers CD, Parkin D. GLOBOCAN 2008, Cancer Incidence and Mortality Worldwide; IARC CancerBase No. 10. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer; 2010.
- Landis SH, Murray T, Bolden S, Wingo PA. Cancer statistic, 1998. *CA Cancer J Clin*. 1998; 48:6-29.
- Sobue T, Ajiki W, Tsukuma H, Oshima A, Hanai A, Fujimoto I. Trends of lung cancer incidence by histologic type: a population-based study in Osaka, Japan. *Jpn J Cancer Res*. 1999; 90:6-15.
- Devesa SS, Bray F, Vizaciano AP, Parkin DM. International lung cancer trends by histologic type: male: female differences diminishing and adenocarcinoma rates rising. *Int J Cancer*. 2005; 117(2):294-9.
- Alberg AJ, Ford JG, Samet JM; American College of Chest Physicians. Epidemiology of lung cancer: ACCP evidence-based clinical practice guidelines (2nd edition). *Chest*. 2007; 132(3 Suppl):295-555.
- Hansen HH. Diagnosis in metastatic sites. In: Strauss MJ, editor. *Lung Cancer: Clinical Diagnosis and Treatment*. 2nd ed. Philadelphia, PA: Grune ana Stratton; 1983. p.185-200.
- Charloux A, Quoix E, Wolkove N, Small D, Pauli G, Kreisman H. The increasing incidence of lung adenocarcinoma: reality or artifact? *A Int J Epidemiol*. 1997; 26:14-23.
- Boyle P, Parkin DM. Statistical methods for registries. In: Jensen OM, Parkin DM, Maclennan R, Muir CS, Skeet RC, editors. *Cancer Registration Principles and Methods*. Lyon: IARC; 1991. p.126-58.
- Alberg AJ, Samet JM. Epidemiology of lung cancer. *Chest*. 2003;123(1 Suppl):215-495.
- Ferlay J, Steliarova-Foucher E, Lortet-Tieulent J, Rooso S, Coebergh JWW, Comber H, et al. Cancer incidence and mortality patterns in Europe: estimates for 40 countries in 2012. *Eur J Cancer*. 2013; 49:1374-403.
- Campobasso O, Andron A, Ribotta M, Ronco G. The value of the 1981 WHO histological classification in inter-observer reproducibility and changing pattern of lung cancer. *Int J Cancer*. 1993; 53:205-8.
- Martinez-Moragon E, Aparicio-Urtasun J, Sanchis-Aldas J, de Diego-Damia A, Martinez-Fraces M, Cases Viedma E, et al. Fiber bronchoscopy in lung cancer: relationship between radiology, endoscopy, histology and diagnostic value in a series of 1801 cases. *Arch Bronchopneumol*. 1994; 30:291-6.
- Westcott JL, Rao N, Colley DP. Transthoracic needle biopsy of small pulmonary nodules. *Radiology*. 1997; 202:97-103.
- American Thoracic Society Statement. Cigarette smoking and health. *Am J Respir Crit Care Med*. 1996; 153:861-5.
- Doll R, Peto R, Borehem J, Sutherland I. Mortality from cancer in relation to smoking: 50 years observations on British doctors. *Br J Cancer*. 2005; 92:426-9.
- Freedman ND, Leitzmann MF, Hollenbeck AR, Schatzkin A, Abnet CC. Cigarette smoking and the subsequent risk of lung carcinoma in the men and women of a large prospective cohort study. *Lancet Oncol*. 2008; 9:649-56.
- Chen F, Bina F W, Cole P. Declining incidence rate of lung adenocarcinoma in the United States. *Chest*. 2007; 131:1000-5.
- Thun MJ, Lally CA, Flannery JT, Calle EE, Flanders WD, Heath CW Jr. Cigarette smoking and changes in the histopathology of lung cancer. *J Natl Cancer Inst*. 1997; 89:1580-6.
- Wen W, Shu XO, Gao YT, Yang G, Li Q, Li H, et al. Environmental tobacco smoke exposure and mortality in Chinese women who have never smoked: prospective cohort study. *BMJ*. 2006; 333:376.
- Burns MD, Anderson CM. Do changes in cigarette design influence the rise in adenocarcinoma of the lung? *Cancer Causes Control*. 2011; 22:13-22.
- Stellman SD, Muscat JE, Thompson S. Risk of squamous cell carcinoma and adenocarcinoma of the lung in relation to lifetime filter cigarette smoking. *Cancer*. 1997; 80:382-8.
- Skuladottir H, Olsen JH, Hirsch FR. Incidence of lung cancer in Denmark: historical and actual status. *Lung Cancer*. 2007; 27:107-18.
- Lidell FD. The interaction of asbestos and smoking in lung cancer. *Ann Occup Hyg*. 2001; 45:341-56.
- Chen F, Jackson H, Bina F. Lung adenocarcinoma incidence rates and their relation to motor vehicle density. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2009; 18:760-4.
- Travis WD, Travis LB, Devesa SS. Lung cancer. *Cancer*. 1995; 75:191-202.
- Ettinger DS. Changing face of small-cell lung cancer. *J Clin Oncol*. 2006; 24:4526-7.
- Govindan R, Page N, Morgensztern D. Changing in epidemiology of small-cell lung cancer in the United States over the last 30 years: analysis of the surveillance, epidemiologic, and end results database. *J Clin Oncol*. 2006; 24:4539-44.

Патохистолошки трендови промене инциденција карцинома плућа у Црној Гори

Милић Меденица¹, Мираш Меденица², Оливера Бојовић¹, Иван Солдатовић³, Ивана Дурутовић⁴

¹ЈЗУ Специјална болница за плућне болести, Брезовик, Црна Гора;

²Студент медицине на Универзитету Сент Ендрјуз, Сент Ендрјуз, Велика Британија;

³Институт за медицинску статистику и информатику, Медицински факултет, Универзитет у Београду, Београд, Србија;

⁴Онколошка клиника, Клинички центар Црне Горе, Подгорица, Црна Гора

КРАТАК САДРЖАЈ

Увод Карцином плућа је једна од најчешћих неоплазми и истовремено најчешћи узрочник смрти од свих малигних болести. Највећи део карцинома плућа се патохистолошки класификује у сквамозелуларни карцином, микроцелуларни (ситноћелијски) карцином и аденокарцином.

Циљ рада Циљ истраживања је био да се проучи тренд промена инциденција карцинома плућа према патохистолошком типу током петнаестогодишњег периода (1997–2011) у Црној Гори.

Методе рада Током трајања студије патохистолошка потврда за све примарне карциноме плућа добијена је из једине болнице за плућне болести у држави. На основу података из медицинске документације, болесници су класификовани према временском периоду, полу, старосним групама и пушачкој историји. У овој студији је коришћена дескриптивна метода.

Резултати Код мушкараца се однос инциденција у оболевању од аденокарцинома и сквамозелуларног карцинома мења, тако да је у посматраном периоду забележен значајни тренд пораста инциденције аденокарцинома, а смањења инциденције сквамозелуларног карцинома ($p < 0,001$). Такође, уочено је статистички значајно ($p < 0,05$) смањење инциденције ситноћелијског карцинома и пораст инциденције ситноћелијског карцинома. Код жена је забележено статистички значајно повећање линеарног тренда инциденције ситноћелијског карцинома ($p < 0,05$).

Закључак Према је током трајања студије уочено повећање стопа инциденција аденокарцинома и ситноћелијског карцинома, сквамозелуларни карцином ипак остаје најчешћи вид плућног карцинома у Црној Гори.

Кључне речи: карцином; хистолошки типови; трендови

Примљен • Received: 31/08/2012

Ревизија • Revision: 08/11/2013

Прихваћен • Accepted: 15/01/2014

Поређење биохуморалних и морфолошких параметара код акутног панкреатитиса

Томислав Тасић¹, Саша Гргов¹, Александар Нагорни², Данијела Бенедето-Стојанов²

¹Одељење за гастроентерологију и хепатологију, Општа болница, Лесковац, Србија;

²Клиника за гастроентерологију и хепатологију, Клинички центар, Ниш, Србија

КРАТАК САДРЖАЈ

Увод Акутни панкреатитис настаје аутодигестивном активацијом панкреасних проензима унутар паренхима жлезде.

Циљ рада Циљ рада је био да се утврде повезаност етиологије и тежине акутног панкреатитиса и биохуморалних параметара, ултразвук и налаза компјутеризоване томографије (СТ).

Методе рада Студијом су обухваћена 273 болесника с панкреатитисом, који је класификован према Рансоновом скору, степену тежине и пореклу, чији су биохуморални параметри упоређени међусобно и с ултразвучним и СТ налазима.

Резултати Вредности амилаза и аланин-аминотрансферазе (ALT) су биле значајно више код тешких облика и панкреатитиса билијарног порекла у односу на алкохолну (етиличну) етиологију ($p < 0,05$). Однос аспартат-аминотрансферазе (AST) и ALT био је значајно виши код болесника с панкреатитисом алкохолне етиологије у односу на билијарну ($p < 0,05$). Ниво лактат-деhidрогеназе (LDH) је био значајно виши код тешког облика обољења у односу на благу форму ($p < 0,01$). Ниво холестерола је био значајно виши код испитаника с панкреатитисом билијарног порекла у односу на алкохолну етиологију ($p < 0,05$). Утврђена је негативна корелација ниског степена између вредности калцијумових јона у плазми и СТ налаза ($p = 0,05$), односно налаза ултразвук ($p = 0,0001$).

Закључак Постоји негативна корелација између нивоа јонизованог калцијума у крви и степена тежине акутног панкреатитиса према Балтазаровом (Balthazar) скору. Средње вредности алфа-амилазе, укупног холестерола и ALT биле су статистички значајно више у групи билијарног у односу на групу алкохолног акутног панкреатитиса. Просечне вредности алфа-амилазе, LDH и ALT биле су статистички значајно више код испитаника с тешким обликом акутног панкреатитиса у односу на оне са благим обликом обољења. Однос AST и ALT био је статистички значајно виши у групи алкохолног него у групи билијарног панкреатитиса.

Кључне речи: акутни панкреатитис; биохуморални налази; ултразвук; компјутеризована томографија

УВОД

Акутни панкреатитис је скуп динамичких локалних и системских патофизиолошких промена насталих аутодигестивном активацијом панкреасних проензима унутар самог паренхима жлезде. У Великој Британији инциденција ове болести је од 10 до 40 оболелих на 100.000 људи, што говори у прилог значајној учесталости и епидемиолошко-социјалном значају ове болести. Да је акутни панкреатитис био тежак здравствени проблем још у старом веку сведочи и податак да се смрт Александра Великог (356–323 п.н.е.) приписује акутном некротизујућем панкреатитису изазваном обилним уносом хране и велике количине алкохола [1].

Прва међународно призната класификација панкреатитиса дата је у Марсељу 1963. године. После ове класификације начињене су још четири: Кембричка 1983, ревидирна Марсељска 1984, Марсељско-римска 1988. и Атлантска 1992. У 80–90% случајева реч је о лакшем облику акутног панкреатитиса, док се тежак облик болести јавља у 10–20% случајева [2]. Два најчешћа узрока акутног панкреатитиса (код 60–90% болесника) су

билијарна литијаза и хронична злоупотреба алкохола. Упркос напретку у дијагностиковању и лечењу обољења, 10–25% болесника с тешким обликом акутног панкреатитиса умре.

Постоји неколико теорија које објашњавају патофизиолошки механизам који узрокује панкреатитис, али су најзначајније теорија примарне лезије ацинусних ћелија и теорија опструкције дуктуса с рефлуксом жучи. Наиме, долази до повећане производње и ослобађања инфламаторних цитокина, као што су интерлеукин 1 (IL-1), IL-6, IL-8 и фактор туморске некрозе алфа (TNF- α), из неутрофила, макрофага и лимфоцита. Све то доводи до синдрома системског инфламаторног одговора (SIRS), који се дефинише као задовољење најмање два критеријума од следећих: пулс преко 90/минут, број респирација преко 20/минут или PCO₂ испод 32 mm Hg, број леукоцита мањи од 4.000 или већи од 12.000 по кубном милиметру, ректална температура нижа од 36 или већа од 38 степени по Целзијусу. Касније долази до синдрома мултиорганске инсуфицијенције (МОФ), који се дефинише као постојање кардиоваскуларне слабости у виду шока и

Correspondence to:

Tomislav TASIĆ
Odeljenje za gastroenterologiju i
hepatologiju
Opšta bolnica
Rade Končara 9, 16000 Leskovac
Srbija
tasic.tomislav@gmail.com

пада артеријског крвног притиска испод 90 mm Hg, инсуфицијенције бубрега с порастом нивоа креатинина и смањењем диурезе, респираторне инсуфицијенције са падом PO_2 испод 60 mm Hg и значајног гастроинтестиналног крварења (више од 500 ml крви током 24 часа).

Применом вишефакторског система бодовања постиже се тачност у процени тежине болести у 70–80% случајева. У употреби је неколико ових скорова: Рансонов, Глазговски, APACHE II (*Acute Physiology and Chronic Health Evaluation*). Прва два се користе у првих 48 часова, да би се проценила тежина болести. Скор 3 и више говори у прилог тешком облику панкреатитиса. APACHE II се може користити како на почетку болести, тако и за свакодневну процену њеног тока, а вредности преко 9 указују на тежак облик болести.

Одређивање нивоа амилазе у серуму је најчешће коришћени лабораторијски тест у дијагностиковању акутног панкреатитиса. Значајним се сматра двоструко или троструко повећање амилаземије. Одређивање нивоа липазе у серуму је много прецизнији показатељ у односу на амилаземију, али и она може да потиче од других органа, као што је желуцац. Поремећај биохуморалних маркера функције јетре се јавља у акутном панкреатитису, чешће у оном билијарног порекла. Вредности ових параметара корелирају с тежином и прогнозом болести [3, 4]. Сматра се да су биохуморални маркери билијарног панкреатитиса ниво амилазе, липазе, алкалне фосфатазе и *gama-GT* (гама глутамил-транспептидаза). Аланин-трансфераза (*ALT*) је најпрецизнији биохемијски маркер за билијарну генезу панкреатитиса, што уз податак да су вредности амилаземије обично више у серуму особа с билијарним акутним панкреатитисом, а липазе код болесника с панкреатитисом алкохолног порекла, и вредности *MCV* (енгл. *mean corpuscular volumen*), *gama-GT* и односа аспартат-аминотрансферазе (*AST*) и *ALT*, које су више код алкохолне етиологије, може бити корисно за утврђивање порекла панкреатитиса [3, 4, 5]. Однос липазе и амилазе, чини се, није значајан за етиолошку дијагностику, мада поједини аутори сматрају да ако је он виши од 3, постоји велика вероватноћа да је реч о алкохолном пореклу акутног панкреатитиса [5]. Повећање броја леукоцита изнад нормалних вредности може бити значајан индикатор септичних компликација, као и прогностички фактор. Смањене вредности хематокрита се бележе код крварења и хеморагичног панкреатитиса. Пад нивоа хематокрита у прва 24 часа за више од 10% је лош прогностички знак, док је смањење за 30% знак тешког хеморагичног панкреатитиса. Веома је значајно одређивање нивоа протеина акутне фазе, где главно место заузима C-реактивни протеин (*CRP*), који се појачано синтетише у јетри оболелих од запаљенских болести и неспецифичан је маркер. Његово одређивање је значајно тек 48–72 часа после испољавања првих симптома (вредност код тешких облика акутног панкреатитиса је преко 120–150 g/l) [5]. Ултразвучна дијагностика данас је рутинска и уобичајена процедура, која се може једноставно примењивати, како у великим центрима, тако и у малим болницама

и амбулантама. Свим пацијентима који су према неком од наведених критеријума претходно сврстани у групу болесника с тешким обликом акутног панкреатитиса треба начинити СТ снимак (компјутеризована томографија) с интравенском применом контрастног средства, и то између четвртог и десетог дана болести [6].

ЦИЉ РАДА

Циљ рада је био да се утврде биохуморалне одлике акутног панкреатитиса и установе дијагностичка и прогностичка вредност појединих биохуморалних параметара, повезаност етиологије и вредности појединих биохуморалних параметара, као и веза између биохуморалних параметара и других дијагностичких метода у прогнози тока болести.

МЕТОДЕ РАДА

Ретроспективно-проспективном студијом обухваћени су болесници са дијагнозом акутног панкреатитиса који су лечени од 2007. до 2010. године на Клиници за гастроентерологију и хепатологију Клиничког центра у Нишу. Укупно су укључена 273 болесника, просечне старости $58,08 \pm 0,79$ година (од 18 до 85 година), и то 137 жена (50,19%) и 136 мушкараца (49,81%). Биохуморалном анализом обухваћени су: гликемија, леукоцити у периферној крви, *AST*, лактат-дехидрогеназа (*LDH*), липидни статус, амилаза у серуму и урину, ниво јонизованог калцијума, *gama-GT*, *ALT*, *CRP*. Истакнути су Рансонови критеријуми: старост болесника (значајно је доба преко 70 година), вредност гликемије (значајна је вредност већа од 10 mmol/l), осим код особа оболелих од дијабетеса, вредност *AST* (значајне су вредности веће од 200 IU/ml), вредност *LDH* (значајне су вредности веће од 600 IU/ml), број леукоцита у периферној крви (значајно је увећање преко 15.000 по кубном милиметру). Коришћен је *Biochemical Analyzer AU-680-ZA* централне биохемијске лабораторије Клиничког центра у Нишу.

Ултразвучни преглед органа горњег абдомена и панкреаса рађен је након гладовања од осам до дванаест сати, код појединих болесника уз употребу прокинетики цисаприда или симетикона, ради боље елиминације и апсорпције гасова и боље видљивости. Ултразвучни прегледи су обављани ултразвучним *real-time* апаратима *Siemens Acuson X300* с колор доплером, као и *Toshiba Ecossee 75*, такође с колор доплером, са секторским и конвексним сондама фреквенције од 3 и 3,5 MHz. Код неких болесника с тежим клиничким обликом панкреатитиса код којих се сумњало на постојање некрозе или течних колекција рађен је и *MSCT* с контрастним средством.

Резултати су анализирани стандардним статистичким тестовима, као што су аритметичка средина, стандардна девијација, Студентов *t*-тест и тест линеарне корелације по Спирману (*Spearman*).

РЕЗУЛТАТИ

Од укупног броја испитаника, код 235 (86,1%) је дијагностикован благ облик, а код 38 (13,9%) тежак облик акутног панкреатитиса. Две најзначајније и најбројније групе према етиологији панкреатитиса биле су група билијарног панкреатитиса, који је установљен код 157 испитаника (57,51%) и група алкохолног (етилног) панкреатитиса, који је забележен код 78 болесника (28,57%). Идиопатски или панкреатитис непознате етиологије утврђен је код 26 (9,52%), панкреатитис узрокован хиперлипидемијом код 10 (3,67%), а панкреатитис настао услед примене *ERCP* или узрокован другим разлозима код два болесника (0,73%).

Просечна вредност амилазе у серуму била је виша је у групи испитаника с тешким обликом акутног панкреатитиса ($1437,05 \pm 174$ IU/l) у односу на групу с лакшим обликом ($1022,92 \pm 82,1$ IU/l), а разлика је била статистички значајна ($p < 0,05$; $t = 2,13 > 1,96$). Просечна вредност амилазе у серуму у групи испитаника с алкохолним панкреатитисом била је $877,88 \pm 91,7$ IU/l, а у групи са билијарним панкреатитисом $1224,81 \pm 113$ IU/l. Разлика је била статистички значајна ($p < 0,05$; $t = 2,37 > 1,96$).

Просечна вредност количника *AST/ALT* била је већа у групи испитаника с тешким обликом акутног панкреатитиса ($1,54 \pm 0,45$) у односу на оне с лакшим облицима болести ($0,90 \pm 0,04$). Разлика, међутим, није била статистички значајна за дати степен вероватноће ($p > 0,05$; $t = 1,39 < 1,96$). Код испитаника с алкохолним панкреатитисом количник *AST/ALT* имао је већу просечну вредност ($1,23 \pm 0,10$) него у групи с обољењем билијарног порекла ($0,86 \pm 0,11$). Ова разлика била је статистички значајна ($p < 0,05$; $t = 2,38 > 1,96$).

Средње вредности холестерола код болесника са благим обликом панкреатитиса биле су више него код испитаника с тешком формом ($8,20 \pm 2,7$ mmol/l према $5,42 \pm 0,20$ mmol/l), али разлика није била статистички значајна ($p > 0,05$; $t = 1,02 < 1,96$). Такође, средња вредност холестерола била је већа код испитаника са билијарним панкреатитисом него у групи с алкохолним ($9,28 \pm 4,03$ mmol/l према $5,15 \pm 0,18$ mmol/l). И ова разлика била је статистички значајна ($p < 0,05$; $t = 2,10 > 1,96$).

Просечна вредност *ALT* била је већа у групи болесника са билијарним панкреатитисом ($109,38 \pm 18,1$ IU/l) у односу на испитанике с алкохолним обољењем ($287,82 \pm 20,2$ IU/l), а разлика је била статистички значајна ($p < 0,01$; $t = 6,54 > 2,58$). Код испитаника са благим обликом акутног панкреатитиса просечна вредност *ALT* била је мања него у групи болесника с тешким обликом обољења ($193,4 \pm 14,6$ IU/l према $350,2 \pm 49,8$ IU/l), а разлика је била статистички значајна ($p < 0,01$; $t = 2,98 > 2,58$).

Средња вредност триглицерида је била виша у групи испитаника с алкохолним панкреатитисом ($1,87 \pm 0,12$ mmol/l) у односу на групу с обољењем билијарног порекла ($1,64 \pm 0,14$ mmol/l), али разлика није била статистички значајна ($p > 0,05$; $t = 1,19 < 1,96$). Средња вредност триглицерида код болесника са благим

обликом акутног панкреатитиса била је виша у односу на испитанике с тежом формом обољења ($2,36 \pm 0,25$ mmol/l према $1,72 \pm 0,17$ mmol/l). Ни ова разлика није била статистички значајна ($p > 0,05$; $t = 1,19 < 1,96$).

Просечна вредност *LDH* код болесника с тешким обликом акутног панкреатитиса била је већа од оне забележене код испитаника с лакшим облицима обољења ($936,22 \pm 127$ IU/l према $498,80 \pm 14,4$ IU/l). Разлика између ових група била је статистички значајна ($p < 0,01$; $t = 3,37 > 2,58$). У групи испитаника са билијарним панкреатитисом забележене су нешто више просечне вредности *LDH* него у групи испитаника с обољењем алкохолног порекла ($593,36 \pm 35,3$ IU/l према $520,34 \pm 34,5$ IU/l), али разлика није била статистички значајна ($p > 0,05$; $t = 1,47 < 1,96$).

Средња вредност *CRP* у групи болесника с алкохолним панкреатитисом била је већа ($163 \pm 29,4$ mg/l) у односу на групу испитаника с обољењем билијарног порекла ($92 \pm 14,7$ mg/l), али разлика није била статистички значајна ($p > 0,01$; $t = 2,11 < 2,58$). Просечна вредност *CRP* била је нешто виша у групи с тежим обликом обољења у односу на групу са благом формом акутног панкреатитиса ($122 \pm 34,4$ mg/l према $110 \pm 13,2$ mg/l). Разлика, међутим, није била статистички значајна ($p > 0,05$; $t = 0,29 < 1,96$).

Испитаници оболели од билијарног панкреатитиса били су у просеку старији ($61,7 \pm 1,1$ годину), од болесника с обољењем алкохолног порекла ($52,1 \pm 1,57$ година), а разлика је била статистички значајна ($p < 0,01$; $t = 4,97 > 2,58$). Такође, испитаници с тешким обликом обољења били су старији од болесника код којих је дијагностикован лакши облик акутног панкреатитиса ($66,6 \pm 2,04$ године према $56,7 \pm 0,94$ године). И ова разлика између две групе била је статистички значајна ($p < 0,01$; $t = 4,38 > 2,58$).

Утврђена је негативна корелација ниског степена између нивоа калцијума у серуму и ултразвучног налаза по Балтазару ($r = -0,231$; $p = 0,0001$), односно нивоа калцијума у серуму и *CT* налаза по Балтазару ($r = -0,252$; $p = 0,050$).

ДИСКУСИЈА

Биохуморални показатељи имају значајну улогу у дијагностиковању и праћењу тока болести код особа оболелих од акутног панкреатитиса. Када је у питању вредност амилазе, као фактора у дијагностици етиологије панкреатитиса, просечна вредност амилазе виша је код билијарног облика него код алкохолног панкреатитиса, па стога може послужити за разликовање узрока болести [5, 7]. Код испитаника наше студије просечна вредност амилазе у серуму код алкохолног панкреатитиса била је статистички значајно нижа него код билијарног, што је у складу с поменутих подацима из литературе. Такође, просечна вредност амилазе била је статистички значајно мања код болесника с лакшим обликом панкреатитиса у поређењу са групом испитаника код којих је постојао тежи облик болести.

Однос *AST* и *ALT* може бити значајан у етиолошкој дијагностици и, према подацима из литературе, већи је код алкохолног него код осталих узрока панкреатитиса, укључујући и билијарни панкреатитис [7]. Код испитаника наше студије просечна вредност количника *AST/ALT* била је већа код оних с тежим обликом акутног панкреатитиса него у групи са благом формом, али разлика није била статистички значајна. У групи испитаника с алкохолним панкреатитисом количник *AST/ALT* имао је већу просечну вредност него код болесника са билијарним панкреатитисом, а разлика је била статистички значајна.

Вредност *ALT* је још један биохуморални параметар које је могуће упоређивати код различитих облика акутног панкреатитиса према тежини клиничке слике и етиологији. Према наводима Хазема (*Hazem*) [8], високе вредности *ALT* (>150 IU/l) имају специфичност од 96% у дијагностици билијарног панкреатитиса, али је сензитивност ниска –48%, а нормалне вредности *ALT* не искључују постојање акутног панкреатитиса. Просечна вредност *ALT* код испитаника с акутним алкохолним панкреатитисом у нашој студији била је статистички значајно мања него код болесника са билијарним панкреатитисом. Такође, просечна вредност овог параметра била је статистички значајно већа у групи испитаника с тешким обликом обољења у поређењу са болесницима код којих је дијагностикован лакши облик акутног панкреатитиса.

Средње вредности триглицерида код испитаника наше студије нису биле значајно различите између група с благим и тешким панкреатитисом према Рансоновој класификацији, као и између група с алкохолним и билијарним панкреатитисом. Вредности холестерола такође се нису статистички значајно разликовале између група са благом и тешком обликом акутног панкреатитиса. Међутим, код испитаника с алкохолним панкреатитисом средња вредност холестерола била је мања него у групи са билијарним, а разлика је била статистички значајна. У већини података из литературе помиње се хиперлипидемија, односно хипертриглицеридемија као значајан етиолошки, али не и предиктивни фактор код акутног панкреатитиса, што је у сагласности с резултатима наше студије [5, 8, 9]. Статистички значајно више вредности холестерола у групи испитаника с панкреатитисом билијарног порекла пре би могле говорити у прилог улози холестерола у генези холелитијазе, него у дијагнози и предвиђању тока акутног панкреатитиса.

Вредност *LDH* је обухваћена Рансоновим критеријумима, али су поједине студије испитивале директну предиктивну вредност овог параметра у процени клиничке слике акутног панкреатитиса као независног параметра. Зрнић и сарадници [9] су у својој студији на сто испитаника испитивали предиктивну и дијагностичку улогу *LDH* и *CRP*, као појединачних фактора код акутног панкреатитиса. Установили су сличну дијагностичку прецизност и специфичност између Рансоновог скорa и нивоa *LDH* у првом дану хоспитализације, а у каснијем периоду (72 часа од пријема)

дијагностичку прецизност и слагање с Рансоновим критеријумима имала је вредност *CRP*. У нашој студији просечна вредност *LDH* код благог облика акутног панкреатитиса била је нижа у односу на просечну вредност код теже форме панкреатитиса, уз статистички значајну разлику. Гледано према најчешћим етиолошким факторима, просечна вредност *LDH* код болесника са билијарним панкреатитисом била је већа него код испитаника с обољењем алкохолног порекла, али статистички значајне разлике није било.

Ниво калцијума у серуму се у литератури наводи као могући биохуморални показатељ тежине акутног панкреатитиса, и то у обрнутој сразмери са степеном тежине панкреатитиса, односно степеном некрозе [10, 11]. Ултразвук и *СТ* су значајне методе у морфолошкој дијагностици горњег абдомена и процени степена тежине акутног панкреатитиса [12]. У нашој студији је стога и корелиран Балтазаров скор ултразвучних и *СТ* промена са нивоом јонизованог калцијума. У литератури се најчешће помиње корелација клиничких скорова и/или појединих биохуморалних фактора, попут *CRP*, нивоа панкреасних ензима и др. [5, 13], док се ниво калцијумових јона углавном сагледава у склопу клиничких скор-система, као што су Глазговски и Рансонов. Нисмо наишли на податке који би на сличан начин приказивали овакву корелацију. Према доступним подацима из литературе, вредности калцијума у серуму биле су значајно снижене као знак погоршања, обично у групи болесника с тешким обликом акутног панкреатитиса [13], што се и у нашој студији показало у виду негативне корелације између степена тежине ултразвучног и *СТ* налаза по Балтазаровом скору и просечног нивоа калцијума у серуму.

Када је у питању дијагностичко-предиктивни значај вредности *CRP*, многи аутори наводе високу вредност овог параметра код акутног панкреатитиса. Зрнић и сарадници [9] и Каја (*Kaya*) и сарадници [14] наводе високу предиктивну вредност *CRP* за морбидитет и морталитет. Хагивара (*Hagiwara*) и сарадници [15] у својој серији од 39 болесника наводе да су високе вредности *CRP* и *СТ* скорa независни ризични фактори за локалне компликације код акутног панкреатитиса. У нашој серији од 102 испитаника поредили смо однос броја болесника с високим вредностима *CRP* (већим од 150 mg/l) између група с тешким и благим панкреатитисом према Рансоновим критеријумима. Статистички значајне разлике између ових група болесника није било. Овај налаз није у складу с подацима из литературе и могућа је последица различитог времена узимања узорка за одређивање вредности *CRP*, јер је, како се сматра, најпоузданија вредност *CRP* узета после 48–72 часа од пријема на лечење, што у нашој студији није увек био случај. Гирлејик (*Gürleyik*) и сарадници [16] наводе да је *CRP* веома поуздан реактант акутне фазе панкреатитиса и добар предиктор тежине клиничке слике када је његов ниво у серуму већи од 150 mg/l у прва 48–72 часа. Они такође наводе значајно више вредности концентрације *CRP* у серуму код особа с тежим обликом болести, као и да су вредности концен-

традије CRP у серуму значајно различите између лакше и теже форме акутног панкреатитиса после најмање 48 часова, али не и после 24 часа. Слични су и подаци које наводе Хагивара и сарадници [15].

ЗАКЉУЧАК

Наша студија је показала да су средње вредности алфа-амилазе, укупног холестерола и ALT статистички значајно више код болесника са билијарним панкреатитисом у односу оболеле од акутног панкреатитиса

алкохолне етиологије. Просечне вредности алфа-амилазе, LDH и ALT су биле статистички значајно више у групи испитаника с тешким обликом панкреатитиса у поређењу са групом где су испитаници боловали од блажег облика овог обољења. Однос AST и ALT био је статистички значајно виши у групи испитаника с акутним панкреатитисом алкохолног него у групи с обољењем билијарног порекла.

Између просечних вредности јонизованог калцијума у серуму и ултразвучног, односно СТ налаза степенованих према Балтазаровом скору, утврђена је негативна корелација ниског степена.

ЛИТЕРАТУРА

- Young SP, Thompson JP. Severe acute pancreatitis. *Contin Educ Anaesth Crit Pain*. 2008; 8(4):125-8.
- Pezzilli R, Zerbi A, Di Carlo V, Delle Fave GF; Working Group of the Italian Association for the Study of the Pancreas on Acute Pancreatitis. Practical guidelines for acute pancreatitis. *Pancreatol*. 2010; 10:523-35.
- Munoz A, Katerndahl DA. Diagnosis and management of acute pancreatitis. *Am Fam Physician*. 2000; 62:164-74.
- Werner J, Feuerbach S, Uhl W, Büchler MW. Management of acute pancreatitis: from surgery to interventional intensive care. *Gut*. 2005; 45(3):426-36.
- Kim YS, Lee BS, Kim SH, Seong JK, Jeong HY, Lee HY. Is there correlation between pancreatic enzyme and radiological severity in acute pancreatitis? *World J Gastroenterol*. 2008; 14(15):2401-5.
- Laurens B, Leroy C, Andre A, Etienne B, Sergent-Baudson, Ernst O. Imaging of acute pancreatitis. *J Radiol*. 2005; 86:733-47.
- Jeremić M, Stojanović M. Surgery of pancreas. In: Jeremić M, editor. *Special Surgery I*. Niš: Pelikan print; 2001. p. 1-77.
- Hazem ZM. Acute biliary pancreatitis: diagnosis and treatment. *Saudi J Gastroenterol*. 2009; 15:147-55.
- Zrnić IK, Milic S, Fisić E, Radic M, Stimac D. C-reactive protein and lactate dehydrogenase as single prognostic factors of severity in acute pancreatitis. *Lijec Vjesn*. 2007; 129(1-2):1-4.
- Hirota M, Takada T, Kawrada Y, Hirata K, Mayumi T, Yoshida M, et al. JPN Guidelines for the management of acute pancreatitis: severity assessment of acute pancreatitis. *J Hepatobiliary Pancreat Surg*. 2006; 13:33-41.
- Banks PA, Freeman ML. Practice guidelines in acute pancreatitis. *Am J Gastroenterol*. 2006; 101:2379-400.
- Rickes S, Mönkemüller K, Malfertheiner P. Contrast-enhanced ultrasound in the diagnosis of pancreatic tumors. *JOP*. 2006; 7(6):584-92.
- Balthazar EJ. Acute pancreatitis: assesment of severity with clinical and CT evaluation. *Radiology*. 2002; 223:603-13.
- Kaya E, Dervisoglu A, Polat C. Evaluation of diagnostic findings and scoring systems in outcome prediction in acute pancreatitis. *World J Gastroenterol*. 2007; 14(13):3090-4.
- Hagiwara A, Miyauchi H, Shimazaki S. Predictors of vascular and gastrointestinal complications in severe acute pancreatitis. *Pancreatol*. 2008; 8(2):211-8.
- Gürleyik G, Emir S, Kiliçoglu G, Arman A, Saglam A. Computed tomography severity index, APACHE II score, and serum CRP concentration for predicting the severity of acute pancreatitis. *JOP*. 2005; 6(6):562-7.

Comparison of Biohumoral and Morphological Parameters in Acute Pancreatitis

Tomislav Tasić¹, Saša Grgov¹, Aleksandar Nagorni², Danijela Benedeto-Stojanov²

¹Department of Gastroenterology and Hepatology, General Hospital, Leskovac, Serbia;

²Clinic for Gastroenterology and Hepatology, Clinical Center, Niš, Serbia

SUMMARY

Introduction Acute pancreatitis occurs as a result of autodigestive activation of pancreatic proenzymes, within the parenchyma of the glands.

Objective The goal of the work was to establish possible connection of etiology and severity of the acute pancreatitis and biohumoral parameters, ultrasound and CT.

Methods The study included 273 patients with pancreatitis, classified by Ranson's score, according to degree of severity and etiology, whose biohumoral parameters were correlated with each other, and with the ultrasound and CT findings.

Results The values of amylase and ALT were significantly higher in the severe form of pancreatitis and biliary etiology compared to etilic ($p < 0.05$). The ratio of AST/ALT was significantly higher in the group of etilic compared to biliary etiology ($p < 0.05$). LDH was significantly higher in the severe form group compared to moderate form of pancreatitis ($p < 0.01$). Cholesterol was significantly higher in the group of biliary compared to the group of

etilic pancreatitis ($p < 0.05$). There was a negative low correlation between the value of calcium ions in the plasma and CT analysis ($p = 0.05$). Low degree negative correlation between the value of calcium ions and ultrasound analysis was established ($p = 0.0001$).

Conclusion There was a negative correlation between the level of ionized calcium in the blood and the degree of the acute pancreatitis by the Balthazar score. Mean value of alpha amylase, total value of cholesterol and ALT were significantly higher in the group of biliary compared to the group of etilic acute pancreatitis. The average values of the alpha amylase, LDH and ALT were significantly higher in the group of severe form of the acute pancreatitis compared to the group of moderate form. The ratio AST/ALT was significantly higher in the group of etilic than in the group of biliary pancreatitis.

Keywords: acute pancreatitis; biohumoral analysis; ultrasound; CT

Evaluation of Reversal Osteofixation Using K-Wires in Digital Replantation

Čedomir Vučetić^{1,2}, Zoran Vukašinović^{2,3}, Radovan Manojlović^{1,2}, Goran Tulić^{1,2}, Čedo Vučković¹, Duško Spasovski^{2,3}, Aleksandar Todorović¹, Marko Bumbaširević^{1,2}

¹Clinic of Orthopedic Surgery and Traumatology, Clinical Center of Serbia, Belgrade, Serbia;

²School of Medicine, University of Belgrade, Belgrade, Serbia;

³Institute of Orthopedic Surgery "Banjica", Belgrade, Serbia

SUMMARY

Introduction Modified, reversal technique of fixation in digital replantation using K-wires was analyzed. The results obtained from the standard technique and reversal technique of fixation using K-wires were compared.

Objective The aim was to compare the results of osteofixation using K-wires in digital replantation when either standard or reversal, modified technique was used.

Methods A retrospective study included 103 replanted fingers in 72 patients. The first group included standard fixation using K-wires and the second group included fixation using K-wires, but with a modified technique. Modification consisted of the opposite order of moves during the phalanges fixation compared to the standard technique: first, K-wire was introduced intramedullary in the proximal phalanx and the top of the wire was drawn out through the skin in proximal part of the finger or hand. Second, distal part of the wire was introduced in the phalanx of the amputated part of the finger intramedullary until the wire entered the cortex.

Results Duration of bone healing after digital replantation was shorter in cases where reversal technique was used in comparison with standard technique (7.2 weeks compared to 7.5 weeks).

Conclusion The comparison of standard and reversal technique of phalangeal fixation with K-wires in digital replantation shows that both techniques are useful. Reversal technique expands the choice of operative techniques for bone fixation during the replantation. It shows some advantages and enables avoidance of vein injuries.

Keywords: digital replantation; osteofixation using K-wires; bone healing

INTRODUCTION

Osteofixation is necessary step before reconstruction of all cut structures in the procedure of digital replantation. It also has a great importance for good functional outcome after the replantation [1]. Secondary procedures related to bone fixation account for 12% in cases of digital replantation [2]. There are many techniques which can be used for fixation of digital phalanges and bones in hand area [3, 4, 5]. The common, described techniques are: 1. Single intramedullary fixation; 2. Fixation using two parallel intramedullary K-wires; 3. Fixation using one intramedullary and one oblique K-wire; 4. Fixation using two crossed K-wires; 5. Interosseous wire fixation; 6. Parallel interosseous wires fixation; 7. Crossed interosseous wires fixation; 8. Oblique K-wire with interosseous wire fixation; 9. Screw and plate fixation; 10. Screw fixation without the plate (Ikuta); 11. Intramedullary screw fixation (Tamai).

In digital replantation, osteofixation should be simple, carried out in a short period of time, not make large bone exposure, include small part of the bone, provide solid stability at the place of fracture, provide movements as soon as possible. In addition, the volume of inserted fixational material needs to be smaller [3]. The

choice of fixation technique depends on the level of replantation. For distal phalanges, a single K-wire is more common, but for proximal parts two K-wires or the combination of intramedullary K-wire and interosseous wire is common. For metacarpal bones, the screws and plates can be used, too.

Properly placed osteofixation, adequate choice of procedure and successful revascularization provide good fracture healing and early movements. Osteofixation in digital replantation has been reviewed in English- and Russian-language literature and the results are mostly the same [4-8]. The insertion of the K-wires is associated with the risk of neurovascular bundle damage, either directly or indirectly by causing mechanical obstruction by tethering a vessel or its supporting ligaments – this was noticed few decades ago [7].

OBJECTIVE

The aim of this paper was to describe modified technique for fixation of finger phalanges using K-wires in digital replantation and also to point to the advantage of this technique – save the soft tissue covering the replanted part of the finger.

Correspondence to:

Čedomir VUČETIĆ
Clinic of Orthopaedic Surgery and Traumatology
Clinical Center of Serbia
Dr Koste Todorovića 26
11000 Belgrade
Serbia
cedomir.vucetic@gmail.com

METHODS

The analysis of osteofixation in replanted fingers included patients with digital replantation who underwent osteofixation using K-wires. Replanted fingers survived in 83.3% of cases. The cases (16.7%) whose circulation could not be maintained were excluded and their fingers were subsequently reamputated. Authors analyzed 103 replantations in 72 patients (64 males and 8 females), which had been performed during the period of 15 years. Digital amputations according to the type of injury were as follows: clean cuts – 22 (21.4%), local crushes – 56 (54.4%), avulsions – 17 (16.5%) and crushes – 8 (7.7%).

According to the type of osteofixation, patients were divided in two groups. In the first group of patients, osteofixation using K-wires was performed by standard technique and the second group was treated by modified, reversal technique of osteofixation using K-wires.

The first group included 47 cases which were all treated by the standard technique: first, the K-wire was introduced intramedullary in the amputated part and drawn out through the top of the finger or periarticularly through the skin (in case of medial or proximal phalanx). In the next step, the proximal part of the same wire was introduced intramedullary in proximal part of the phalanx and in this way the fracture was fixed. After the fixation was done, the tops of the wires were sticking out in distal, replanted parts of the finger and they should be curved for 90°. When it was obvious that the fracture as healed, the wires should be pulled out distally.

The second group included 56 cases. These patients were operated using modified surgical technique. Modification included: first, the K-wire was introduced intramedullary in the proximal part of the phalanx and the top of the wire was drawn out through the skin in proximal part of the finger or hand (Figure 1A). In the second step, distal part of the wire was introduced intramedullary in the phalanx, until the wire entered the cortex and at this point

the top of the wire was stopped (Figure 1B). There are two ways showing the end of passing the wire into the amputated part: when the wire enters the cortex, it is possible to feel higher resistance (so after few seconds of drilling in cortex, further introduction of wire into the amputated part is stopped). Another solution means that the wire passes through the cortex and at the moment when the wire gets out of the cortex, the small vibration can be noticed in the part of the digit where the wire is expected to get out. This technique saves the neurovascular structures, which is very important because of their great significance for the success of replantation. After the fixation was completed, the proximal part of the wire should be curved for 90° at the point where the wire got out of the skin and it should be also shortened (Figure 1C). When the fracture is healed, the wires should be pulled out proximally.

Standard descriptive statistical methods and the appropriate tests were used for statistics (χ^2 test and Kruskal-Wallis test).

RESULTS

The technique of osteofixation using K-wires was applied in 103 replanted fingers (Figures 2-7). There were 47 (45.6%) replantations in the first group of replanted fingers, and standard technique was used for fixation. Among them, fixation using single K-wire was done in 11 (10.7%) cases and fixation using two K-wires in 36 (34.6%) cases. In the second group with reversal positioning of K-wires, there were 56 replantations (54.4%). Among them, the fixation using the single K-wire was done in 21 (21.4%) cases and the fixation using two K-wires in 35 cases (33.9%) (Table 1).

Average bone shortening among followed up replantations was 7 mm. Shortening from 0 mm to 31 mm was presented in Table 2. There was no shortening in 8 replantations. In case of 26-year old male patient, the proximal phalanx was 2 mm longer, compared to the opposite side.

In bone shortening, the difference between the standard and reversible group was not statistically significant ($\chi^2=0.366$, $p>0.05$).

Post-traumatic arthritis after the replantation was found in 24 (27.6%) cases. It was most frequently single and localized in distal and injured joints. Five replantations in two patients were followed by arthritis which affected all hand joints. The patients were between 30 and 56 years old. Arthrodesis in functional position was performed in 25 cases (28.7%) with joint lesions.

In digital replantation after the osteofixation with K-wires, fracture healing was assessed as excellent in 56 cases (54.4%), good in 35 cases (34.4%), malposition in 10 cases (9.7%) and nonunion in 3 cases (2.9%) (Table 3). Comparison of fracture healing between two analyzed groups showed no significant difference ($\chi^2=1.09$, $p>0.05$), although slightly bigger number of replantations with excellent and good results was recorded in the group where reversal technique was applied.

Average time of bone healing in digital replantation after the osteofixation using K-wires with standard and

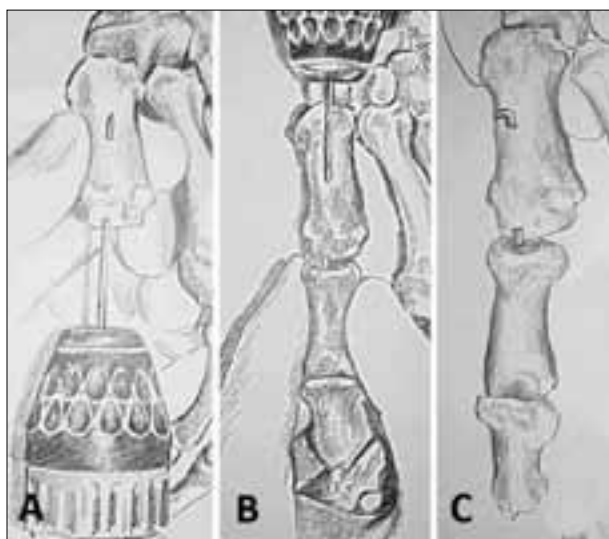


Figure 1. Review of surgical technique on model: a) introducing the K-wire into the proximal part of the bone; b) leaving the top of the K-wire in the cortex; c) cut and curved proximal part of the K-wire.

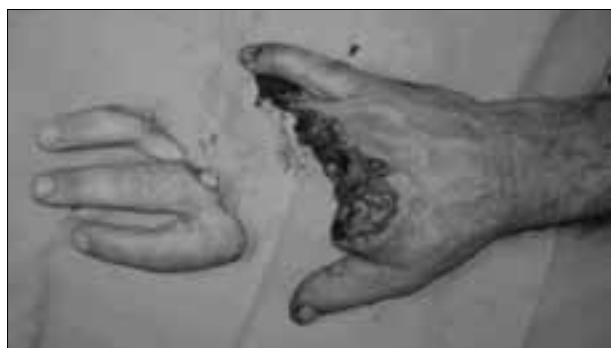


Figure 2. A male, 51 years, complete amputation of three fingers with saw



Figure 3. The condition just after the replantation of three fingers. K-wires fixation, reversal technique. The ends of the wires are easily seen in metacarpus.



Figure 4. X-ray five weeks after operation, following the placement of reversal K-wires



Figure 5. X-ray five months after operation



Figure 6. Finger extension function after five months



Figure 7. Finger flexion function after five months

reversal bone technique was 7.5 and 7.2 weeks, respectively. The wires were pulled out within 6-9 weeks. In 39.8% (41) of replantations with osteofixation using standard or reversal technique, the fracture healing was achieved after 7-8 weeks. A bigger number of healings achieved in 6 weeks (or 7 weeks) (Table 4) was noticed after the use of reversal technique. Statistically significant difference in time of healing between these two analyzed groups was not found ($\chi^2=1.28$, $p>0.05$).

Type of injury was the major factor for indication of digital replantation. It also had the highest impact on the entire functional recovery. The analysis of functional outcomes in digital replantation according the type of injury

using Tamai criteria showed that the functional outcome was worse as the injury was wider. Every case of clean cut produced excellent or good result. In cases of avulsions and local crushes, the functional recovery was significantly worse. In cases of crushes, recovery was satisfactory and poor, according to Tamai criteria (Table 5).

There was a significant difference between the groups considering the type of injury and final functional outcome (Kruskal-Wallis $H=33.8623$, $p<0.01$). Clean cuts and avulsions were the exception, meaning that there was no significant difference between these two types of injury. The data obtained in this series showed that there was no excellent functional outcome if bone healing was not excellent.

Table 1. Osteofixation type in replanted fingers of the analyzed group

Fixation type	Reversal technique			Standard technique			Total
	1K-wire	2K-wires	Total	1K-wire	2K-wires	Total	
Number of fingers (%)	21 (20.4)	35 (33.9)	56 (54.4)	11 (10.7)	36 (34.6)	47 (45.6)	103 (100.0)

Table 2. Bone shortening in digital replantation – number of fingers (%)

Replantations	Bone shortening (mm)				Total
	0	1–10	11–20	21–30	
Standard technique	3 (2.9)	26 (25.2)	17 (16.5)	1 (1.0)	47 (45.6)
Reversal technique	5 (4.9)	32 (31.1)	18 (17.5)	1 (0.9)	56 (54.4)
Total	8 (7.8)	58 (56.3)	35 (33.9)	2 (2.0)	103 (100.0)

Table 3. Fracture healing after the bone fixation with K-wires – number of fingers (%)

Technique of fixation using K-wires	Fracture healing				Total
	Excellent	Good	Malposition	Nonunion	
Standard technique	27 (26.2)	14 (13.6)	4 (3.9)	2 (1.9)	47 (45.6)
Reversal technique	29 (28.1)	20 (19.4)	6 (5.8)	1 (0.9)	56 (54.4)
Total	56 (54.4)	34 (33.0)	10 (9.7)	3 (2.9)	103 (100.0)

Table 4. Bone healing duration in digital replantations – number of fingers (%)

Technique of fixation using K-wires	Bone healing duration (weeks)				Total	Average (weeks)
	6	7	8	9		
Standard technique	7 (6.8)	12 (11.6)	29 (28.2)	2 (1.9)	50 (48.5)	7.5
Reversal technique	11 (10.7)	19 (18.4)	22 (21.4)	1 (1)	53 (51.5%)	7.2
Total	18 (17.5)	31 (30.1)	51 (49.5)	3 (2.9)	103 (100.0)	7.4

Table 5. Functional outcome using Tamai criteria – number of fingers (%)

Functional outcome	Tamai score				Total
	Excellent	Good	Satisfactory	Bad	
Clean cut	15 (14.6)	5 (4.8)	/	/	20 (19.4)
Local crush	15 (14.6)	31 (30.1)	18 (17.5)	2 (1.9)	66 (64.1)
Avulsion	/	9 (8.7)	1 (1.0)	/	10 (9.7)
Crush	/	/	5 (4.8)	2 (1.9)	7 (6.8)
Total	30 (29.2)	45 (43.6)	24 (23.3)	4 (3.8)	103 (100.0)

Table 6. Functional outcome according to the type of osteofixation using K-wires – number of fingers (%)

Type of fixation	Tamai score				Total
	Excellent	Good	Satisfactory	Bad	
Standard technique	14 (13.6)	22 (21.4)	10 (9.7)	1 (0.97)	47 (45.6)
Reversal technique	16 (15.5)	23 (22.3)	14 (13.6)	3 (2.9)	56 (54.4)
Total	30 (29.1)	45 (43.7)	24 (23.3)	4 (3.9)	103 (100.0)

Functional outcome of replantations by Tamai criteria (Table 6) showed that there was no statistically significant difference between standard and reversal osteofixation technique using K-wires (Kruskall-Wallis $H=33.8623$, $p<0.01$).

DISCUSSION

For successful replantation, type of the injury and possibility for structural reconstruction are most important factors. Many factors may have significant influence. Bone fixation requires the best choice of method, taking into account the level of amputation and type of injury. In addition, the precise use of technique is required. Fracture healing in digital replantation takes 4-12 weeks [8]. Depending on the osteofixation type, an average duration of fracture healing is 9 weeks in osteofixation with two parallel K-wires. Fixation with interosseous wire takes 8.1 weeks and fixation with

combination of oblique K-wire and interosseous wire takes 7.9 weeks [8]. The type of phalanx fixation in digital replantation has influence on: operation duration, possibility of early movements and functional recovery of replanted finger [3-7]. Meta-analysis of various series of digital replantation and revascularization shows variable success, 35%-100% [7]. Functional evaluation in presented series reveals success in 67%, presenting the score of group I and II according to Tamai criteria. Postreplantation surgery ranged from 2.9-93.2%, and an average number of secondary procedures per patient was 1-4.5. Joint procedures and skeletal stabilization accounted for 18.9% and 12%, respectively [2]. Later bone interventions were not performed in the presented series. Bone complications of replantations may be as high as 20.45% and they include nonunion of bone fragments, K-wires migration and infection [9].

Complications of bone healing in presented series were recorded in 12.6%, including the nonunion and malposition.

The technique of reversal phalanges fixation using K-wires was applied among patients with digital replantation, at the level of phalanges, metacarpal and carpal bones. The technique is simple and makes no harm to soft tissue of replanted finger in any way. The success would be the same if one wire intramedullary, two wires intramedullary, two wires intramedullary and parallel or two crossed wires were applied. If one K-wire was inserted, the unstable rotational condition of the bone would be corrected by suturing the joint capsula, tendons, extensors and, finally, the skin (operative wound).

The longest bone shortening was 31 mm. There was only one patient who had shortening longer than 20 mm. Literature reports shortenings up to 40 mm in some cases of replantation. There are only minor disturbances in digital growth after the replantation; reduction of 14%, compared to the normal growth, has been reported. There were few cases where replanted finger grew so much, that it was longer than healthy fingers on the opposite hand [10]. In our series, only one case of excessive growth after the replantation was documented. The proper skeletal fixation of fragments in functional position is important for successful functional recovery and also for successful revascularization and reconstruction [1, 10, 11, 12]. Many authors think that the K-wires technique is an optimal solution for phalangeal fixation in digital replantation [3, 13-16]. Oblique K-wire with interosseous wire is also a frequent method [6].

Our research shows that, although slightly bigger number of good results is seen in the group of replantations with reversal phalanges fixation, this difference is not statistically significant. Modified-reversal technique of fixation using K-wires is a valid alternative to standard technique of placing K-wires in bone fixation during the digit replantation, from the aspect of duration of fragment healing and final functional outcome.

REFERENCE

1. Sud V, Freeland AE. Skeletal fixation in digital replantation. *Microsurgery*. 2002; 22:165-71.
2. Wang H. Secondary surgery after digit replantation: its incidence and sequence. *Microsurgery*. 2002; 22:57-61.
3. Toulaitos AS, Soucacos PN, Beris AE, Zoubos AB, Koukoubis TH, Makris H. Alternative techniques for restoration of bony segments in digital replantation. *Acta Orthop Scand*. 1995; 66(264):19-22.
4. Goldner DR, Urbaniak JR. Replantation. In: Green HPW. *Green's Operative Hand Surgery*. 5th ed. Philadelphia: Elsevier; 2005. p.1569-86.
5. Goldner DR, Urbaniak JR. Replantation. In: Wolfe SW, Hotchkiss RN, Pederson WC, Kozin SH, editors. *Green's Operative Hand Surgery*. 6th ed. Philadelphia: Elsevier; 2011. p.877-88.
6. Mardini S, Chen KT, Wei FC. Replantation of digits. In: Moran LS, Cooney PW, editors. *Master Techniques in Orthopaedic Surgery: Soft Tissue Surgery*. New York: Lippincott Williams & Wilkins; 2009. p.483-98.
7. Urbaniak JR, Hayes GH, Bright DS. Management of bone fixation in digital replantation: free vascularized and composite bone grafts. *Clin Orthop*. 1978; 133:184-92.
8. Stepanov GA, Vishniakova NP, Suleimanov AA. [Osteosynthesis methods in the replantation of the fingers and segments of the hand]. *Ortop Travmatol Protez*. 1987(12):29-31. [Article in Russian]
9. Cheng HS, Wong LY, Chiang LF, Chan I, Yip TH, Wu WC. Comparison of methods of skeletal fixation for severely injured digits. *Hand Surg*. 2004; 9(1):63-9.
10. Ikeda K, Yamauchi S, Hashimoto F, Tomita K, Yoshimura M. Digital replantation in children: a long-term follow-up study. *Microsurgery*. 1990; 11:261-4.
11. Vishniakova NP, Stepanov GA, Suleimanov AA. [Osteosynthesis in the replantation of the fingers and segments of the hand (a review of the literature)]. *Khirurgiia (Mosk)*. 1988 Aug;(8):134-6. [Article in Russian]
12. Beris AE, Lykissas MG, Korompilias AV, Mitsionis GI, Vekris MD, Kostas-Agnantis IP. Digit and hand replantation. *Arch Orthop Trauma Surg*. 2010; 130(9):1141-7.
13. Bicknell RT, MacDermid J, Roth JH. Assessment of thumb metacarpophalangeal joint arthrodesis using a single longitudinal K-wire. *J Hand Surg Am*. 2007; 32(5):677-84.
14. Han SK, Roh SY, Kim JS, Lee DC, Ki SH, Yang JW. A comparative study of range of motion with or without distal interphalangeal joint fixation in replantation of the amputated fingertips. *J Korean Soc Microsurg*. 2011; 20(1):18-25.
15. Al-Qattan MM. K-wire fixation for extraarticular transverse/short oblique fractures of the shaft of the middle phalanx associated with extensor tendon injury. *J Hand Surg (Eur Vol)*. 2008; 33(5):561-5.
16. Irisarri C. Osteosynthesis in replantation surgery. In: Herren DB, Nagy L, Campbell DA, editors. *Osteosynthesis in the Hand: Current Concepts*. FESSH Instructional Course 2008. Basel: Karger; 2008. p.89-98.

CONCLUSION

Osteofixation using K-wires in digital replantation, with the use of reversal, modified technique (where the tops of the wires are pulled out proximally) is not different in comparison to standard technique (where the tops of the wires are drawn out from the distal part of the finger), from the aspect of bone healing, fragments fixation and the healing duration.

With standard technique, during pulling out the K-wires through the skin in replanted part of the finger, surgeon cannot avoid even the slightest injury of the soft tissues and it certainly has effect on postoperative period and outcome of replantation. Reversal technique means that the wires are pulled out of the skin in proximal part of the stump through the tissue which does not suffer the consequences of hypoxia and traumatic soft-tissue damage. Reversal technique completely prevents potential iatrogenic damage of soft tissues and, in particular, of the veins in distal, replanted part.

Based on presented results and our previous results of the use of both techniques, we find that reversal-modified technique has a conceptual advantage compared to the standard technique of bone fixation using K-wires, which enables a valuable alternative choice in operative techniques for fixation of hand bones during the replantations.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by the Ministry of Education, Science and Technological Development of the Republic of Serbia – Grant No III 41004 and Grant No 175095.

The figures in this paper are made by the academic sculptor Nikola Kolja Milunović.

Процена реверзне остеофиксације применом К-игала у реплантацији прста

Чедомир Вучетић^{1,2}, Зоран Вукашиновић^{2,3}, Марко Бумбаширевић^{1,2}, Радован Манојловић^{1,2}, Чедо Вучковић¹, Горан Тулић^{1,2}, Душко Спасовски^{2,3}, Александар Тодоровић¹

¹Клиника за ортопедску хирургију и трауматологију, Клинички центар Србије, Београд, Србија;

²Медицински факултет, Универзитет у Београду, Београд, Србија;

³Институт за ортопедску хирургију „Бањица“, Београд, Србија

КРАТАК САДРЖАЈ

Увод Анализирана је реверзна техника фиксације употребом К-игала код реплантације прста. Упоредивани су резултати примене стандардне и реверзне технике фиксације К-иглама.

Циљ рада Циљ рада је био да се упореде резултати остеофиксације К-иглама код реплантација прстију применом стандардне технике и реверзне – модификоване технике.

Методе рада Ретроспективна студија је обухватила 103 реплантирана прста код 72 пацијента. Прва група обухватала је стандардну фиксацију К-иглама, а друга фиксацију К-иглама применом модификоване технике. Модификација се састојала у обрнутом редоследу потеза током фиксације фаланги у поређењу са стандардном техником. Прво, К-игла се уводи интрамедуларно у проксималну фалангу и врх игле се изводи кроз кожу у проксималном делу прста шаке. Друго, дистални део игле се интрамедуларно уводи у

фалангу ампутираног дела прста док игла не уђе у кортекс. Пошто К-игла не излази из кости ампутираног дела прста, не повређује мека ткива реплантираног прста и због тога се очекује бољи резултат реплантације.

Резултат Време срастања кости након реплантације прста било је краће након примене реверзне технике у поређењу с применом стандардне технике (7,2 недеље у поређењу са 7,5 недеља), али ова разлика није била статистички значајна.

Закључак Поређење стандардне и реверзне технике фиксације фаланги К-иглама код реплантације прстију показује применљивост обе технике. Реверзна техника је опција при избору хируршке технике за фиксацију костију током реплантације. Показује извесне предности и претпостављено избегавање повређивања вена.

Кључне речи: реплантација прстију; остеофиксација К-иглама; срастање кости

Influence of Different Methods of Internal Bone Fixation on Characteristics of Bone Callus in Experimental Animals

Djordje Gajdobranski^{1,2}, Milorad Mitkovic^{3,4}, Nada Vučković^{1,5}, Miroslav Milankov^{1,6}, Slobodan Jovanović⁷, Miodrag Manić⁷, Milan Mitković⁴

¹Medical Faculty, University of Novi Sad, Novi Sad, Serbia;

²Institute for Youth and Health Care of Vojvodina, Novi Sad, Serbia;

³Medical Faculty, University of Niš, Niš, Serbia;

⁴Orthopedic and Traumatology Clinic, Clinical Center, Niš, Serbia;

⁵Center for Pathology and Histology, Clinical Center of Vojvodina, Novi Sad, Serbia;

⁶Clinic of Orthopedics and Traumatology, Clinical Center of Vojvodina, Novi Sad, Serbia;

⁷Mechanical Faculty, University of Niš, Niš, Serbia

SUMMARY

Introduction Correct choice of osteosynthesis method is a very important factor in providing the optimal conditions for appropriate healing of the fracture. There are still disagreements about the method of stabilization of some long bone fractures. Critically observed, no method of fracture fixation is ideal. Each osteosynthesis method has both advantages and weaknesses.

Objective The objective of this study was to compare the results of the experimental application of three different internal fixation methods: plate fixation, intramedullary nail fixation and self-dynamisable internal fixator (SIF).

Methods A series of 30 animals were used (*Lepus cuniculus*) as experimental animals, divided into three groups of ten animals each. Femoral diaphysis of each animal was osteotomized and fixed with one of three implants. Ten weeks later all animals were sacrificed and each specimen underwent histological and biomechanical testing.

Results Histology showed that the healing process with SIF was more complete and bone callus was more mature in comparison to other two methods. During biomechanical investigation (computerized bending stress test), it was documented with high statistical significance that using SIF led to stronger healing ten weeks after the operation.

Conclusion According to the results obtained in this study, it can be concluded that SIF is a suitable method for fracture treatment.

Keywords: intramedullary nail fixation; plate fixation; self-dynamisable internal fixator; experimental animals

INTRODUCTION

Compared to other tissues and organs, the skeletal system has a significant regeneration potential. Fracture healing is an extremely complex interaction of cells, biologic pathways, and molecules. Certainly, the inflammatory response is one of the initiating factors of bone healing [1, 2]. Although the regenerative potential of bone tissue is very high, the healing process is disturbed in 5% to 10% of cases which can result in delayed union or nonunion [3-7]. Considering the frequency of fractures, high incidence of healing disorders identifies a significant problem in modern traumatology. Animal models of fracture consolidation are fundamental for understanding of biological process of bone repair in humans [8].

There are several factors that may cause disorders in fracture healing: the severity of the wound, i.e. degree of damage to the surrounding soft tissue, degree of dislocation and fragmentariness, infection, loss of bone tissue, fracture stability, fragment distraction, bone

vascularization after trauma, patient's age, diet, etc. It is important to mention that insufficient vascularization, caused by trauma that led to fracture, can also be seriously damaged by the operative treatment, i.e. the selection of osteosynthesis method as well as the surgical technique, can significantly affect the process of healing. The surgical technique, osteosynthesis method, stability of fracture and infection are factors that can be controlled by an orthopedic surgeon in the process of appropriate fracture healing.

Correct choice of osteosynthesis method is a very important factor in providing the optimal conditions for appropriate healing of the fracture. There are still disagreements about the method of stabilization of some long bone fractures. Critically observed, no method of fracture fixation is ideal.

Considering the importance of the problem of delayed union and nonunion of bone fractures from the medical and socio-economical perspective, a great number of studies, both clinical and experimental, are justified because

Correspondence to:

Djordje GAJDOBRANSKI
Institute for Youth and Health
Care of Vojvodina
Hajduk Veljkova 10
21000 Novi Sad
Serbia
dr.gajdobranski@gmail.com

they help improve the existing and development of new methods of osteosynthesis with the aim of solving this great problem of modern traumatology.

In this work, an experimental model was used for performing an indirect comparison of three methods of the internal fixation by analyzing the histological and biomechanical characteristics of bone callus. The first two methods, intramedullary nail and plate osteosynthesis represent standard procedures for treating long bone fractures. The third method, the application of self-dynamisable internal fixator (SIF), represents a novelty that unites positive characteristics of the external fixation and the internal osteosynthesis.

OBJECTIVE

The aim of this study was to compare the results of the experimental application of three different internal fixation methods: plate fixation, intramedullary nail fixation and SIF.

METHODS

Experimental model

Healthy rabbits (*Lepus cuniculus*, i.e. *Lepus canis*, order: *Lagomorpha*), type Chinchilla, were used as experimental animals, which provided approximately equal genetic characteristics, including the reaction to trauma and infection. Both sexes were used equally, with similar weight and age. All rabbits were sexually mature, with average age of 6 months (5 to 7 months), of approximately similar weight (average weight 1420g), and raised under equal conditions.

The experimental work included operative treatments on thigh-bones of experimental animals (total of 30 rabbits), followed by monitoring the process of healing by histological analysis and biomechanical examination. The femur was selected for two reasons: first, because of the use of new implants which are examined in the healing of femoral fracture in humans, and second, because low bone density and large muscle mass predispose rabbits to femoral fractures [9].

Experimental animals were premedicated by i.m Atropine (0.02-0.04 mg/kg). Introduction and maintenance of general anesthesia was performed by administering 5%

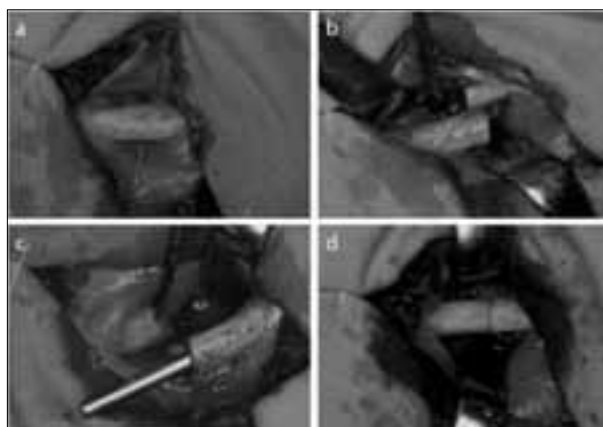


Figure 1a-d. Osteotomy of the rabbit femur using Gigli saw and implantation of intramedullary nail

Ketamine hydrochloride, in a dosage of 80mg/kg. The surgical treatment was completed according to the principles of asepsis and antisepsis. The operative procedures were performed on the rear right limbs, whereas some of the rear left limbs were used as controls. A lengthwise cut through the skin and subcutaneous tissue on the lateral section of the thigh enabled the access to femoral muscles. Thereafter, the fascia was separated between *Caput vertebrale m. bicipitis femoris* and *Caput pelvinum m. bicipitis femoris*, allowing the femur to be reached. All experimental animals were divided into three groups by random sampling.

In the first group – Group 1 (10 rabbits), after having separated the surrounding muscles, a transversal osteotomy was done in the middle part of the femoral diaphysis using a Gigli saw ($\phi=1$ mm), and the fracture was fixed by an intramedullary nail ($\phi=2.6$ mm) (Figure 1a-d).

In the second group of animals – Group 2 (10 rabbits), after having separated the surrounding muscles, a plate was applied which was fixed on the lateral side of the femoral bone by four screws. Then, a transversal osteotomy was performed by Gigli saw in the middle part of femoral diaphysis, between the second and the third screw (Figure 2a-c).

With the third group – Group 3 (10 rabbits), the surrounding muscles were separated and SIF was fixed on the lateral part of the femoral bone using four clamps, and then a transversal osteotomy, 1 mm in diameter, was done, in the middle part of diaphysis of the femoral bone, as described in previous two groups of animals (Figure 3a-d).

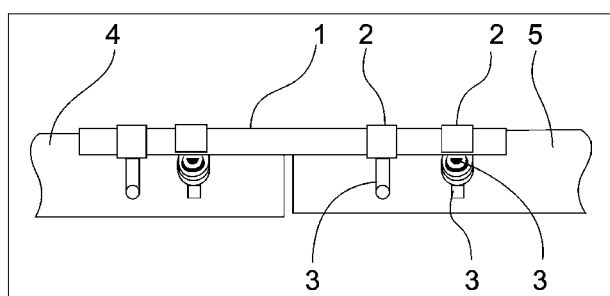
Intramedullary nails, plates, clamps, screws and the bar of the internal fixator were made of stainless steel for



Figure 2a-c. Implantation of plate and screws in rabbit femur and osteotomy by Gigli saw



Figure 3a-d. Implantation of SIF in rabbit femur and osteotomy by Gigli saw



Drawing 1. Self-dynamisable internal fixator (SIF)

implants, type 316L (ASTM F 138-2), manufactured by Traffix DOO (Serbia). Intramedullary nail was 2.6 mm in diameter and 58 mm long. Plates were 35 mm long, 6 mm wide and 1.5 mm thick with 4 holes. All screws for plates and internal fixators were cortical screws 2.5 mm in diameter and 17 mm long. Self-dynamisable internal fixator consisted of 2 mm diameter and 42 mm long bar and four clamps (Drawing 1). Each clamp (2) has a hole for the bar (1) and perpendicular hole for the screw (3). The construction of the clamps and screws provides two functions. The first is the possibility of three-dimensional fixation of each main bone fragment (4) and (5), as each clamp (2) can rotate around the bar (1), and screws (3) can be applied in convergent configuration. The second function is that the construction of each clamp and screw complex provides spontaneous axial telescoping and consequent biocompression on the fracture area. If there is no axial contact between fragments (4) and (5) on the fracture area, then muscle activity and bone fragment micromotion may lead to loosening of screws and clamps and cause spontaneous telescoping. Because of this feature - spontaneous dynamization - only in case when there is no stability of the fracture site, the implant can be regarded as an “Intelligent implant”. This implant known as self-dynamisable internal fixator (SIF) has been developed by senior author Mitkovic BM [10].

The wound was cleaned with sterile physiological solution, along with the appropriate hemostasis, and stitched along anatomic layers. Postoperatively, the rabbits were kept in separate cages, and given standard food and water. Throughout the postoperative period, daily clinical

control of the animals was performed and combined with the antibiotic therapy (Penicillin 200.000 IU/24 h i.m. and Gentamicin 4 mg/kg/24 h i.m.) during the first three postoperative days. At the beginning, the animals were moving in the cage using the operated leg without support. The clinical control included monitoring the behavior of the animals, possible food rejection, mood changes, and general veterinary examination with the inspection of the wound and recording of possible systemic and local infections.

Ten weeks after the procedure all animals were sacrificed in order to monitor the healing of the fracture according to the types of internal fixation. A disarticulation of the hip joint was done and the obtained preparations were used for further investigations.

Histological evaluation

The bone callus was taken for a histological analysis, fixed in formalin, decalcinated, and processed with standard histologic procedure. Bone cuts were made in longitudinal and transversal plane relative to the osteotomy site whereby a complete union area was obtained for analysis. Microscopic analysis was done by the light microscope.

Biomechanical evaluation

The remaining preparations, 9 from each group, were prepared for biomechanical testing by removing the surrounding tissue and osteosynthetic material (Figures 4a,b and 5). After sacrificing the experimental animals, the surrounding musculature was carefully removed from the operated bones. The femoral bones were wrapped in gauzes saturated in physiological solution, and stored in freezer at -8°C . Immediately before testing, the femoral

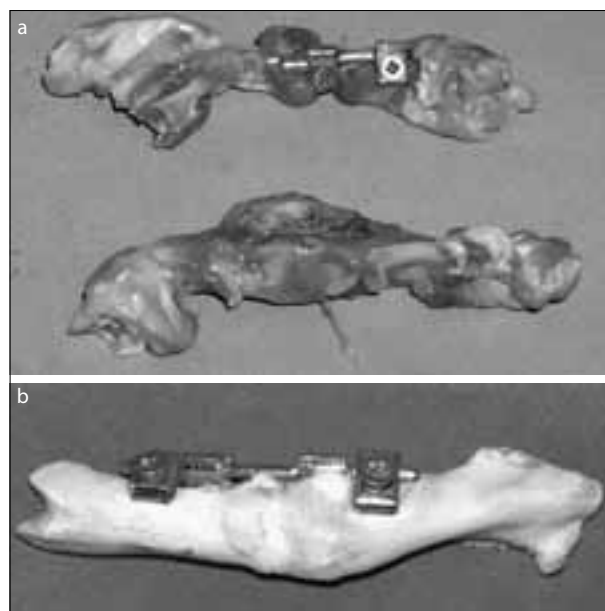


Figure 4a,b. Preparations for biomechanical testing before complete removal of muscles and osteosynthetic material

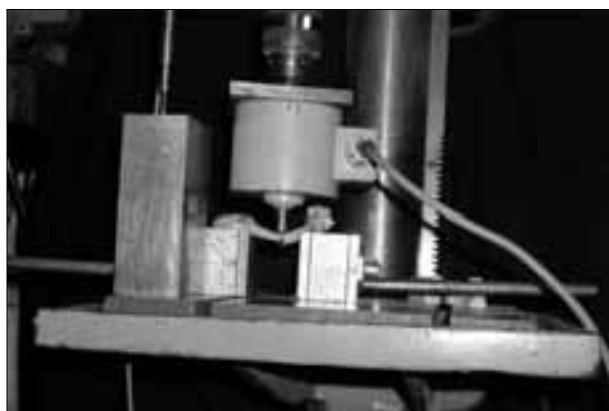


Figure 5. Mechanical testing of rabbit femur after removal of soft tissues and implants

bones were defrosted at room temperature for 24 hours, after which the osteosynthetic material was removed. At the moment of testing, the temperature of the bones after conservation was 23–25°C.

After sacrificing the animals, two femoral bones from each group were taken from the extremities that have not undergone experimental work. After removing the musculature, one femoral bone from each group underwent biomechanical testing a few hours later, in order to obtain the parameters of healthy, fresh bones. Other healthy femoral bones, one from each of three groups, were prepared in the same manner as the operated bones and stored in the freezer along with the operated bones with the aim of obtaining the parameters of healthy, conserved bones.

The biomechanical characteristics of the bones were tested at the Measurement Laboratory of the Faculty of Mechanical Engineering in Nis.

The measurement techniques used in the experiment

Electrical methods of measuring of mechanical quantities were used to test the strength of the bones. Equipment included: measurement transducer, amplifier and registration device. The following devices were used in the experiment: force measurement cell (sensor) U1/50 kg, manufactured by Hottinger Baldwin Messtechnik GmbH, Germany, path measurement cell (sensor) W20 TK, manufactured by Hottinger Baldwin Messtechnik GmbH, Germany, measurement amplifier DMC 9012A with 6 channels manufactured by Hottinger Baldwin Messtechnik GmbH, Germany, and measurement computer Notebook 520 C manufactured by Apple-McIntosh with BEAM software ver. 3.1 manufactured by Hottinger Baldwin Messtechnik GmbH, Germany.

RESULTS

After the removal of osteosynthetic material, histological analysis of the callus was performed, along with biomechanical testing.

Histology

Histological analysis of bone callus in Group 1

There were areas of necrosis at osteotomy site but with no signs of fresh bleeding and with necrosis of the bone marrow fat tissue (Figure 6a). Proliferated bone trabeculae with equal width and irregular distribution were found around necrosis foci (Figure 6b). An incomplete layer of osteoblasts was located around the bone trabeculae. The periosteum was focally thickened, with unequal width and with newly formed hyaline cartilage of irregular width (Figure 6c). The endosteal reaction included an incomplete scope of proliferated, hyperplastic osteoblasts.

Histological analysis of bone callus in Group 2

At osteotomy site, there were tiny bone fragments of various sizes and shapes with an incomplete layer of osteoblasts (Figure 7a). Bone marrow was edematous with foci of fat tissue necrosis and slightly fibrosed. Periosteal reaction was composed of proliferated hyaline cartilage with the signs of endochondral ossification (Figure 7b). The zone of endochondral ossification was wide and distinctive but with less regular distribution of chondrocytes (Figure 7c). Endosteal reaction was composed of an incomplete order of osteoblasts distributed around bone trabeculae.

Histological analysis of bone callus in Group 3

Bone trabeculae at osteotomy site were of various size and shape, surrounded by the line of osteoblasts (Figure 8a). In the bone marrow, one part of fat tissue was replaced by proliferated connective tissue. Towards the cortical bone, the bone trabeculae were more regularly positioned and they were distributed parallel to the cortex (Figure 8b). Outside of osteotomy site the bone had normal morphological appearance with preserved bone marrow which was fatty and hematopoietically active. The periosteum within osteotomy area was thickened and elevated above the cortical part of the bone (Figure 8c). Between the connective tissue of the periosteum and the cortical part of the bone, there was a layer of hyaline cartilage with the signs of proper endochondral ossification. Endosteal reaction was composed of multiplied and hyperplastic osteoblasts around the newly formed bone trabeculae.

Biomechanical testing

Following the sacrificing of the animals, two femoral bones were taken from each group that had not undergone experimental work. After removing the surrounding tissue, one femoral bone from each group was subjected to few hours of biomechanical testing. The remaining bones were tested biomechanically after defrosting, along with the operated femoral bones. After the application of load,

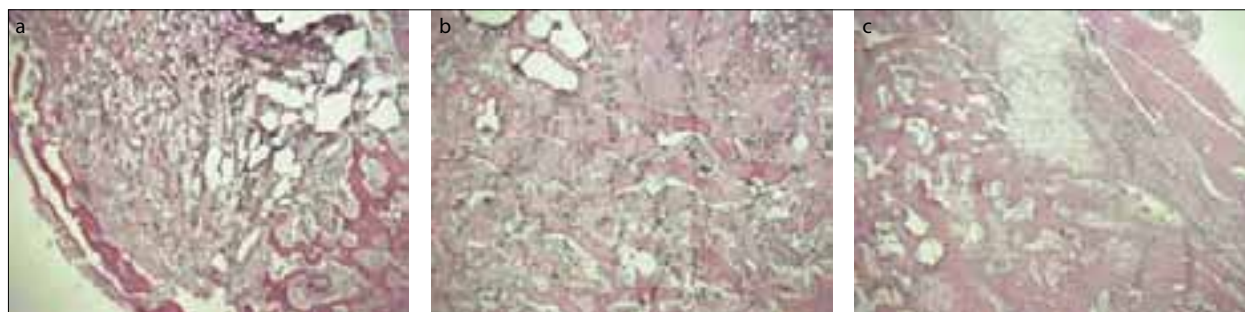


Figure 6a-c. Histological characteristics of callus – Group 1



Figure 7a-c. Histological characteristics of callus – Group 2

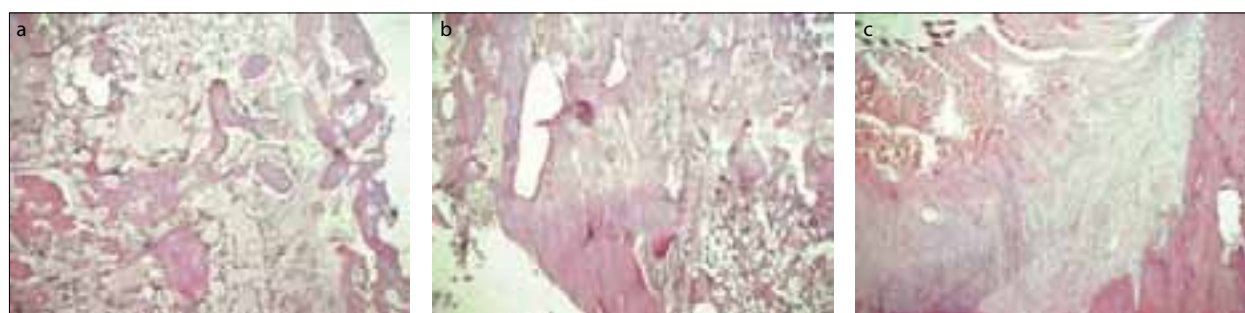


Figure 8a-c. Histological characteristics of callus – Group 3

fracture occurred at a certain moment, depending on the acquired firmness of the callus, i.e. the newly formed bone.

The average quantity of force necessary to cause fracture of a healthy fresh rabbit femoral bone was 350 N, whereas the average quantity of force necessary to cause fracture of a healthy conserved bone was 325 N.

The average value of deflection before the moment of fracture of healthy fresh rabbit femoral bone due to force was 1.5 mm, whereas the average value of deflection of healthy conserved bone due to force was 1.45 mm.

The average value of time necessary for the effect of force to lead to the fracture of a healthy fresh rabbit femoral bone was 4.8s, whereas the average value of time needed for the fracture of a healthy conserved bone due to the effect of force is 2.7 seconds.

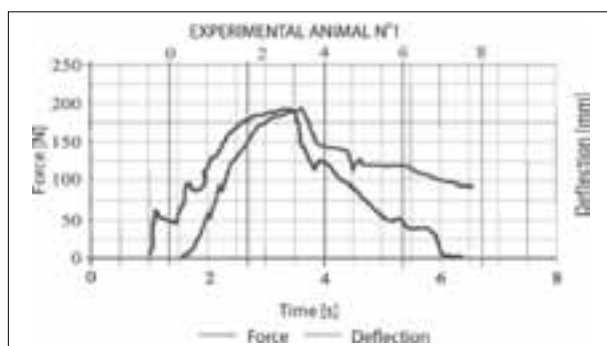
The results of biomechanical testing of union in Group 1

Out of nine preparations, biomechanical testing was performed in eight. The remaining preparation was not tested because complete disintegration was verified. Biomechanical testing of eight preparations provided the following

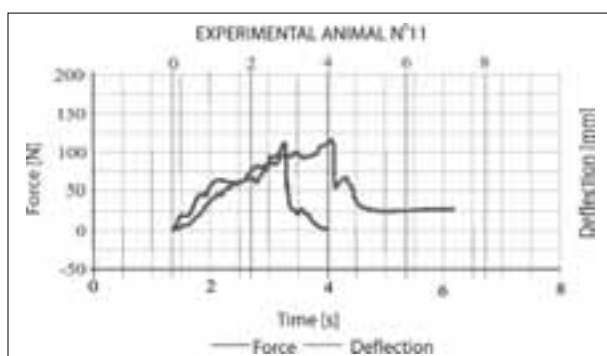
values: average value of force necessary for the fracture of femoral bone was 173.75 N; average value of deflection of the femoral bone due to force was 3.64 mm; average value of time the effect of force needed to cause the fracture of the femoral bone was 3.26 s. Graph 1 shows the results of biomechanical testing of experimental animal number 1.

The results of biomechanical testing of union in Group 2

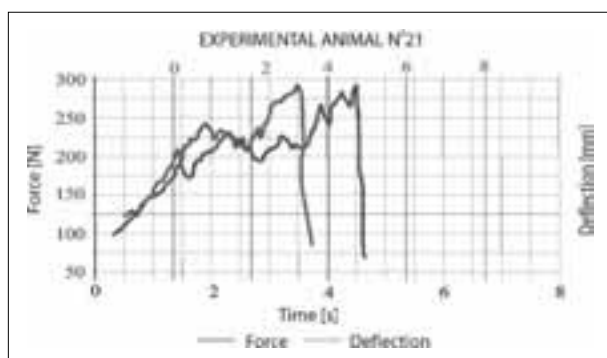
Out of nine preparations, the biomechanical testing was performed in seven. Two preparations were not tested because one was found to be completely disintegrated while femoral bone nonunion was evident in another, i.e. pseudarthrosis was found after the removal of plate. The biomechanical testing of seven preparations provided the following values: average value of force necessary for the fracture of femoral bone was 92.86 N; average value of deflection of the femoral bone due to force was 4.03 mm; average value of time the effect of force needed to cause the fracture of the femoral bone was 4.63 s. Graph 2 shows the results of biomechanical testing of experimental animal number 11.



Graph 1. The result of biomechanical testing of experimental animal number 1



Graph 2. The result of biomechanical testing of experimental animal number 11



Graph 3. The result of biomechanical testing of experimental animal number 21

The results of biomechanical testing of union in Group 3

Biomechanical testing was done with eight preparations. The preparation with a complete disintegration was not tested. The biomechanical testing provided the following values: average value of force necessary for the fracture of femoral bone was 273.75 N; average value of deflection of the femoral bone due to force was 5.06 mm; average value of time the effect of force needed to cause the fracture of the femoral bone was 4.46 s. Graph 3 shows the results of biomechanical testing of experimental animal number 21.

DISCUSSION

This work uses experimental models in order to perform an indirect comparison of three methods of the internal

fixation by analyzing the histological and biomechanical characteristics of bone callus. The first two methods, the intramedullary nail osteosynthesis and plate osteosynthesis are part of standard procedures of long bone fracture treatment. The third method, the application of SIF, represents a novelty that combines positive characteristics of the external fixation and plate osteosynthesis [10].

Choosing an experimental animal model is suitable for further development of trauma implant. Isaksson and associates have shown recently [11] that during the remodeling phase of fracture healing in mice, the callus gradually transforms into a double cortex, which thereafter merges into one cortex. In large animals, a double cortex normally does not form. The effects of biological differences between species or other reasons cannot be excluded, but this study demonstrates how the difference in loading mode can explain the differences between the remodeling phase in small rodents and larger mammals.

The use of locked bridge plating relies on secondary bone healing, which requires interfragmentary motion for callus formation. Recent study by Bottlang et al. [12] evaluated healing of fractures stabilized with the locked plating construct and far cortical locking construct, which is a modified locked plating approach that promotes interfragmentary motion. The study tested whether far cortical locking constructs can improve fracture-healing compared with standard locked plating constructs. They used ovine tibial osteotomy model stabilized with locked plating or far cortical locking constructs applied medially where the far cortical locking constructs were designed to provide 84% lower stiffness than the locked plating constructs and permitted nearly parallel gap motion. Fracture healing was monitored on weekly radiographs. After the animals were sacrificed at week 9, healed tibiae were analyzed by computed tomography, mechanical testing in torsion, and histological examination.

The results showed that callus on weekly radiographs was greater in the far cortical locking constructs than in the locked plating constructs. Callus in the locked plating specimens was asymmetric, having 49% less bone mineral content in the medial callus than in the lateral callus. In far cortical locking specimens, medial and lateral callus had similar bone mineral content. The far cortical locking specimens healed to be 54% stronger in torsion. They concluded that inconsistent and asymmetric callus formation with locked plating constructs was likely due to their high stiffness and asymmetric gap closure. By providing flexible fixation and nearly parallel interfragmentary motion, far cortical locking constructs formed more callus and healed to be stronger in torsion than locked plating constructs. However, the influence of the mechanical stability of individual stabilization techniques on the molecular mechanisms of fracture healing has not been completely elucidated yet [13]. Another recent experimental study investigated the effect of an intramedullary suction system on the pressure and fat extravasation in isolated bovine bone and sheep model [14]. The suction system appears to control the surge in intramedullary pressure and therefore prevent fat embolism.

In our study, intramedullary nail without a locking system was used as it is difficult to provide such a small interlocking system. Thus, the contact between fragments in osteotomized bone is not prevented, thereby providing possibility for better healing. On the other hand, the IM nail is rotation-unstable. Schoen and associates have recently developed a new intramedullary, rotation-stable locking device, usable in standardized osteotomized rat femurs, and evaluated it biomechanically and in vivo for maintenance of a critical-size osteotomy gap in a model of conscious pseudarthrosis [15]. Previously, stabilization of osteotomies in small animal models has mainly been accomplished by Kirschner wires, but the rat's tremendous ability to heal an osteotomy stabilized by this method has masked the effects of osteoinductive agents. Russell and associates in their study propose a modified 20-hole, 1.5-mm stainless-steel plate to stabilize 5-mm segmental defect [16]. Instability of fixed osteotomized bone prolongs the chondral phase during the bone healing [17]. In this study, sixty-four sheep underwent mid-shaft tibial osteotomy that was treated either with rigid or semi-rigid external fixator. Animals were sacrificed at 2, 3, 6 and 9 weeks postoperatively and the fracture calluses were analyzed using radiological, biomechanical and histological techniques. The mechanical competence of the healing callus at 6 weeks was inferior compared to tibiae treated with rigid fixation. Semi-rigid fixation resulted in a larger cartilage component of the callus, which persisted longer. Remodeling processes were initiated earlier in the rigid group, while new bone formation continued throughout the entire investigation period in the semi-rigid group. This study provided evidence that less rigid fixation increased the time required for healing. The process of intramembranous ossification that appeared during the initial stages of healing proved to be independent of mechanical stability. However, the delay in healing was related to prolonged chondral phase.

Using intramedullary nail in studies on experimental animals can often lead to implant failure due to small nail diameter. In order to prevent this experimental complication, Durall and associates conducted a study [18] in which they determined bone healing at 20 weeks, after either static fixation (SG) or dynamization (DG) at 4 weeks in osteotomized canine femurs repaired with the interlocking nail (ILN) secured with a type I external skeletal fixator (ESF). They found that ILN locked with a type I ESF can be used for fixation of mid-shaft femoral fractures. Dynamization at 4 weeks did not affect bone healing but prevented stifle ankylosis and promoted earlier limb function. These experimental results can influence further development in diaphyseal femoral fractures even in human traumatology.

Regarding biomechanical testing and evaluation of healing of the experimentally osteotomized animal long bones, the torsion test [12] or bending stiffness measurement [19] are most commonly used. In our study, we used the bending stiffness test.

During the healing process, experimental osteotomy model shows changes in biomechanical characteristics. Our results are similar to the results obtained in canine

model [20] but vary in terms of the fixation methods being used.

Recently, new internal fixing materials made from shape-memory alloys (SMAs) have been used for long bone fracture [21]. The implant was designed in a shape to circumferentially fix the fractured bone using resilient SMA claws. Fifteen female Wistar rats were treated surgically as an experimental model. All rats were sacrificed at 16 weeks postoperatively, and radiological and histological evaluations were performed. In biomechanical test, good fixation ability of the implant was demonstrated. In animal model, there were no cases of postoperative infection or death and postoperative gait was stable in all cases. Radiological examination at 16 weeks postoperatively demonstrated the implant firmly fixed to the fractured part, endosteal healing, and no callus formation in all cases. In the histological evaluation, bone union in all cases was characterized by endochondral ossification from within the medullary cavity. Union was achieved in all 15 rats. However, such large plate-like implants are even more suitable from the biomechanical point of view. It separates muscles from pretty big bone surface and also needs more testing on bigger animals to prove that healing is comparable with methods which preserves periosteum.

Histomorphometric (quantitative) evaluation of the present study was shown to be compatible with bone healing achieved in qualitative experimental models that have been found in literature. The analysis of histological preparations with tested methods of the internal fixation in our study has demonstrated that, contrary to other methods of internal fixation, the preparation in which, after osteotomy the bone fragments have been stabilized by SIF for ten weeks, has the callus possessing the histological characteristics which show that the process of bone healing is partly finished and that in these cases the callus has acquired morphological characteristics of healthy mature bone.

During the defined periods of application, the method of SIF osteosynthesis has demonstrated the best results in biomechanical testing. In other words, there is a statistically significant difference between SIF and other methods of internal fixation. Within biomechanical testing, it was necessary to apply the greatest amount of force in order to cause fracture of the rabbit femoral bone in which SIF was applied after osteotomy for a period of ten weeks. The obtained values are very close to the values provided by the mechanical testing of healthy conserved rabbit femoral bone. We have explained it by the feature of SIF because over time screws and clamps become a little bit loose, thus contributing to more implant elasticity and possibility of telescoping (compression by muscles force) which is desirable in later stages of bone healing.

CONCLUSION

According to the results obtained in this study, it can be concluded that SIF is a suitable method for the treatment of fractures as it has more advantages over plate and intramedullary nail fixation.

REFERENCES

1. Pape HC, Marcucio R, Humphrey C, Colnot C, Knobe M, Harvey EJ. Trauma-induced inflammation and fracture healing. *J Orthop Trauma*. 2010; 24(9):522-5.
2. Gajdobranski Dj, Živković D. Disorders in fracture healing. *Med Pregl*. 2003; 56(1-2):39-42.
3. Boer FC, Patka P, Bakker FC, Haarman HJThM. Current concepts of fracture healing, delayed unions, and nonunions. *Osteosynthesis and Trauma Care*. 2002; 10:1-8.
4. Runkel M, Rommens PM. Pseudoarthrosen. *Unfallchirurg*. 2000; 103:51-63.
5. Rüter A, Mayer E. Pseudoarthrosen. *Chirurg*. 1999; 70:1239-45.
6. Hulth A. Current concepts of fracture healing. *Clin Orthop*. 1989; 249:265-84.
7. Gajdobranski Dj, Micić I, Mitković M, Mladenović D, Milankov M. Management of impaired fracture healing: historical aspects. *Med Pregl*. 2005; 58(9-10):507-12.
8. Matos MA, Araújo FP, Paixão FB. Histomorphometric evaluation of bone healing in rabbit fibular osteotomy model without fixation. *J Orthop Surg Res*. 2008; 3:4.
9. Reuter JD, Ovadia S, Howell P, Jaskwich DH. Femoral fracture repair and postoperative management in new zealand white rabbits. *Contemp Top Lab Anim Sci*. 2002; 41(4):49-52.
10. Mitković M, Bumbaširević M, Golubović Z, Mladenović D, Milenković S, Micić I, et al. New biological method of internal fixation of the femur. *Acta Chir Iugosl*. 2005; 52:113-6.
11. Isaksson H, Gröngroft I, Wilson W, van Donkelaar CC, van Rietbergen B, Tami A, et al. Remodeling of fracture callus in mice is consistent with mechanical loading and bone remodeling theory. *J Orthop Res*. 2009; 27(5):664-72.
12. Bottlang M, Lesser M, Koerber J, Doornink J, von Rechenberg B, Augat P, et al. Far cortical locking can improve healing of fractures stabilized with locking plates. *J Bone Joint Surg Am*. 2010; 92(7):1652-60.
13. Histing T, Holstein JH, Garcia P, Matthys R, Kristen A, Claes L, et al. Ex vivo analysis of rotational stiffness of different osteosynthesis techniques in mouse femur fracture. *J Orthop Res*. 2009; 27(9):1152-6.
14. Smith PN, Leditschke A, McMahon D, Sample RR, Perriman D, Prins A, et al. Monitoring and controlling intramedullary pressure increase in long bone instrumentation: a study on sheep. *J Orthop Res*. 2008; 26(10):1327-33.
15. Schoen M, Rotter R, Schattner S, Mittlmeier T, Claes L, Vollmar B, et al. Introduction of a new interlocked intramedullary nailing device for stabilization of critically sized femoral defects in the rat: A combined biomechanical and animal experimental study. *J Orthop Res*. 2008; 26(2):184-9.
16. Russell G, Tucci M, Conflitti J, Graves M, Wingerter S, Woodall J Jr, et al. Characterization of a femoral segmental nonunion model in laboratory rats: report of a novel surgical technique. *J Invest Surg*. 2007; 20(4):249-55.
17. Epari DR, Schell H, Bail HJ, Duda GN. Instability prolongs the chondral phase during bone healing in sheep. *Bone*. 2006; 38(6):864-70.
18. Durall I, Falcón C, Díaz-Bertrana MC, Franch J. Effects of static fixation and dynamization after interlocking femoral nailing locked with an external fixator: an experimental study in dogs. *Vet Surg*. 2004; 33:323-32.
19. Hente R, Füchtmeier B, Schlegel U, Ernstberger A, Perren SM. The influence of cyclic compression and distraction on the healing of experimental tibial fractures. *J Orthop Res*. 2004; 22(4):709-15.
20. Hara Y, Nakamura T, Fukuda H, Harada Y, Nezu Y, Tagawa M. Changes of biomechanical characteristics of the bone in experimental tibial osteotomy model in the dog. *J Vet Med Sci*. 2003; 65(1):103-7.
21. Kawakita E, Wang Z, Kato T, Inaba T, Kasai Y. Basic research on a cylindrical implant made of shape-memory alloy for the treatment of long bone fracture. *Open Orthop J*. 2012; 6:239-44.

Утицај различитих метода унутрашње фиксације костију на особности коштанога калуса експерименталних животиња

Ђорђе Гајдобрански^{1,2}, Милорад Митковић^{3,4}, Нада Вучковић^{1,5}, Мирослав Миланков^{1,6}, Слободан Јовановић⁷, Миодраг Манић⁷, Милан Митковић⁴

¹Медицински факултет, Универзитет у Новом Саду, Нови Сад, Србија;

²Институт за здравствену заштиту деце и омладине Војводине, Нови Сад, Србија;

³Медицински факултет, Универзитет у Нишу, Ниш, Србија;

⁴Клиника за ортопедију и трауматологију, Клинички центар, Ниш, Србија;

⁵Центар за патологију и хистологију, Клинички центар Војводине, Нови Сад, Србија;

⁶Клиника за ортопедију и трауматологију, Клинички центар Војводине, Нови Сад, Србија;

⁷Машински факултет, Универзитет у Нишу, Ниш, Србија

КРАТАК САДРЖАЈ

Увод Избор методе остеосинтезе је веома важан фактор у обезбеђивању оптималних услова за одговарајуће зарастање прелома кости. И даље постоје неслагања око методе стабилизације прелома дугих костију. Критички посматрано, ниједна метода фиксације коштаних уломака није идеална; свака метода остеосинтезе има и предности и недостатке.

Циљ рада Циљ овог рада је био да се упореде резултати експерименталне примене три различите методе унутрашње фиксације: интрамедуларне фиксације клином, фиксације плочицом и фиксације самодинамизирајућим унутрашњим фиксатором (СИФ).

Методе рада Као експериментална животиња коришћен је кунџ (Lepus cuniculus). Укупно је 30 животиња сврстано у три групе од по десет животиња. Код сваке животиње начињене су остеотомија дијафизе бутне кост и фиксација једним од

три имплантата. Десет недеља након остеотомије и фиксације све животиње су жртвоване, а препарати су подвргнути хистолошкој анализи и биомеханичком испитивању.

Резултати Хистолошке анализе су показале да је процес зарастања био потпунији а коштани калус зрелији код животиња код којих је примењена фиксација СИФ у односу на друге две методе фиксације. Биомеханичко испитивање, компјутеризованим стрес-тестом савијања, показало је да употреба СИФ доводи до високо статистички значајно јачег коштанога зарастања у односу на друге две методе фиксације.

Закључак На основу добијених резултата може се закључити да је фиксација применом СИФ погодна метода у лечењу прелома кости.

Кључне речи: интрамедуларна фиксација клином; фиксација плочицом; самодинамизирајући унутрашњи фиксатор; експерименталне животиње

Higher Percentage of In Vitro Apoptotic Cells at Time of Diagnosis in Patients with Chronic Lymphocytic Leukemia Indicate Earlier Treatment Requirement: Ten Years Follow Up

Tamara Kravić-Stevović¹, Andrija Bogdanović^{2,3}, Vladimir Bumbaširević¹

¹Institute of Histology and Embryology, Faculty of Medicine, University of Belgrade, Belgrade, Serbia;

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

³Faculty of Medicine, University of Belgrade, Belgrade, Serbia

SUMMARY

Introduction Chronic lymphocytic leukemia (CLL) has an extremely variable clinical course. Biological reasons for that wide variation in clinical course and survival rates in CLL patients are not fully understood.

Objective The aim of the study was to evaluate the value of spontaneous apoptosis of CLL cells *in vitro* determined at presentation of disease, in prediction of treatment requirements and evolution of the CLL.

Methods Malignant B cells were isolated from the whole blood of 30 newly diagnosed CLL patients and cultured for 24 hours in RPMI-1640 medium supplemented with 10% of serum obtained from the same CLL patient. Cells were later fixed and processed for embedding in Epon, or cell smears were prepared and stained with TUNEL technique.

Results Ten-year follow-up revealed that patients with lower percentage of cells in apoptosis at presentation of disease had significant longer time treatment initiation (log rank test $p < 0.05$). On the contrary, apoptosis of CLL cells was not shown to have significant impact on survival of patients (Kaplan Meier log rank test $p > 0.05$).

Conclusion The results of this study emphasize the importance of apoptosis of CLL cells at the time of the initial diagnosis in pathobiology of this disease.

Keywords: apoptosis; chronic lymphocytic leukemia; autologous serum; prognosis; survival

INTRODUCTION

Chronic lymphocytic leukemia (CLL) is the most frequent type of leukemia in the Western world [1] and has an extremely variable clinical course with survival ranging from few months to decades [1, 2]. Biological reasons for wide variation in clinical course and survival rates of CLL patients are not fully understood; therefore, the search for prognostic factors contributing to proper management of patients with CLL has become important in the last two decades [2].

Up to now, a certain number of clinical and biological markers of prognostic relevance has been identified [3]. There are three traditional clinical prognostic factors: the clinical stage according to either Rai or Binet [4], the lymphocyte doubling time [5, 6] and bone marrow infiltration pattern [7, 8]. Two of the most reliable molecular prognostic markers are the immunoglobulin heavy chain variable (IGHV) gene mutational status and fluorescence *in situ* hybridization (FISH) detection of prognostically relevant genomic aberrations (e.g. 11q-, 13q-, +12 and 17p-) [9]. In addition to these markers, a myriad of additional biomarkers have been postulated as potential prognostic factors in CLL, proteins (e.g. CD38, ZAP70, TCL1), the RNA (e.g. LPL, CLLU1, micro-RNAs) and the genomic (e.g. TP53, NO, TCH1, SF3B1 and BIRC3 mutations) [9]. Recently,

two new biological markers, the expression of CD38 antigen and ZAP-70 have shown independent significance in prediction of prognosis in CLL patients [10]; although these prognostic factors are used currently in practice, they are time-consuming and require standardization of laboratory protocol [11]. New prognostic factors are still needed.

The neoplastic population of cells in CLL is characterized by a very low proliferative rate. The accumulation of these cells in G0 phase of the cell cycle [12, 13, 14] cannot be explained only by cell proliferation but seems to be the result of prolonged survival of these cells as well [15, 16]. Despite of their long survival *in vivo* due to an increased capacity to resist normal apoptotic signals, *in vitro* CLL cells die rapidly by apoptosis [12]. These *in vitro* findings suggest that some factors (humoral or cellular), necessary for the survival of these cells, are missing from the culture media [12]. The results of recent study [13], suggested a relationship between higher *in vitro* spontaneous apoptosis before treatment in advanced-stage patients with poor outcome.

OBJECTIVE

The aim of this study was to evaluate whether spontaneous apoptosis of CLL cells *in vitro*

Correspondence to:

Tamara KRAVIĆ-STEVOVIĆ
Institute of Histology and
Embryology
Faculty of Medicine
Višegradska 26, 11000 Belgrade
Serbia
tamarakravic@med.bg.ac.rs

determined at presentation of disease could predict the evolution of CLL.

METHODS

Thirty previously untreated patients with CLL, referred to the Institute of Hematology, Clinical Center of Serbia, University of Belgrade in 2000, were enrolled in this prospective study. They were followed up for 10 years, until 2010. This study was approved by the Ethics Committee of Medical Faculty Belgrade and the Institutional Review Board. The informed consent was obtained from all patients. Peripheral blood samples were obtained from CLL patients at the time of diagnosis, before the initiation of any treatment, and during regular diagnostic procedure. Diagnosis and clinical staging of CLL were based on the National Cancer Institute criteria (NCI) [4]. Bone marrow biopsies were available in 23 CLL patients. Evaluation of spontaneous apoptosis in CLL cells *in vitro* was performed at the Institute of Histology and Embryology, Medical Faculty of Belgrade. Patients were followed-up and treated according to the standard clinical protocol of the Institute of Hematology at the time of diagnosis (no Fludarabine based treatment). Data from medical documentation were reviewed in order to determine the time of the initiation of CLL treatment for every patient and other relevant clinical data.

Peripheral blood was collected using preservative-free heparin as the anticoagulant. Serum was withdrawn after sedimentation of coagulated blood samples obtained from all patients. Malignant B lymphocytes were isolated using sedimentation of the blood cells on Ficoll gradients (Lymphoprep®). Cells ($5 \times 10^6/\text{ml}$) were cultured in RPMI-1640 medium (Sigma®) supplemented with 10% of serum obtained from the same CLL patient (autologous serum, AS) and incubated for 24 hours, 37° C, with 5% CO₂ and 98% humidity.

Immediately after separation (0 h) and after incubation (24 h), cells were fixed and processed for embedding in Epon (Agar Scientific®). One micrometer thick sections were stained with toluidine blue for light microscopy, where apoptotic cells were identified by the presence of nuclear condensation and/or fragmentation, based on previously defined morphological criteria [17-20]. Apoptotic cells were counted in 5 randomly chosen high power fields (100x oil immersion objective), and was expressed as a percentage of a total number of counted cells (apoptotic index, AI) (Figure 1). Thin sections were mounted on copper grids and stained with uranyl acetate and lead citrate and further examined by electron microscope (Morgagni 268D).

To identify fragmented DNA, a TdT-mediated dUTP nick-end labeling (TUNEL) assay was performed on CLL cell smears. After fixation in 4% paraformaldehyde and permeabilization with 0.2% Triton X-100, cells were treated with 3% bovine serum albumin and TUNEL reaction mixture. Converter for alkaline phosphatase was applied, and Fast red was used to visualize the signal for light microscopy. TUNEL positivity was seen within the apoptotic

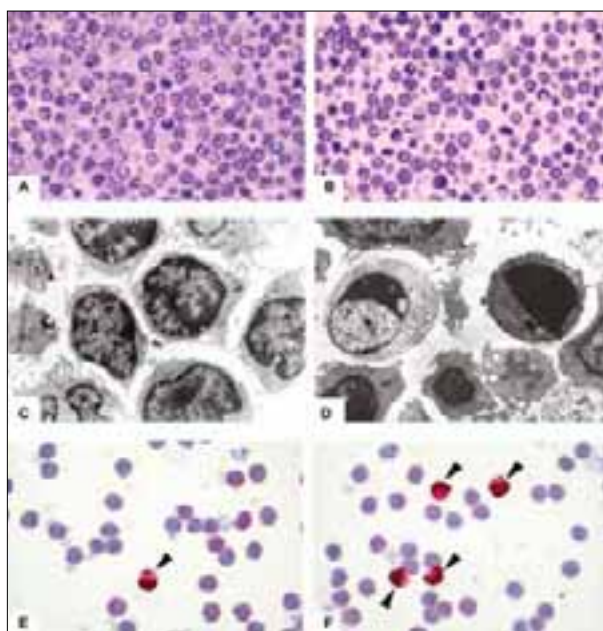


Figure 1. Freshly isolated CLL cells (A, C, E) and incubated for 24 hours (B, D, F). CLL cells on 1 μm thin section stained with toluidine blue (A, B), and viewed by electron microscopy (C, D). Number of CLL cells shows typical morphological features of apoptosis like condensation of cytoplasm and chromatin, with the formation of coarse granular chromatin masses after 24 hours incubation (B, D). TUNEL method performed on CLL cell smears, counterstained with Mayer hematoxylin (E, F). The presence of TUNEL-positive cells (nuclei stained red) is more frequent among cells incubated for 24 hours (F).

CLL cell nuclei as granular red nuclear staining (Figure 1). CLL cells were counted in 10 random high-power fields (x400) on each cell slide and the index of apoptosis was determined and expressed as percentage.

Statistics

All data were analyzed by the methods of descriptive parametric (mean, standard deviation and standard error, t-test and ANOVA) and nonparametric statistics (median, Chi square, Mann Whitney U test, Kruskal Wallis test) and also by survival analysis according to Kaplan Meier method together with Cox multivariate regression model and log rank test. All statistical tests were considered significant at level of at least $p < 0.05$. Statistical analysis was performed using licensed STATISTICA 8.0 software (StatSoft Inc, Tulsa, USA).

RESULTS

Patient characteristics

Our cohort of patients with CLL consisted of 18 men (66.7%) and 12 women (43.3%). At the time of diagnosis, the mean age of patients was 61.5 ± 8.7 years, median 62.5 years, and ranged from 42 to 81 years. At presentation of disease, the majority of patients (80%, 24 patients) was in the early phase of disease defined as low Rai stages (clinical stage 0 in 8 patients, I in 9 patients, and II in 7 evaluated

patients), while 6 patients (20%) had advanced Rai stages (3 patients had stage III and 3 patients had stage IV disease). The difference in absolute lymphocyte count between early ($35.3 \pm 56.4 \times 10^9/L$) and advanced stage CLL ($56.9 \pm 59.7 \times 10^9/L$) was noted, but this difference was not statistically significant. Bone marrow biopsy was performed in 26 patients, but quality specimen was obtained in 23 patients. Diffuse infiltration pattern was found in 6 patients. Lymphocyte doubling time (LDT) was defined according to well-defined criteria and LDT <12 months was observed in 12 patients (42.9%), and LDT >12 months was noted in 16 patients (57.1%) while there were no accurate medical records for 2 patients.

In ten-year follow up, two patients remained in indolent stage of disease and did not require any treatment, while the rest of patients required therapy either immediately after diagnosis and staging of CLL or up to 8 years of observation (in 5 of 6 patients with diffuse pattern of bone marrow, infiltration therapy was initiated in the first year of disease).

Detection of apoptosis in CLL cells at presentation of disease

Freshly isolated CLL cells from peripheral blood (0h) showed low number of apoptotic cells (AI_{0h} $3.8 \pm 1.7\%$). Apoptotic index of CLL cells cultured for 24 hours with autologous serum (AI_{24h} $17.7 \pm 9.7\%$) was significantly higher ($p < 0.05$) than in freshly isolated cells. No significant difference in the percentage of spontaneous apoptosis of CLL cells was noticed when apoptosis was measured using TUNEL technique or toluidine blue stained sections (AI_{24h} $17.7 \pm 9.7\%$ and $17.1 \pm 9.1\%$, respectively). Data obtained using TUNEL technique was used further in the text.

There was no significant difference in apoptotic index (AI_{0h} and AI_{24h}) between different Rai stages (ANOVA $p > 0.05$), although somewhat higher values in advanced stages of CLL were found. In addition, difference of the increment of apoptosis defined as a rise in percentage from 0h to 24h (ΔAI) was tested among these groups of patients, but no significant difference was found. Higher values of ΔAI in advanced Rai stages was also noticed (Graph 1).

Considering that there is a biological difference in CLL behavior between early and advanced Rai stages, we also performed the same analysis by grouping the patients with early CLL phase (Rai 0, I, II) and advanced CLL phase (Rai III and IV). Apoptotic index, AI_{0h} was significantly higher ($5.8 \pm 0.4\%$) in the advanced stage patients (ASP) compared to the early stage patients (ESP) ($3.1 \pm 1.4\%$) ($p < 0.05$). Difference in the AI_{24h} between these two groups of patients was also observed (AI_{24h} in ASP was $27.1 \pm 7.1\%$; and in ESP was $15.2 \pm 8.7\%$), but this difference was not proven to be significant due to high variability of data. Early stage CLL patients had lower increase in ΔAI ($12.2 \pm 8.9\%$) than late stage patients ($21.2 \pm 7.2\%$) but this difference was not significant (Graph 2).

Apoptotic index of CLL cells obtained from the patients with diffuse infiltration of bone marrow did not vary sig-

nificantly from that determined in patients with other types of infiltration, either in freshly isolated CLL cells (AI_{0h} $3.6 \pm 1.6\%$, $3.9 \pm 1.8\%$ respectively), or in cells incubated for 24h (AI_{24h} $16.1 \pm 2.6\%$ and $16.9 \pm 9.0\%$).

In patients with short doubling time, LDT <12 months, AI_{0h} was higher ($4.0 \pm 1.9\%$) than in the cells obtained from patients with longer LDT ($3.4 \pm 1.5\%$) (Mann Whitney U test, $p < 0.10$). AI_{24h} was also different between respective groups of patients with LDT <12 months ($19.0 \pm 10.5\%$) and LDT >12 months (14.3 ± 6.3), but this difference was not significant ($p > 0.05$) (Graph 3).

Time to treatment initiation (TTI)

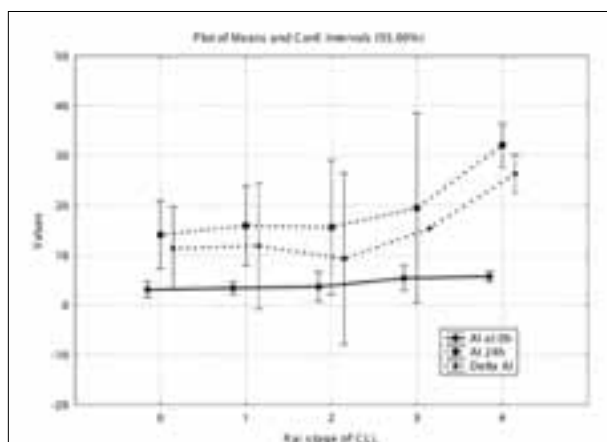
During 10-year follow up of our CLL patients, 22 patients received therapy at certain time, 5 patients did not receive therapy at all and 3 patients were lost in the follow up. Early stage CLL patients had significantly longer TTI time (median was 4 years) compared to advanced stage patients (median less than 1 year; log rank test $p < 0.01$). Patients with LDT >12 months had also significantly longer TTI than those with LDT <12 months (TTI_{50%} is 5 versus 1 year; log rank test $p < 0.05$).

It was observed that patients with lower percentage of AI_{0h} (<5%) required therapy later (median 5 years), while those with higher AI_{0h} (>5%) demanded therapy earlier (median 1 year). By evaluating TTI time according to this threshold, it was found that patients with lower AI_{0h} had significantly longer TTI time (log rank test $p < 0.05$; Graph 4). Although patients with ΔAI at threshold less than 15% had longer TTI period (median 4 years) than those with $\Delta AI > 15\%$ (median was 2 years), rise in apoptosis had no significant influence on TTI (Kaplan Meier log rank test $p > 0.05$).

Ten-year survival period

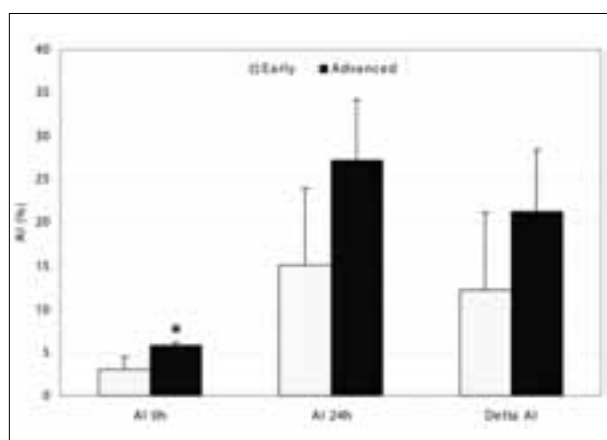
Early stage CLL patients had, as expected, significantly longer overall survival (median OS was 10 years) than advanced stage patients (median was 2 years) (Kaplan Meier log rank test $p < 0.01$). Patients with LDT >12 months had longer survival than those with shorter LDT, <12 months (OS_{50%} 10 y vs. 5 years, Kaplan Meier log rank test $p < 0.10$).

CLL patients with $AI_{0h} < 5\%$ had longer survival (OS_{50%} 10 years), while those with $AI_{0h} > 5\%$ had shorter (OS_{50%} 7 year), but AI_{0h} at this threshold was not shown to have significant impact on survival of patients (Kaplan Meier log rank test $p > 0.05$). Cox multivariate analysis model with lymphocyte doubling time (LDT), AI_{0h} and increase in percentage of apoptosis during 24h (ΔAI) revealed that AI_{0h} behaved as an independent factor for time to treatment initiation, TTI ($p < 0.05$). When distinction of stage (early/advanced) was added in Cox multivariate regression model, only clinical stage of disease behaved as an independent factor (variable) for both time to treatment initiation ($p < 0.05$) and survival ($p < 0.05$), while apoptosis and LDT were not independent variables any more.



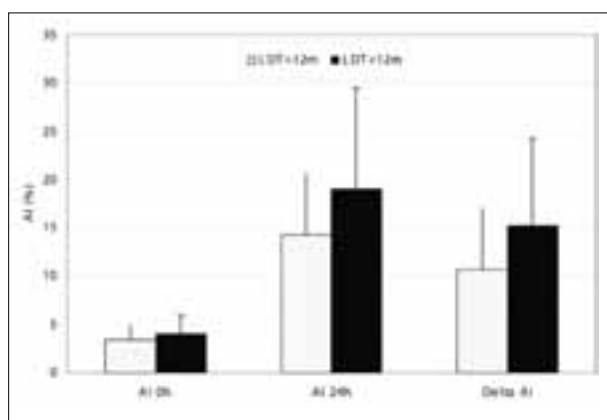
Graph 1. Apoptotic index (AI) of freshly isolated CLL cells (AI_{0h}), after 24h of incubation with autologous serum (AI_{24h}), and difference in AI (ΔAI), defined as rise in percentage of apoptosis from 0h to 24h, in different Rai groups of patients

The data are mean $\pm$ SD values.
 $p > 0.05$



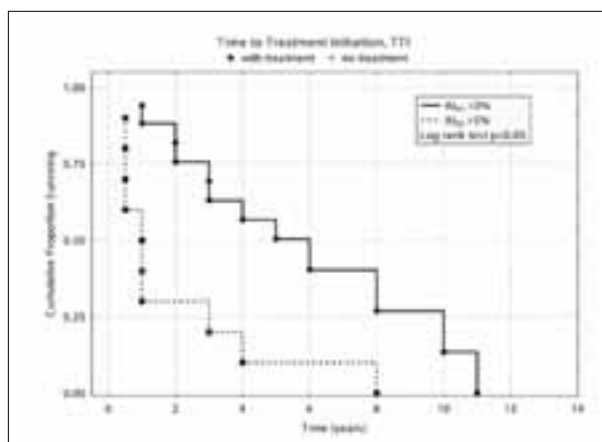
Graph 2. Differences in Apoptotic index (AI) of freshly isolated CLL cells (AI_{0h}), after 24h of incubation with autologous serum (AI_{24h}), and rise in percentage of apoptosis from 0h to 24h (ΔAI) between early-stage and advanced-staged CLL patients

The data are mean $\pm$ SD values.
 $* p < 0.05$



Graph 3. Differences in Apoptotic index (AI) of freshly isolated CLL cells (AI_{0h}), after 24h of incubation with autologous serum (AI_{24h}), and difference in AI (ΔAI), between patients with lymphocyte doubling time less than 12 months ($LDT < 12 m$), and patients with lymphocyte doubling time more than 12 months ($LDT > 12 m$).

The data are mean $\pm$ SD values.
 $p > 0.05$



Graph 4. Time to treatment initiation (TTI) in patients with Apoptotic index (AI) of freshly isolated CLL cells (AI_{0h}) higher than 5% ($> 5\%$) and lower than 5% ($< 5\%$)

DISCUSSION

A large variety of clinical manifestations and variable survival rates are well documented in CLL patients [2, 3]. In our study, groups of patients with the advanced-stage and patients with the early-stage disease at the enrollment were in concordance with recently published epidemiological estimations describing that in the first year of CLL, 20% of patients would be in the advanced stage [20]. Other traditional adverse prognostic factors like diffuse infiltration of bone marrow and LDT less than 12 months were present in minority of patients. Similar observations were found in other studies [13, 21].

The fact that CLL cells die by the spontaneous apoptosis in cell cultures supplemented with fetal calf serum is well documented [22]. We tested whether autologous serum contains some factors which may alter the survival time of CLL cells *in vitro*. Autologous serum failed to protect CLL cells from spontaneous apoptosis. Previously published data are in concordance with our results [21]. We have observed substantial variation in the level of spontaneous apoptosis of CLL cells in different patients. Variations in the level of spontaneous apoptosis in CLL was noticed before and is believed to be the result of cell-intrinsic differences in CLL cells susceptibility to apoptosis, or occur due to variable levels of protective components in the serum of different patients [22]. Activation of the PI3K/Akt cytoprotective-signaling pathway by plasma may contribute to its anti-apoptotic action [23]. Since autologous serum failed to prevent apoptosis *in vitro*, variation in the level of spontaneous apoptosis of CLL cells seen in different patients is possibly related to differential expression of apoptosis regulating proteins [15] rather than to variable levels of protective components in the serum of different patients. Our data confirm a model in which the longevity of CLL cells is determined by the interplay between the intrinsic disease-related genetic changes and survival signaling by environmental factors [15].

In our study, higher percentage of apoptosis was noticed to be present in the advanced-staged patients and patients with short doubling time ($LDT < 12 mo$). It has

been published recently that patients showed significantly better *in vitro* response to purine analogues when they were in the initial stages of the disease, with low beta(2) microglobulin serum level, with long LDT, with few cells expressing CD38, with normal karyotype or no p53 deletion, whereas there was no correspondence with ZAP-70 expression [24]. It has been also published before that the expression of apoptosis regulating protein Mcl-1 significantly correlates with LDT and with the stage of disease [25]. Bone marrow infiltration was the only classical prognostic factor examined that was not found to be related to apoptosis of leukemic cells. There are no previously published data regarding correlation between spontaneous apoptosis of CLL cells and bone marrow infiltration.

Higher percentage of spontaneous apoptosis in advanced-stage patients and higher proliferation of leukemic cells and poor outcome was suggested by Sieklucka M et al. [13]. Contradictory data on the relationship between proliferative markers and disease progression in CLL were published [21]. Increased proliferation, measured by Ki67 and sCD23 [26, 27] was described in CLL cells of patients with the advanced-stage disease. Vrhovac et al. [28], on the contrary, reported a high expression of cell cycle inhibitor p27 in progressive CLL disease, suggesting that CLL cells expressing low p27 levels could be characterized by higher levels of apoptosis. Ricciardi et al. [19] found that CLL cells in patients with progressive disease had more quiescent status and reduced susceptibility to apoptosis. The subdivision of CLL, to progressive and stable disease, does not always match the clinical staging, and indeed the authors noted that four patients considered having progressive disease have been staged as Rai 0 or I [21]. The difference in grouping of samples might be a reason for different results obtained in the study of Ricciardi et al. [21] compared to our study and the study of Sieklucka et al. [13].

During 10-year follow up of our cohort of CLL patients, it was noticed, as expected, that patients with negative prognostic factors like advanced stage disease and LDT less than 12 months, required therapy earlier, and had

shorter overall survival time. It was also noted that patients with higher percentage of spontaneous apoptosis of CLL cell also required therapy earlier. Apoptotic index of freshly isolated cells was shown to have significant influence on TTI in our study, but did not have significant influence on survival of patients. Apoptosis of freshly isolated cells behaved as an independent factor for TTI period when other variables, like LDT and Δ AI, were included in Cox multivariate regression model. But, with addition of stage of disease (early/advanced) to Cox multivariate analysis model, the apoptosis was not an independent factor any more. The main independent prognostic factor in CLL is stage of the disease.

Our results after ten-year follow up of CLL patients are somehow consistent with the baseline findings when the patients were seen for the first time. Relationship between high levels of apoptosis and poor prognosis was seen both at the beginning and at the end of study. At the beginning of study, high levels of apoptosis were detected in patients presenting with bad prognostic factors, like advanced Rai stage and short LDT. At the end of this study, higher levels of apoptosis were found in patients with shorter therapy free period. Relationship between high levels of apoptosis and poor prognosis is thus consistent in this study.

CONCLUSION

The results of this study draw attention to the relation of high levels of apoptosis among CLL cells at the time of the initial diagnosis and poor prognosis, emphasizing the importance of apoptosis in pathobiology of the chronic lymphocytic leukemia.

ACKNOWLEDGMENTS

The study was supported in part by the Ministry of Education, Science and Technological Development of the Republic of Serbia (grant number 41025).

REFERENCES

- Chiorazzi N, Rai KR, Ferrarini M. Chronic lymphocytic leukemia. *N Engl J Med*. 2005; 352:804-15.
- Dighiero G. CLL biology and prognosis. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*. 2005; 278-84.
- Seiler T, Dohner H, Stilgenbauer S. Risk stratification in chronic lymphocytic leukemia. *Seminars in Oncology*. 2006; 33:186-95.
- Cheson BD, Bennett JM, Grever M, Kay N, Keating MJ, O'Brien S, et al. National Cancer Institute-sponsored Working Group guidelines for chronic lymphocytic leukaemia: revised guidelines for diagnosis and treatment. *Blood*. 1996; 87:4990-7.
- Vinolas N, Reverter JC, Urbano-Ispizua A, Montserrat E, Rozman C. Lymphocyte doubling time in chronic lymphocytic leukemia: an update of its prognostic significance. *Blood Cells*. 1987; 12:457-70.
- Molica S, Reverter JC, Alberti A, Montserrat E. Timing of diagnosis and lymphocyte accumulation patterns in chronic lymphocytic leukemia: analysis of their clinical significance. *Eur J Haematol*. 1990; 44:277-81.
- Montserrat E, Villamor N, Reverter JC, Bragues RM, Tassies D, Bosch F, et al. Bone marrow assessment in B-cell chronic lymphocytic leukaemia: aspirate or biopsy? A comparative study in 258 patients. *Br J Haematol*. 1996; 93:111-6.
- Mauro FR, De Rossi G, Burgio VL, Caruso R, Giannarelli D, Monarca B, et al. Prognostic value of bone marrow histology in chronic lymphocytic leukemia. A study of 335 untreated cases from a single institution. *Haematologica*. 1994; 79:334-41.
- Bazargan A, Tam CS, Keating MJ. Predicting survival in chronic lymphocytic leukemia. *Expert Rev Anticancer Ther*. 2012; 12(3):393-403.
- Leković D, Mihaljević B, Kraguljac-Kurtović N, Perunčić-Jovanović M, Bogdanović A, Čolović M, et al. Prognostic significance of new biological markers in chronic lymphocytic leukaemia. *Srp Arh Celok Lek*. 2011; 139:753-8.
- Butrym A, Majewski M, Dziatczek J, Kuliczowski K, Mazur G. High CD74 expression correlates with ZAP70 expression in B cell chronic lymphocytic leukemia patients. *Med Oncol*. 2013; 30(2):560.
- Collins RJ, Verschuer LA, Harmon BV, Prentice RL, Pope JH, Kerr JF. Spontaneous programmed death (apoptosis) of B-chronic lymphocytic leukaemia cells following their culture in vitro. *Br J Haematol*. 1989; 71:343-50.

13. Sieklucka M, Pozarowski P, Bojarska-Junak A, Hus I, Dmoszynska A, Rolinski J. Apoptosis in B-CLL: the relationship between higher ex vivo spontaneous apoptosis before treatment in III-IV Rai stage patients and poor outcome. *Oncol Rep.* 2008; 19:1611-20.
14. Damle RN, Wasil T, Fais F, Ghiotto F, Valetto A, Allen SL, et al. IgV gene mutation status and CD38 expression as novel prognostic indicators in chronic lymphocytic leukemia. *Blood.* 1999; 94:1840-7.
15. Kitada S, Andersen J, Akar S, Zapata JM, Takayama S, Krajewski S, et al. Expression of apoptosis-regulating proteins in chronic lymphocytic leukemia: correlations with in vitro and in vivo chemoresponses. *Blood.* 1998; 91:3379-89.
16. Zhao H, Dugas N, Mathiot C, Delmer A, Dugas B, Sigaux F, et al. B-cell chronic lymphocytic leukemia cells express a functional inducible nitric oxide synthase displaying anti-apoptotic activity. *Blood.* 1998; 92:1031-43.
17. Mengubas K, Riordan FA, Bravery CA, Lewin J, Owens DL, Mehta AB, et al. Ceramide-induced killing of normal and malignant human lymphocytes is by a non-apoptotic mechanism. *Oncogene.* 1999; 18:2499-506.
18. Walker NI, Harmon BV, Gobe GC, Kerr JFR. Patterns of cell death. *Methods Achiev Exp Pathol.* 1988; 13:18-54.
19. Bumbasirevic V, Skaro-Milic A, Mircic A, Djuricic B. Apoptosis induced by microtubule disrupting drugs in normal murine thymocytes in vitro. *Scanning Microsc.* 1995; 9:509-18.
20. Watson L, Wyld P, Catovsky D. Disease burden of chronic lymphocytic leukaemia within the European Union. *Eur J Haematol.* 2008; 4:253-8.
21. Ricciardi M, Petrucci M, Gregorj C, Ariola C, Lemoli R, Fogli M, et al. Reduced susceptibility to apoptosis correlates with kinetic quiescence in disease progression of chronic lymphocytic leukaemia. *Br J Haematol.* 2001; 113:391-9.
22. Collins RJ, Verschuer La, Harmon BV, Prentice RL, Pope JH, Kerr JFR. Spontaneous programmed death (apoptosis) of B-chronic lymphocytic leukaemia cells following their culture in vitro. *Br J Haematol.* 1989; 71:343-50.
23. Wickremasinghe RG, Ganeshaguru K, Jones DT, Lindsay C, Spanswick VJ, Hartley JA, et al. Autologous plasma activates Akt/protein kinase B and enhances basal survival and resistance to DNA damage induced apoptosis in B-chronic lymphocytic leukaemia cells. *Br J Haematol.* 2001; 114:608-15.
24. Castejon R, Yebra M, Citores MJ, Villarreal M, Garcia-Marco JA, Vargas JA. Drug induction apoptosis assay as predictive value of chemotherapy response in patients with B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Leuk Lymphoma.* 2009; 50(4):593-603.
25. Pepper C, Lin TT, Pratt G, Hewamana S, Brennan P, Hiller L, et al. Mcl-1 expression has in vitro and in vivo significance in chronic lymphocytic leukemia and is associated with other poor prognostic markers. *Blood.* 2008; 112:3807-17.
26. Cordone I, Matutes E, Catovsky D. Monoclonal antibody Ki67 identified B and T cells in cycle in chronic lymphocytic leukemia: correlation with disease activity. *Leukemia.* 1992; 6:902-8.
27. Sarfati M, Chevret S, Chastang C, Biron G, Styckmans P, Delespesse G, et al. Prognostic importance of serum soluble CD23 level in chronic lymphocytic leukemia. *Blood.* 1996; 88:4259-64.
28. Vrhovac R, Delmer A, Tang R, Marie JP, Zitoun R, Ajchenbaum-Cymbalista E. Prognostic significance of the cell cycle inhibitor p27kip1 in chronic B-cell lymphocytic leukemia. *Blood.* 1998; 91:4694-700.

Висок проценат апоптотичних ћелија *in vitro* у тренутку постављања дијагнозе хроничне лимфоцитне леукемије указује на ранију потребу за лечењем особа с овом болешћу: десетогодишње испитивање

Тамара Кравић-Стевовић¹, Андрија Богдановић^{2,3}, Владимир Бумбаширевић¹

¹Институт за хистологију и ембриологију, Медицински факултет, Универзитет у Београду, Београд, Србија;

²Клиника за хематологију, Клинички центар Србије, Београд, Србија;

³Медицински факултет, Универзитет у Београду, Београд, Србија

КРАТАК САДРЖАЈ

Увод Хронична лимфоцитна леукемија (ХЛЛ) има изузетно променљив клинички ток. Биолошки разлози који доводе до великих варијација у клиничком току и степену преживљавања болесника са ХЛЛ нису потпуно разјашњени.

Циљ рада Циљ студије је био да се утврди важност одређивања спонтане апоптозе ХЛЛ ћелија *in vitro* на презентацију болести ради прогнозе тока ове болести и потребе за лечењем болесника са ХЛЛ.

Методе рада Леукемијски лимфоцити изоловани су из периферне крви 30 новодијагностикованих болесника и инкубирани 24 часа у РПМИ-1640 медијуму обогаћеним са 10% серума добијеног од истог болесника са ХЛЛ. Ћелије

су касније фиксиране и калупљене у Епону или су од њих прављени ћелијски размази који су бојени *TUNEL* техником.

Резултати Током десетогодишњег периода испитивања откривено је да су болесници с мањим процентом апоптотичних ћелија на презентацији болести имали дужи период до започињања терапије (*log-rank* тест, $p < 0,05$). Апоптоза ХЛЛ ћелија, међутим, није имала значајан утицај на преживљавање болесника (Каплан-Мајеров *log-rank* тест, $p > 0,05$).

Закључак Резултати ове студије указују на значај апоптозе ХЛЛ ћелија у тренутку дијагнозе болести у патогенези хроничне лимфоцитне леукемије.

Кључне речи: апоптоза; хронична лимфоцитна леукемија; аутологни серум; прогноза; преживљавање

Испитивање улоге хламидијских стрес-протеина у настанку ванматеричне трудноће

Маја Вивода¹, Биљана Арсић², Елиана Гаралејић^{2,3}, Ивана Ћирковић⁴, Слободанка Ђукић⁴

¹Институт за јавно здравље Србије „Др Милан Јовановић Батут“, Београд, Србија;

²Гинеколошко-акушерска клиника „Народни фронт“, Београд, Србија;

³Медицински факултет, Универзитет у Београду, Београд, Србија;

⁴Институт за микробиологију и имунологију, Медицински факултет, Универзитет у Београду, Београд, Србија

КРАТАК САДРЖАЈ

Увод Бактерија *Chlamydia trachomatis* данас је најчешћи узрочник полно преносивих болести и у свету и код нас. Током последњих година неколико студија је показало да је склоност *C. trachomatis* да опстаје у ћелији домаћину један од главних фактора у патогенези хламидијских инфекција и секвела. Током упорне инфекције хламидијом долази до непрестане синтезе стрес-протеина *hsp60* као имунопатолошког антигена. Антитела према *hsp60* утврђена су код жена с оклузијом туба, али не и код оних с акутном гениталном инфекцијом бактеријом *C. trachomatis*, што указује на улогу ових протеина у имунопатогенези упорних инфекција хламидијом.

Циљ рада Циљ овог рада је био да се утврди веза између налаза антитела према стрес-протеинима *C. trachomatis* (*hsp 60*) и ванматеричне трудноће.

Методе рада Истраживање је обухватило 40 жена с ванматеричном трудноћом (група испитаница) и 34 жене с нормалном трудноћом (контролна група). *C. trachomatis* је у ендцервикалним брисевима установљена методом директне имунофлуоресценције (ДИФ), а специфична антитела на *Chlamydia* spp. и на *hsp60* су откривена тестом ELISA.

Резултати Методом ДИФ *C. trachomatis* је утврђена код 12,5% трудница с ванматеричном трудноћом и 17,6% испитаница контролне групе. Налаз антитела класе IgG на *Chlamydia* spp. био је позитиван код 57,5% трудница с ванматеричном трудноћом и 26,5% испитаница контролне групе. Налаз антитела класе IgA на *Chlamydia* spp. био је позитиван код 7,5% трудница с ванматеричном трудноћом и 2,9% испитаница контролне групе. Налаз антитела на *hsp60 C. trachomatis* био је позитиван код 37,5% трудница с ванматеричном трудноћом и 14,7% испитаница контролне групе.

Закључак Резултати ове студије су доказали постојање везе између налаза антитела класе IgG на *hsp60 C. trachomatis* и ванматеричне трудноће.

Кључне речи: *Chlamydia*; ванматерична трудноћа; стрес-протеини

УВОД

Ванматерична (ектопична) трудноћа је компликација трудноће која настаје усађивањем оплођене јајне ћелије у ткиво изван материце. Ванматерична трудноћа је главни узрок смрти трудница у првом триместру трудноће у земљама у развоју, и она сама по себи смањује могућност настанка каснијих нормалних трудноћа и повећава ризик од поновног настанка ванматеричне трудноће [1]. У последњих двадесет година свуда у свету повећана је учесталост ванматеричне трудноће, што се приписује чешћим упалама гениталних органа жена [2].

Код 50% жена с ванматеричном трудноћом откривене су опструктивне, тј. анатомске, промене на јајоводима које се јављају као последица пелвичне инфламаторне болести (ПИД). ПИД обухватају: полно преносиве инфекције (најчешћи узрочници су *Chlamydia trachomatis* и *Neisseria gonorrhoeae*), постабортусне и постпартусне инфекције и околне инфекције (апендицитис).

Хипотеза да *C. trachomatis* игра важну улогу у настанку ванматеричне трудноће

потврђена је на основу серолошких студија које показују да жене са стерилитетом услед опструкције јајовода имају значајно чешће специфична антитела према *C. trachomatis* у поређењу са женама с проблемом неплодности али са здравим, очуваним јајоводима [3]. Рекурентна или перзистентна ендцервикална инфекција бактеријом *C. trachomatis* знатно увећава ризик за настанак ванматеричне трудноће [4].

Стрес-протеини (*hsp*) су имунодоминантни антигени многих бактерија, укључујући и *C. trachomatis*, што значи да ове инфективне агенсе имунски систем препознаје управо преко њихових *hsp* епитопа [5]. *Hsp* се повећано синтетишу у стањима акутне или хроничне инфламације [6]. Код осетљиве особе излагање инфективном агенсу доводи до имунског одговора према *hsp* инфективног агенса, а може доћи и до унакрсне реакције са сопственим *hsp*, што доводи до аутоимунских реакција.

За разлику од акутне инфекције, ћелије које су хронично инфициране бактеријом *C. trachomatis* синтетишу низак ниво структурних компоненти (протеина), али настављају

Correspondence to:

Slobodanka ĐUKIĆ
Institut za mikrobiologiju i
imunologiju
Medicinski fakultet
Univerziteta u Beogradu
Dr Subotića 1, 11000 Beograd
Srbija
bobadi@sezampro.rs

да производе хламидијски *hsp60* у високом нивоу [7]. Према томе, жене с асимптоматском и нелеченом хламидијском инфекцијом су биле дуго изложене хламидијском *hsp60*. Пошто бактеријски и хумани *hsp* имају 50% хомологних аминокиселинских секвенци, уочено је да продужена изложеност имунског система хламидијском *hsp60* и истовремено хламидијским и хуманим *hsp60* може довести до синтетисања аутоантитела [8].

ЦИЉ РАДА

Циљ рада је био да се утврди да ли постоји веза између налаза антитела на стрес-протеин *hsp60 C. trachomatis* и ванматеричне трудноће. У складу с основним циљем истраживања, формулисани су следећи задаци: 1) установити присуство *C. trachomatis* у ендцервикалном брису испитиваних особа методом директне имунофлуоресценције (ДИФ); 2) установити присуство антитела класе IgG и IgA на *C. trachomatis* у серуму испитиваних особа тестом ELISA; 3) установити присуство антитела класе IgG на *hsp60 C. trachomatis* тестом ELISA; 4) утврдити постојање везе између инфекције хламидијом и ванматеричне трудноће код испитиваних трудница.

МЕТОДЕ РАДА

У ову проспективну студију укључене су 74 труднице које су сврстане у две основне групе. Прва група је обухватила жене с ванматеричном трудноћом које су се од јануара 2004. до октобра 2005. године лечиле у Гинеколошко-акушерској клиници „Народни фронт“ у Београду, док су другу групу чиниле жене с нормалном, материчном трудноћом које су се у истом периоду контролисале у Дому здравља „Вождовац“.

Свим испитиваним трудницама узет је ендцервикални брис. Присуство бактерије *C. trachomatis* у ендцервикалном брису доказивано је методом ДИФ (*bioMérieux, France*). Присуство антитела класе IgG и IgA на *C. trachomatis* доказивано је тестом ELISA (*Serion ELISA classic Chlamydia IgG/IgA Institut Virion/Serion GmbH Würzburg, Germany*). Присуство антитела класе IgG на *hsp60 C. trachomatis* доказивано је такође тестом ELISA (*Test c-hsp60-IgG – ELISA medac Medac Hamburg, Germany*).

За статистичку обраду добијених података коришћене су методе дескриптивне статистике: мере

централне тенденције (аритметичка средина) и мере варијабилитета (интервал варијације и стандардна девијација). Од метода аналитичке статистике у раду су коришћене методе идентификације емпиријских расподела, методе за процену значајности разлике (χ^2 -тест, Студентов *t*-тест и Фишеров тест тачне вероватноће) и методе за процену значајности повезаности (униваријантна логистичка регресиона анализа и мултиваријантна логистичка регресиона анализа).

РЕЗУЛТАТИ

Испитивање је обухватило 74 труднице: 40 с ванматеричном трудноћом (54,1%) и 34 с нормалном трудноћом (45,9%).

Методом ДИФ откривено је присуство *C. trachomatis* код пет трудница (12,5%) с ванматеричном трудноћом и шест испитаница (17,6%) контролне групе. Разлика није била статистички значајна ($\chi^2=0,385$; $p=0,535$).

Налаз антитела класе IgG на *Chlamydia* spp. био је позитиван код 23 (57,5%), а негативан код 17 (42,5%) трудница с ванматеричном трудноћом, односно позитиван код девет (26,5%), а негативан код 25 (73,5%) испитаница контролне групе. Утврђена је високо статистички значајна разлика у учесталости позитивног налаза на IgG антитела између испитиваних група трудница ($\chi^2=7,210$; $p=0,007$).

Налаз антитела класе IgA на *Chlamydia* spp. био је позитиван код три (7,5%), а негативан код 31 (92,5%) трудница с ванматеричном трудноћом, односно позитиван код једне жене (2,9%), а негативан код 33 (97,1%) испитаница контролне групе. Није утврђена високо статистички значајна разлика у учесталости позитивног налаза на IgA антитела између испитиваних група трудница ($\chi^2=0,747$; $p=0,387$).

Налаз антитела на *hsp60 C. trachomatis* био је позитиван код 15 (37,5%), а негативан код 25 (62,5%) трудница с ванматеричном трудноћом, односно позитиван код пет (14,7%), а негативан код 29 (85,3%) испитаница контролне групе. Утврђена је статистички значајна разлика у учесталости позитивног налаза на антитела на *hsp60* између испитиваних група трудница ($\chi^2=4,842$; $p=0,028$).

Предиктори појаве ванматеричне трудноће у групи испитаница приказани су у табели 1. Жене с позитивним налазом IgG антитела на *C. trachomatis* имале

Табела 1. Предиктори појаве ванматеричне трудноће у униваријантној и мултиваријантној логистичкој регресионај анализи
Table 1. Predictors of ectopic pregnancy by univariate and multivariate logistic analysis

Варијабла Variable	Униваријантна логистичка регресиона анализа Univariate logistic analysis			Мултиваријантна логистичка регресиона анализа Multivariate logistic analysis		
	<i>p</i>	RR	95%CI	<i>p</i>	RR	95%CI
+IgG антитела +IgG antibodies	0.008	3.7	1.4–10.1	0.008	3.7	1.4–10.1
+hsp60 антитела +hsp60 antibodies	0.033	3.5	1.1–10.9	/	/	/

RR – релативни ризик; CI – интервал поверења
RE – relative risk; CI – confidence interval

су 3,7 пута већи ризик за развој ванматеричне трудноће ($p=0,0008$, $95\%CI=1,4-10,1$), док су жене с позитивним налазом антитела на *hsp60* имале 3,5 пута већи ризик за развој ванматеричне трудноће ($p=0,033$, $95\%CI=1,1-10,9$). Као најзначајнији предиктор развоја ванматеричне трудноће у мултиваријантној логистичкој регресионој анализи означена су IgG антитела на *C. trachomatis* ($p=0,033$; $RR=3,7$; $95\%CI=1,4-10,1$).

ДИСКУСИЈА

Бактерија *C. trachomatis* најчешће изазива запаљењске промене на грлићу материце. Око 70% гениталних инфекција је асимптоматско, због чега често остају недијагностиковане и нелечене. Бактерија се лако шири усходно, изазивајући ендометритис, салпингитис и ПИД. Последице ПИД су стерилитет и ванматерична трудноћа. Сматра се да 40% нелечених инфекција хламидијом прогредира у ПИД, од чега се код чак 20% жена развије инфертилитет, код 18% хронични пелвични бол, а код 9% ванматерична (тубарна) трудноћа [9]. Инфекција у трудноћи може утицати на ток и исход трудноће или може довести до вертикалног преноса бактерије с мајке на дете.

Имунопатогенеза инфекције хламидијом код жена и њена повезаност с репродуктивним секвелама, као што је ванматерична трудноћа, остаје недовољно разјашњена. Досадашње студије су показале да се код знатног броја жена инфицираних бактеријом *C. trachomatis* развије инфекција горњих делова гениталног тракта, а само код извесног броја долази до ванматеричне трудноће. Истраживања су такође показала да се једна појава хламидијског салпингитиса најчешће завршава оздрављењем и без секвела, док поновљене инфекције доводе до оштећења на јајоводима и ванматеричне трудноће [10].

Развој патолошких промена на јајоводима као последица инфекције хламидијом резултат је почетне инфекције доњих делова гениталног тракта жена, најчешће грлића материце [11]. У складу с наведеним, други део истраживања био је да се утврди присуство *C. trachomatis* у цервиксу трудница укључених у ову студију и повезаност с ванматеричном трудноћом у првој групи испитаница.

У нашем истраживању је за доказивање присуства бактерије *C. trachomatis* у ендоцервикалном брису обе групе трудница примењена метода ДИФ. Овом методом бактерија *C. trachomatis* је изолована код 12,5% жена с ванматеричном трудноћом и 17,6% испитаница с нормалном трудноћом, а разлика није била статистички значајна ($p>0,05$). Намеће се питање: зашто је код трудница с ванматеричном трудноћом број позитивних налаза на присуство *C. trachomatis* методом ДИФ био мањи него у контролној групи?

Бројне студије су показале да је у хроничним, упорним хламидијским инфекцијама број вијабилних хламидија веома мали и бактерије се често не могу ни открити. У студији Малика (*Malik*) и сарадника [9] по-

казано је да се код свега 28% жена с ванматеричном трудноћом постојање *C. trachomatis* може потврдити методом ДИФ и изолацијом у култури ћелија. Раније студије су показале да се хламидијски антигени могу открити код 25% жена са ПИД и свега 16,6% инфертилних жена [12]. У прилог овим подацима говоре и резултати добијени у нашем истраживању.

Последице инфекција хламидијом доњих делова гениталног тракта жена, као што су ПИД, промене на јајоводима и друго, данас су како медицински, тако и економски проблем, јер је лечење стерилитета и ванматеричне трудноће веома скупо. Због тога се јавила потреба за увођењем једноставних скрининг-тестова који би могли да буду поуздани предиктори компликација ових инфекција. Пошто је доказана повезаност између претходне инфекције хламидијом и оштећења на јајоводима, многе студије су показале какав све утицај *C. trachomatis* може имати на репродуктивно здравље жена [13], те да се за дијагностиковање компликација ових инфекција могу користити серолошки тестови [14, 15]. Премда серолошки тестови за дијагностиковање претходне инфекције хламидијом имају малу осетљивост и специфичност [16], могу бити корисни као скрининг-тестови у дијагностици оштећења јајовода и могућих компликација [17]. Осетљивост ових тестова је већа ако се као антиген користи *LPS* или неки други широко реактивни антиген [18]. Увођење комерцијалних тестова *ELISA* за *C. trachomatis* и повећање специфичности ових скрининг-тестова омогућило је њихову ширу примену, пре свега код жена с променама на јајоводима [14]. Због свега наведеног, и у овој студији је коришћен *Chlamydia ELISA* тест за утврђивање антитела на *Chlamydia* spp.

У овом истраживању је налаз антитела класе IgG на *Chlamydia* spp. био позитиван код 57,5% испитаница с ванматеричном трудноћом и 26,5% жена с нормалном трудноћом. Утврђена је високо статистички значајна разлика ($p<0,01$) у учесталости позитивног налаза на IgG антитела између испитиваних група трудница. С друге стране, налаз антитела класе IgA био је позитиван код свега 7,5% жена с ванматеричном трудноћом и 2,9% испитаница с нормалном трудноћом, а ова разлика није била статистички значајна ($p>0,05$). У студији Титиненове (*Tiitinen*) и сарадника [19] такође је показано да је налаз специфичних IgG антитела на *C. trachomatis* био много чешћи код жена с опструкцијом јајовода него у контролној групи испитаница (43,2% у односу на 13,5%).

Имунски одговор домаћина на инфекцију хламидијом варира од особе до особе. Одсуство антитела на *C. trachomatis* није јасан показатељ да особа није имала ову инфекцију [20], што објашњава да је у нашем истраживању код само нешто више од 50% трудница с ванматеричном трудноћом био позитиван налаз антитела класе IgG.

Стрес-протеини (*hsp*) бактерија су доминантни антигени и за човека јаки имуногени. Током инфекције бактерије почињу да синтетишу *hsp60* у повећаној количини ради заштите од имунолошких одбрамбених

механизма домаћина. Самим тим, у том тренутку *hsp* постају једни од најважнијих бактеријских протеина. Хламидијски *hsp60* (*c-hsp60*) је један од највише проучаваних стрес-протеина. *C-hsp60* има важна имунолошка обележја и покреће аутоимунски одговор домаћина [21]. Вагар (*Wagar*) и сарадници [22] су утврдили да 50% серопозитивних жена на *C. trachomatis* које су имале ванматеричну трудноћу имају антитела на *hsp60 C. trachomatis*. У нашем истраживању добијени су слични резултати: налаз антитела на *hsp60* био је позитиван код 37,5% трудница с ванматеричном трудноћом и свега 14,7% жена с нормалном трудноћом, а разлика је била статистички значајна ($p < 0,05$).

Резултати овог истраживања показали су и да је позитиван налаз антихламидијских антитела класе IgG најзначајнији предиктор ($RR=3,7$) развоја ванматеричне трудноће, а затим позитиван налаз антитела на *hsp60* ($RR=3,5$). Поред тога, показано је да је значајно већи број трудница с ванматеричном трудноћом имао више од једног позитивног параметра хламидијске инфекције у односу на испитанице с нормалном трудноћом, што указује на потребу за коришћењем више од једног теста за утврђивање ризика од инфекције хламидијом код трудница.

Резултати истраживања Стаматопулоса (*Stamatopoulos*) и сарадника [23] показали су да је ванматерична трудноћа вероватно касна компликација оштећења ја-

јовода које је последица претходне акутне инфекције бактеријом *C. trachomatis* него да је последица латентне инфекције хламидијом у јајоводима.

Као и бројна истраживања досад, тако је и наша студија показала да примена комбинованих серолошких тестова којима се откривају антитела на *C. trachomatis* и антитела на *hsp60* има највећу предиктивну вредност за утврђивање ризика од ванматеричне трудноће, што указује на потребу коришћења ових тестова за скрининг трудница [24]. Поред тога, значај нашег истраживања је и у томе што је први пут у нашој земљи испитивана и доказана повезаност хламидијског *hsp60* и ванматеричне трудноће, што додатно говори у прилог увођењу наведених серолошких тестова у преглед трудница [25].

ЗАКЉУЧАК

Добијени резултати су показали да је налаз специфичних антитела према *Chlamydia* spp. био високо значајно чешћи, а налаз антитела према *hsp60 C. trachomatis* значајно чешћи код жена с ванматеричном трудноћом у поређењу са трудницама с нормалном, материчном трудноћом. Налази антитела класе G према *C. trachomatis* и антитела према *hsp60 C. trachomatis* јесу најзначајнији предсказатељи ванматеричне трудноће.

ЛИТЕРАТУРА

- Hubacher D, Grimes D, Lara-Ricalde R, de la Jara J, Garcia-Luna A. The limited clinical usefulness of taking a history in the evaluation of women with tubal factor infertility. *Fertil Steril*. 2004; 81:6-10.
- Petković S. Vanmaterična trudnoća. In: Petković S, editor. *Ginekologija*. Beograd: Elit medica; 2004. p.469-481.
- Djukić S, Vivoda M, Arsić B, Garalejić E, Opavski N, Mijač V, et al. Da li je vanmaterična trudnoća moguća komplikacija hlamidijske infekcije? *Srp Arh Celok Lek*. 2002; 130:420-4.
- Hillis SD, Owens LM, Marchbanks PA. Recurrent chlamydial infections increase the risks of hospitalization for ectopic pregnancy and pelvic inflammatory disease. *Am J Obstet Gynecol*. 1997; 176:103-7.
- Vivoda M, Ćirković I, Aleksić Đ, Ranin L, Djukić S. Biologija i intracelularno preživljavanje hlamidija. *Med Pregl*. 2011; 64:561-4.
- Van Eden W. Immunity to heat shock proteins and arthritic disorders. *Inf Dis Obstet Gynecol*. 1999; 7:49-54.
- Beatty WL, Byrne GI, Morrison RP. Morphologic and antigenic characterization of interferon γ -mediated persistent *Chlamydia trachomatis* infection in vitro. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1993; 90:3998-4002.
- Witkin SS, Neuer A, Giraldo P, Jeremias J, Tolbert V, Korneeva IL, et al. *Chlamydia trachomatis* infection, immunity and pregnancy outcome. *Infect Dis Obstet Gynecol*. 1997; 5:128-32.
- Malik A, Jain S, Hakim S, Shukla I, Rizvi M. *Chlamydia trachomatis* infection and female infertility. *Indian J Med Res*. 2006; 123:770-5.
- Patton DL, Moore DE, Spadoni LR, Soules MR, Halbert SA, Wang SP. A comparison of the fallopian tube's response to overt and silent salpingitis. *Obstet Gynecol*. 1989; 73:622-30.
- Weström L, Joesoef R, Reynolds G, Hagdu A, Thompson SE. Pelvic inflammatory disease and infertility: a cohort of 1,844 women with laparoscopically verified disease and 657 control women with normal laparoscopic findings. *Sex Transm Dis*. 1992; 19:185-8.
- Ray K, Yadav S. Prevalence of *C. trachomatis* and other sexually transmitted pathogens in female reproductive tract infections. *Indian J Med Microbiol*. 1997; 15:1-4.
- Paavonen J, Eggert-Kruse W. *Chlamydia trachomatis*: impact on human reproduction. *Hum Reprod Update*. 1999; 5:433-47.
- Land JA, Gijsen AP, Kessels AG, Slobbe ME, Bruggeman CA. Performance of five serological *chlamydia* antibody tests in subfertile women. *Hum Reprod*. 2003; 18:2621-7.
- Gijsen AP, Land JA, Goossens VJ, Slobbe ME, Bruggeman CA. *Chlamydia* antibody testing in screening for tubal factor subfertility: the significance of IgG antibody decline over time. *Hum Reprod*. 2002; 17:699-703.
- Tomanović S, Djukić S. Klasične i molekularne metode u dijagnostici infekcije hlamidijom trahomatis. *Med Pregl*. 2011; 64:477-80.
- Akande VA, Hunt LP, Cahill DJ, Caul EO, Ford WC, Jenkins JM. Tubal damage in infertile women: prediction using *chlamydia* serology. *Hum Reprod*. 2003; 18:1841-7.
- Land JA, Evers JL. *Chlamydia* infection and subfertility. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol*. 2002; 16:901-12.
- Tiitinen A, Surcel HM, Halttunen M, Birkelund S, Bloigu A, Christiansen G, et al. *Chlamydia trachomatis* and chlamydial heat shock protein 60-specific antibody and cell-mediated responses predict tubal factor infertility. *Hum Reprod*. 2006; 21:1533-8.
- LaVerda D, Albanese LN, Ruther PE, Morrison SG, Morrison RP, Ault KA, et al. Seroreactivity to *Chlamydia trachomatis* Hsp10 correlates with severity of human genital tract disease. *Infect Immun*. 2000; 68:303-9.
- Zhong G, Brunham RC. Antibody responses to the chlamydial heat shock proteins hsp60 and hsp70 are H-2 linked. *Infect Immun*. 1992; 60:3143-9.
- Wagar EA, Schachter J, Bavoil P, Stephens RS. Differential human serologic response to two 60,000 molecular weight *Chlamydia trachomatis* antigens. *J Infect Dis*. 1990; 162:922-7.
- Stamatopoulos N, Casikar I, Reid S, Roy B, Branley J, Mongelli M, et al. *Chlamydia trachomatis* in fallopian tubes of women undergoing laparoscopy for ectopic pregnancy. *Aust N Z J Obstet Gynaecol*. 2012; 52(4):377-9.
- Daponte A, Pournaras S, Deileoroglou E, Skentou H, Messinis IE. Serum interleukin 1- β , interleukin-8 and anti-heat shock 60 *Chlamydia trachomatis* antibodies as markers of ectopic pregnancy. *J Reprod Immunol*. 2012; 93:102-8.
- Vivoda M. Ispitivanje uloge hlamidijalnih stres proteina u nastanku vanmaterične trudnoće [magistarska teza]. Beograd: Medicinski fakultet Univerziteta u Beogradu; 2010.

Examination of Possible Role of the Chlamydial Stress Proteins in Pathogenesis of Ectopic Pregnancy

Maja Vivoda¹, Biljana Arsić², Eliana Garalejić^{2,3}, Ivana Ćirković⁴, Slobodanka Djukić⁴

¹Institute of Public Health of Serbia "Dr. Milan Jovanović Batut", Belgrade, Serbia;

²Clinic of Gynecology and Obstetrics "Narodni front", Belgrade, Serbia;

³Faculty of Medicine, University of Belgrade, Belgrade, Serbia;

⁴Institute of Microbiology and Immunology, Faculty of Medicine, University of Belgrade, Belgrade, Serbia

SUMMARY

Introduction *Chlamydia trachomatis* infections are the most prevalent bacterial sexually transmitted infections recognized throughout the world. In the last few years, several studies have indicated that predisposition of *C. trachomatis* to persist within the host cell is recognized as a major factor in the pathogenesis of chlamydial infection. During persistent chlamydial infection, the stress protein hsp60 is synthesized continually as immunopathologic antigen. Antibodies to hsp60 are found in women with tubal occlusion, but these antibodies are not detected in women with the acute *C. trachomatis* infection, which indicates that hsp60 has an important role in pathogenesis of persistent chlamydial infection.

Objective The aim of this study was to determine the role of chlamydial stress proteins (heat shock proteins) in pathogenesis of ectopic pregnancy.

Methods The study included 40 women with ectopic pregnancy (experimental group) and 34 women with normal pregnancy

(control group). *C. trachomatis* was detected in endocervical smears by direct immunofluorescence test, while specific antibodies against *Chlamydia* spp. and against hsp60 were detected by ELISA.

Results DIF method detected the presence of *C. trachomatis* in 12.5% of women with the ectopic pregnancy and 17.6% of women with normal pregnancy. IgG antibodies against *Chlamydia* spp. were found in 57.5% of women with the ectopic pregnancy and 26.5% of women with normal pregnancy. IgA antibodies were positive in 37.5% of women with the ectopic pregnancy and 2.9% of women with normal pregnancy. IgG antibodies against hsp60 were positive in 37.5% of women with the ectopic pregnancy and 14.7% of women with normal pregnancy.

Conclusion The results of this study have proven the correlation between the ectopic pregnancy and the presence of IgG antibodies to chlamydial hsp60.

Keywords: *Chlamydia*; ectopic pregnancy; stress proteins

Процена потребних ресурса за реализацију Националног програма раног откривања рака дојке

Немања Мајсторовић¹, Снежана Симић², Бојана Матејић², Младен Чуданов³

¹Републички фонд за здравствено осигурање Србије, Београд, Србија;

²Институт за социјалну медицину, Медицински факултет, Универзитет у Београду, Београд, Србија;

³Факултет организационих наука, Универзитет у Београду, Београд, Србија

КРАТАК САДРЖАЈ

Увод Чињеница да су вредности стандардизованих стопа умирања и оболевања од групе малигних болести у Србији, посебно рака дебелог црева, грлића материце и дојке, високе подстакла је формулисање националних програма за њихово рано откривање и ангажовање међународне помоћи за њихову реализацију.

Циљ рада Циљ рада је био да се начини процена потребних ресурса (временских, кадровских и финансијских) за примену Националног програма раног откривања рака дојке.

Методе рада Формулисана су три могућа сценарија – оптимистички, реалистички и песимистички – на основу очекиваног обухвата жена старости од 45 до 69 година скринингом и извршена процена сваког сценарија у погледу временске, кадровске и финансијске изводљивости за један циклус скрининга у трајању од две године. Као извори података коришћени су рутинска здравствена статистика и подаци из посебних анализа и извештаја рађених као припрема за добијање међународних пројеката.

Резултати Временски аспект остварљивости чак и у условима „релаксирања“ претпоставке о броју радних дана током године није доводио у питање остварљивост било којег сценарија. Кадровска остварљивост је једино могућа код песимистичког сценарија, док је финансијска донекле одржива код оптимистичког сценарија као најмање лоше решење због економије обима.

Закључак Формирањем почетне базе квалификованих радиолога и радиолошких техничара и успостављањем система њихове континуиране едукације, као и формирање посебне буџетске линије за трошкове прегледа жена, уз коришћење мамографа из донација и добру организацију и координацију, може се обезбедити несметано одвијање скрининга карцинома дојке у Републици Србији.

Кључне речи: скрининг карцинома дојке; ресурси; могућа сценарија; Република Србија

УВОД

У Србији се бележе релативно високе стопе морбидитета и mortalитета од рака. Од 1999. до 2009. године дошло је до повећања стандардизованих стопа mortalитета од рака: код мушкараца за 12,1% (од 235,7/100,000 до 264,1/100,000 становника), а код жена за 10,2% (од 146,5/100,000 до 161,5/100,000 становника). У истом периоду дошло је до повећања стандардизованих стопа mortalитета од рака дојке за 1,7% (од 29,5/100,000 до 30,0/100,000 становника) [1]. Са стандардизованим стопама mortalитета од рака (206,7/100,000) и посебно рака дојке (30,0/100,000) Србија се у 2009. години налазила у групи земаља Европе с високим стопама смртности од ових болести [2].

Уз извесне промене у вредностима стандардизованих стопа инциденције, од 1999. до 2009. године забележено је чешће оболевање жена од свих водећих локализација малигних тумора, осим од рака грлића материце, где је запажено смањење ове стопе. У истом периоду стандардизоване стопе инциденције од малигних тумора дојке код жена повећале су се за 35,5% (од 70,7/100,000 на 95,8/100,000 жена) [3].

Након анализе епидемиолошке ситуације с раком дојке, Републичка стручна комисија за рак дојке, коју је формирало Министарство здравља, сачинила је Национални програм за превенцију рака дојке (у даљем тексту Програм) [4]. Њиме су дефинисани основни и специфични циљеви превенције рака дојке у Србији, управљање и координација активностима скрининга, методе рада и праћење, контрола квалитета, евалуација и финансирање Програма. Предуслови за његову примену су обезбеђење одговарајуће опреме и кадра за мамографске јединице, првенствено специјалиста радиологије и рендген-техничара обучених за извођење мамографских прегледа, и обезбеђење финансијских средстава за његову реализацију.

У априлу 2008. године Влада Републике Србије потписала је финансијски договор с Европском комисијом о помоћи кроз ИПА фондове (ИПА – инструмент предприступне помоћи ЕУ). У оквиру програма ове помоћи је као један од приоритета означена имплементација Националног програма за рано откривање колоректалног карцинома, карцинома грлића материце и дојке. Одобрен је пројекат „Подршка извођењу националног програма за рано откривање рака

Correspondence to:

Bojana MATEJIĆ
Institut za socijalnu medicinu
Medicinski fakultet
Univerziteta u Beogradu
Dr Subotića 15, 11000 Beograd
Srbija
bmatejic@med.bg.ac.rs

у Србији“ и основана канцеларија за његову координацију [5, 6]. За део пројекта који се односи на рано откривање рака дојке предвиђена је обука 80 радиолога и 100 радиолошких техничара. Компонента развоја опреме укључује набавку 20 мамографа из донација ЕУ и 39 мамографа из донације Јапана. Уз едукацију потребног кадра и опрему било би основано 100 центара за мамографију (укључујући постојеће).

ЦИЉ РАДА

Циљ овог рада била је процена ресурса (финансијских, кадровских и временских) за примену Националног програма скрининга рака дојке у Србији на основу три сценарија његове изводљивости – оптимистичког, реалног и песимистичког, који би могли послужити као подстицај допуне Националног програма на одговарајућем нивоу.

МЕТОДЕ РАДА

Анализом доступних података који се рутински прикупљају или су део посебних извештаја припремљених за усвајање и примену Програма начињена је процена временских, кадровских и финансијских ресурса за три сценарија изводљивости Програма за први циклус скрининга рака дојке у Србији у трајању од две године.

Извори података

У раду су коришћени следећи извори података:

1. Број жена циљне популације од 45 до 69 година живота добијен је из демографских података Републичког завода за статистику на основу пописа 2002. године.

2. За увид у број и распоред рендген-техничара и специјалиста радиологије и супспецијалиста радиолошке заштите коришћена је база кадрова Института за јавно здравље (ИЗЈЗ) Републике Србије „Батут“ са стањем на дан 31. 12. 2011.

3. Број, територијални распоред и вредност донираних мамографа добијена је од канцеларије пројекта ЕУ „Подршка увођењу Националног програма за рано откривање рака у Србији“.

4. За процену броја и вредности пружених услуга мамографије осигураницима на рачун средстава обавезног здравственог осигурања коришћена је електронска фактура Републичког фонда за здравствено осигурање (РФЗО) за 2011. годину.

5. Подаци о кадровској и техничкој опремљености здравствених установа су добијени из Одсека за европске интеграције, планирање, припрему и праћење ИПА пројеката у Министарству здравља. Ови подаци су прикупљени упитником „Министарство здравља Републике Србије – Републичка стручна комисија за рак дојке, ради планирања набавке опреме, едукације учесника у Програму и организације скрининга“.

Претпоставке за анализу потребних ресурса у реализацији Националног програма за превенцију рака дојке

- Један циклус скрининга траје две године;
- У првом циклусу скрининга користиће се само мамографи добијени из донација (52 статична и два мобилна) пошто само они омогућавају висок квалитет мамографских слика уз минималну дозу зрачења, па се може претпоставити да ће задовољити критеријуме квалитета мамографских јединица за скрининг;
- Сви мамографи су аналогни или аналогно-дигитални (аналогни + CR додатак за дигитализацију, добијени из донације јапанске владе), јер 83% донације чине ове врсте мамографа;
- У свакој мамографској јединици (у даљем тексту МЈ) радиће по два лекара специјалиста радиологије, четири радиолошка техничара и два медицинска техничара;
- МЈ ради у две смене од по шест сати;
- У просеку, сваки члан тима МЈ учествује по 15 минута ефективно у пружању услуге мамографског прегледа;
- Један радиолог, као носилац тима МЈ, за једну шесточасовну радну смену може да квалитетно обради 24 налаза, тј. четири налаза на сат времена или један налаз на сваких 15 минута;
- Стандард пуног радног оптерећења током једне године, према препоруци РФЗО, износи 220 радних дана по одбијању годишњих одмора, државних празника и просечних дана боловања;
- Врши се двојно независно читавање мамографских слика од стране два радиолога;
- Прихvatљив ниво показатеља квалитета скрининга, према наводима у Европском водичу, јесте да ће 3% одазваних жена на скрининг из техничких разлога бити поново позвано на мамографско снимање, а 5% одазваних жена ће бити поново подвргнуто мамографији због боље анализе добијеног мамографског налаза [7].

Три различита сценарија изводљивости Програма формирана према очекиваном обухвату циљне популације жена старости 45–69 година

Обухват циљне популације је најважнији показатељ успешности скрининга. На основу те чињенице формирана су три могућа сценарија за која је урађена процена временске, кадровске и финансијске изводљивости Програма:

1. Оптимистички сценарио се заснива на препоруци Водича ЕУ да је за обезбеђивање квалитетног скрининга дојке као пожељан ниво показатеља извршења (перформанси) потребно да се најмање 70% свих позваних жена на преглед заиста одазове и уради мамографски преглед током једног циклуса скрининга [7];
2. Реални сценарио полази од претпоставки Канцеларије програма „Подршка увођењу Националног

програма за рано откривање рака у Србији“ ЕУ да ће одзив свих позваних жена за две године скрининга бити 50% циљне популације [5]; и

3. Песимистички сценарио се заснива на подацима Института за онкологију и радиологију Србије, где су радиолози те здравствене установе за једну годину прегледали скоро 50.000 жена из главног града, што чини око 17% циљне популације Београда [8].

За сваки сценарио су процењивани потребни временски, кадровски и финансијски ресурси.

Време

Време потребно за реализацију Програма поштује претпоставке рада у две смене – шест сати по смени МЈ, 15 минута потребног времена радиолога као носиоца тима за извршење једне услуге мамографије. Процена времена за сваки сценарио је урађена на основу броја дана потребних за обухват циљне популације жена, при чему је рачунато да 220 радних дана представља максимално могуће годишње временско ангажовање чланова тима у једној МЈ.

Кадрови

Процена потребних кадрова полази од истих претпоставки као и процена времена, с тим да се дефинише нормирана структура здравственог кадра по МЈ за рад у једној смени (један лекар специјалиста радиологије, два радиолошка техничара и један медицински техничар) као стандард, и врши се процена еквивалента пуног радног времена једне смене (ЕРВ), као мера оптерећења здравствених радника и сарадника. Процена ЕРВ је рађена према формули:

$$ЕРВ = (\Pi \times H \times T) / C,$$

где је Π – очекивани број одазваних жена према предвиђеном сценарију, H – број услуга мамографије пружених за годину дана, T – просечно трајање мамографске услуге по радиологу од 15 минута, а C – 220 радних дана годишње (шест сати ефективно с пацијентима).

Добијени резултати су прилагођени раду у две смене, тј. нормиран број радиолога је помножен са бројем смена и бројем МЈ, док је број потребног здравственог кадра – радиолога (ЕРВ) по МЈ помножен са бројем смена.

Сви подаци су моделовани по окрузима у Републици Србији. Као оцена да ли МЈ округа мање или више одступају од стандарда нормираног кадра коришћено је одступање ЕРВ потребног броја радиолога од нормираног броја радиолога по МЈ округа.

Финансијски ресурси

Процена финансијских ресурса подразумева процену директних трошкова (плате ангажованог кадра и трошкова амортизације опреме) и индиректних трошкова

(режије, управљања, грејања, осигурања опреме итд.), медицинских трошкова свих МЈ на нивоу Републике Србије, уз поштовање наведених претпоставки. За сваки сценарио утврђен је уобичајени трошак по мамографској услузи за прву и другу годину циклуса скрининга (без усклађивања с инфлацијом) и упоређен с просечном ценом мамографије утврђеном на основу електронске фактуре РФЗО.

Директни медицински трошкови су обухватили следеће:

- Трошкове кадра по једној услузи, који су добијени множењем временски нормираног ангажовања нормираног здравственог кадра за аналогни мамограф са пет минута бруто вредности радног сата ангажовања сваког члана тима;

- Укупан износ трошкова нормираног медицинског кадра МЈ, који је производ трошкова кадра по једној услузи с укупним бројем услуга мамографије датог сценарија;

- Бруто вредност радног сата ангажовања сваког члана тима, који се добија као количник обрачунате бруто плате одређене струке члана тима (елементи за обрачун су: просечан износ коефицијента за уговорени број радника са стањем исказаним у електронској пријави уговорених радника са РФЗО у марту 2012; коефицијенти из Уредбе о коефицијентима за обрачун и исплату плата запосленима у јавним службама, основице за обрачун и исплату плата запосленима у здравственим установама, пореза и доприноса према важећим прописима, утврђеног процента додатних средстава (за минути рад, дежурство, прековремени рад, приправност) према врсти здравствене установе. Нову основицу за обрачун плата у јавном сектору утврдила је Влада РС на предлог Министарства здравља ради усклађивања плата с фискалним правилима утврђеним одредбама Закона којим се уређује буџетски систем. На основу закључка Владе 05 број 120-8192/2011 од 1. новембра 2011. године, одређено је да се плате у здравственој делатности исплаћују од октобра 2011. по основици у нето износу од 2.420,33 динара] и просечног броја радних сати у месецу за 2011. годину (коришћен је просечан податак о броју радних дана у месецима 2011. године, који су основ за израчунавања најмање зараде у 2011. години) [9].

- Трошкови амортизације опреме у МЈ, који су обрачунати према Правилнику о номенклатури материјалних улагања и основних средстава са стопама амортизације [10], којим се дефинише да за „амортизациону групу 97: опрема за здравствену и социјалну заштиту: електронски медицински уређаји, инструменти, прибор и апарати“ годишња амортизациона стопа износи 20%. Свако правно лице усклађује методу амортизације и процењен век трајања коришћења основног средства водећи се критеријумима МРС 16 (Међународни рачуноводствени стандард 16). Годишње стопе амортизације прописане у Номенклатури одговарају коришћењу основних средстава до две смене. На основу Правилника о начину разврставања сталних средстава по групама и начину утврђивања

амортизације за пореске сврхе [11] амортизација за стална средства, разврстана у групе амортизације од II до V (где је и груписана медицинска опрема), утврђује се применом депресивне методе на укупну вредност средстава разврстаних по појединој групи. Депресивна метода је рачунски најкомпликованија за примену. Основица за обрачун амортизације по овој методи је садашња вредност. За ову методу основно је правило да се полази од претпоставке да се средства не троше равномерно, него да се у почетку троше више када им је и учинак највећи. Имајући у виду и то да се код буџетских корисника и корисника средстава организација за обавезно социјално осигурање за обрачун амортизације и за 2011. годину примењује Правилник о номенклатури нематеријалних улагања и основних средстава са стопама амортизације [10], наведеним корисницима издвојене су амортизационе групе које се најчешће користе. Претпостављени животни век експлоатације свих врста донираних мамографа је пет година. На процењену садашњу вредност опреме примењена је депресивна метода обрачуна амортизације, тачније, на вредност донације 52 статична и два мобилна мамографа у укупном износу од 5.843.409 евра (коришћењем средњег курса динара 111,0852 према једном евр, извор: Народна банка Србије на дан 26. 3. 2012), обрачуната је књиговодствена вредност дониране опреме сходно члану 41. Закона о девизном пословању [12].

Индиректне медицинске трошкове чине трошкови режије, управљања, грејања, осигурања опреме и други, који су, према препорукама добре рачуноводствене праксе [13], процењени на 10% од директних медицинских трошкова.

Стандардни трошак мамографије се добија као количник укупних директних и индиректних медицинских трошкова свих МЈ и броја услуга мамографије за сваки сценарио формулисан на основу очекиваног обухвата циљне популације, уз трошкове услуге поновне мамографије. Обрачунавају се посебно за прву и другу годину интервала скрининга.

Просечан трошак мамографије је количник фактурисане вредности мамографских услуга пружених на свим нивоима здравствене заштите о трошку здравственог осигурања у 2011. години и броја мамографских услуга које су здравствене установе фактурисале.

РЕЗУЛТАТИ

Као што је већ наведено, у првом циклусу скрининга користиће се мамографи добијени из донација (52 + 2 мобилна) пошто само они омогућавају висок квалитет мамографских слика уз минималну дозу зрачења. Према подацима Министарства здравља и ИЗЈЗ „Батут“, Србија је у 2007. години располагала са 40 аналогних мамографа неуједначене старости, квалитета и територијалне расподеле. Ниједан апарат није имао одговарајућу контролу квалитета, те њихово коришћење није предвиђено у овом програму.

Процена потребног времена

На основу броја дана потребних за реализацију скрининга утврђено је да су сва три сценарија временски остварљива за предвиђени циклус скрининга од две године (Табела 1), тако да се може постићи чак и већи обухват скринингом од оног који је предвиђен оптимистичким сценаријом (који предвиђа 70% обухвата циљне популације жена).

Анализом потребног времена на нивоу свих округа Србије установљен је вишак дана, односно „временска резерва“, која је на располагању организаторима скрининга. Стога је испитана претпоставка да је могуће смањити максималан број радних дана са 220 на 132 радних дана годишње (Табела 1). Оваква претпоставка реалније одражава случајеве у пракси, где се квалитетан кадар, поред прегледа пацијената, ангажује и на другим пословима радиолошке дијагностике. Тим МЈ, који ради шест сати у две смене, у овом случају би посветио три дана у радној недељи искључиво извођењу скрининга, односно 132 дана годишње. Тада би се ниво временске резерве постепено смањивао, од песимистичког сценарија ка оптимистичком, и то у свим окрузима Србије. Смањивање броја дана на годишњем нивоу који би тим МЈ посветио искључиво скринингу у значајнијем обиму једино угрожава остварење оптимистичког сценарија.

Процена потребних кадрова

Најбитнији елемент програма јесте здравствени кадар. Према подацима из припреме Програма, Србија је 2007. године имала на располагању 580 радиолога (10% се бави мамографском дијагностиком) и 755 ВСС и 712 ССС рендген-техничара. На болничким одељењима ради 28,3% свих специјалиста радиологије и 13% ВСС и 69% ССС рендген-техничара, док су остали организационо распоређени по дијагностичким службама осталих здравствених установа. Стога се као потенцијално ограничавајући фактор у почетној реализацији Националног програма може појавити број квалификованих радиолога. Стандард који је усвојен током 2010. године јесте да на 37.500 становника у државном здравственом сектору буде запослен по један радиолог. Према броју уговорених радника на свим нивоима здравствене делатности (РФЗО), има 612 специјалиста радиологије и 1.503 радиолошка техничара (стање на дан 12. 3. 2012), док према бази података ИЗЈЗ „Батут“, бележимо 626 радиолога и 1.742 радиолошка техничара (стање на дан 31. 12. 2011, рубрика „Специјализација/супспецијализација/остали облици усавршавања лекара запослених на неодређено и одређено време“).

Процена потребних кадрова извршена је анализом одступања између потребног и нормираног броја радиолога на нивоу свих округа у односу на пружање услуга мамографије за сваки наведени сценарио (Табела 2). Радиолози су у фокусу анализе пошто су

Табела 1. Процена потребног времена за реализацију скрининга рака дојке према три предвиђена сценарија
Table 1. Assessment of time required for implementation of screening for breast cancer in relation to three scenarios

Сценарио Scenario	Број дана колико годишње ради тим мамографске јединице Number of working days per year of the team in mammography unit	Интервал одступања по окрузима ($min < x < max$) Interval of deviations by district ($min < x < max$)	Одступања на нивоу свих округа Average deviations across all districts	Варијабилитет одступања на нивоу свих округа Variability of deviations across all districts
Оптимистички Optimistic	220	$-152 < N < 224$	-24.4	-19.29 (94.0)
	132	$-64 < N < 312$	63.6	68.71 (94.0)
Реални Realistic	220	$-171 < N < 97$	-80.3	-76.64 (67.2)
	132	$-84 < N < 185$	7.7	11.36 (67.2)
Песимистички Pessimistic	220	$-187 < N < -4$	-125.0	-122.51 (45.7)
	132	$-99 < N < 84$	-37.0	-34.51 (45.7)

Табела 2. Процена потребних кадрова за реализацију скрининга рака дојке према три сценарија
Table 2. Personnel feasibility required for implementation of screening for breast cancer in relation to three scenarios

Опис Description	Сценарио Scenario		
	Оптимистички Optimistic	Реални Realistic	Песимистички Pessimistic
Интервали одступања броја радиолога по окрузима ($min < x < max$) Interval of deviations in the number of radiologists by district ($min < x < max$)	$-2.3 < N < 19$	$-3.3 < N < 7.6$	$-4 < N < 3$
Нормирани број радиолога за две смене Standardized number of radiologists in two shifts	2	2	2
Сума потребног броја радиолога за две смене на нивоу свих округа Sum of required number of radiologists in two shifts at the level of all districts	184.9	132.1	89.8
Нормирани број радиолога на нивоу свих округа за две смене Standardized by number of radiologists across all districts in two shifts	104	104	104
Одступање потребног од нормираног броја радиолога на нивоу свих округа Deviations in required to standardized number of radiologists across all districts	80.9	28.07	-14.19
Просечно одступање броја радиолога на нивоу свих округа Average deviations in number of radiologists across all districts	2.89	1	-0.51
Варијабилитет одступања броја радиолога на нивоу свих округа Variability of deviations in number of radiologists across all districts	4.07	2.35	1.72

Табела 3. Процена потребних финансијских средстава, по услузи у динарима, за реализацију скрининга рака дојке према три сценарија
Table 3. Assessment of required financial resources, per service in RSD, for implementation of screening for breast cancer in relation to three scenarios

Сценарио Scenario	Процена стандардног трошка по услузи скрининга у мамографској јединици Assessment of standard cost per screening service in mammography unit		Просечан трошак по услузи за мамографију 2011. године* Average cost per service for mammography in 2011*	Одступање стандардног трошка по услузи мамографије од просечног трошка Deviation of standard cost per service of mammography compared to average cost	
	Прва година First year	Друга година Second year		Прва година First year	Друга година Second year
Оптимистички Optimistic	747	689	469	278	220
Реални Realistic	864	782		395	313
Песимистички Pessimistic	1057	937		588	468

* на основу електронске фактуре Републичког фонда за здравствено осигурање
 * based on the electronic invoice of the Health Insurance Fund

носиоци тима МЈ. Имајући у виду изражене разлике у броју потребних радиолога за пружање мамографских услуга по окрузима, једино је могуће остварити песимистички сценарио без кадровског недостатка, док су остала два сценарија неостварљива у погледу кадра.

Процена потребних финансијских средстава

Један од основних предуслова организовања Националних скрининг-програма јесте да се током дужег периода обезбеди његово несметано финансирање. Према неким проценама, тај период одрживог фи-

нансирања треба да обухвати пет циклуса скрининга у континуитету (десет година), и тек тада је могуће реално проценити достизање главног циља скрининга, а то је смањење смртности жена од рака дојке.

За процену потребних финансијских средстава за сваку годину циклуса скрининга извршено је поређење стандардног трошка с просечним (Табела 3). Трошкова структура и цена мамографије од које се пошло је обрачун РФЗО која, у складу са чланом 45. „Правилника о условима, критеријумима и мерилима за закључивање уговора са даваоцима здравствених услуга и за утврђивање накнаде за њихов рад за 2010. годину“ [14], покрива трошкове организовања рада

мобилног мамографа за рано откривање рака дојке у висини од 1.536 динара по пацијенту (трошкова структура укључује трошкове накнаде за рад, трошкове потрошног санитетског, медицинског и канцеларијског материјала и остале трошкове).

Анализа указује на чињеницу да су сва три сценарија финансијски неизводљива ако се има у виду њихово одступање од просечног трошка које РФЗО тренутно плаћа у 2012. години. Оптимистички сценарио најмање одступа од просечног трошка, па је као такав и најекономичнији. Како 90% укупних медицинских трошкова чине трошкови за плате и амортизацију, они се третирају као фиксан трошак који ће по јединици активности опадати ако се повећава обим активности, тако да се уз присуство економије обима стандардни трошак по јединици пружене мамографске услуге највише смањује код оптимистичког сценарија.

ДИСКУСИЈА

Покушаји да се начини процена потребних ресурса за примену било којег националног програма чији је циљ рано откривање болести или неке друге мере и активности здравствене заштите недостају у домаћој литератури. Приметан је доста скроман осврт на финансијски део националних програма у Републици Србији, што се може видети и на примеру Националног програма за превенцију рака дојке, где је у последњој тачки са неколико пасуса доста неодређено наведен начин финансирања наведеног програма [4]. Не наводећи процену трошкова било које фазе скрининга, Национални програм за превенцију рака дојке предвиђа посебну буџетску линију која ће се уговарати сваке године према предложеном једногодишњем финансијском плану и чија средства ће се користити ради покрића свих трошкова извођења и додатне трошкове примене програма организованог скрининга. Такође наводе да трошкове услуга циљног прегледа на рано откривање рака дојке на који, према Правилнику о садржају и обиму права на здравствену заштиту из обавезног здравственог осигурања и о партиципацији [15], имају право жене старости од 45 до 69 година једанпут у две године, сноси Републички фонд за здравствено осигурање, као и све друге додатне трошкове које у вези с обављањем послова скрининга има здравствена установа.

У иностраној литератури која се детаљно бави исплативошћу (енгл. *cost-effectiveness analysis* – CEA) мамографије и клиничког прегледа код раног откривања рака дојке наводе се трошкови и ефекти ових интервенција и пореде различити програми [16, 17, 18]. Радови после 2000. године користе за објашњење и процену одговарајућег сценарија за мамографски скрининг компјутерске симулације и Марковљеве моделе [16, 17], тако да је тешко њихове резултате упоредити са сиромашним искуством у нашој земљи и резултатима овога рада.

Према резултатима нашег истраживања, могуће је остварити једино песимистички сценарио имајући у

виду расположиве кадрове и време како би скрининг, према очекиваном обухвату, био завршен за две године. Укупно је, према наведеном сценарију, потребно 89 обучених радиолога за рад МЈ у две смене. Тренутна ситуација у вези с компетенцијама радиолога у области мамографије се оцењује доста неповољно јер тек двадесетак радиолога има више од 500 мамографија урађених за годину дана (3,2% радиолога), тридесетак радиолога је завршило основни двомесечни курс едукације (4,9% радиолога) и не више од 15 радиолога се бави искључиво мамографским или радиолошким прегледима дојки. Према активностима Канцеларије ЕУ „Подршка увођењу Националног програма за рано откривање рака у Србији“, до јула 2013. године ће бити завршена обука 80 радиолога и 100 радиолошких техничара за рано откривање и дијагностиковање рака дојке.

Основне дилеме које се разматрају у радовима о скринингу рака дојке се односе на временски интервал трајања једног циклуса скрининга, обухват циљне популације и процену укупног или појединачног трошка раног откривања. Тако шведско искуство показује да, према курсу шведске круне у односу на евро из 2002. године, укупни годишњи трошкови свих пружених услуга скрининга су нешто више од 21 милион евра, док је цена једног скрининга у опсегу од 21 до 53 евра по услузи, те да трошкови скрининга чине 22% свих директних медицинских трошкова који се односе на рак дојке [19]. Једини финансијски показатељ трошка скрининга из окружења који је доступан јесте из Словеније, где је организован програм раног откривања рака дојке „ДОРА“ (уведен лета 2008. године) и још је у пилот-фази [6]. У Словенији је 2010. године обављена 9.721 услуга мамографије у вредности од 1.049.402 евра, што је по јединици пружене услуге скоро 108 евра, тако да су, према нашем песимистичком сценарију, трошкови по мамографској услузи више од десет пута нижи од словеначких.

Један од главних недостатка овога рада је усмерење само на трошкове и техничку, кадровску и временску изводљивост раног откривања рака дојке, при чему нису обухваћени остали елементи здравствене заштите повезани с овом болешћу, почев од лечења, превенције, рехабилитације и дугорочне бриге о женама с наведеном дијагнозом. Регионално гледано, само је Словенија 2007. године помоћу Марковљевог модела покушала да стављањем у однос трошкова и ефеката 36 могућих програма скрининга, који се разликују по старосној групи која је предмет скрининга и интервала између два скрининга, и алтернативне опције да се скрининг не ради, закључила да најбољи однос инкременталних трошкова и ефеката с квалитетним годинама живота (енгл. *incremental cost-effectiveness ratio and quality adjusted life years* – ICERs/QALYs) има опција скрининга жена старости 40–80 година на сваке три године [16]. У групи трошковно ефикасних програма за жене старости 45–69, као и у нашој земљи, било би најбоље ако би се на основу словеначког искуства скрининг изводио у интервалу од три године.

Potrebno je spomenuti rad američkih autora [20] koji su pokušali da obухвате трошкове скрининга мамографијом и свих додатних дијагностика које су након скрининга неопходне. Дали су осврт на ниво укупних директних медицинских трошкова и проценат учешћа сваког од њих, а односе се на рано откривање рака дојке и додатне анализе сумњивих налаза. Нека веза с овим радом би могла да се успостави, јер су се аутори користили ценовником из 2002. године који плаћа *MEDICARE* (амерички програм здравствене заштите за старија лица), и то за услугу радиолошког снимања дојке у два правца – мамографија, која је садржана и у ценовнику РФЗО коришћеном за процену ценовног одступања стандардног трошка од просечног трошка по фактури РФЗО. Ценовно поређење оба рада није потпуно прихватљиво јер је ова услуга, према *MEDICARE*, 2002. године коштала 81,81 амерички долар, док по ценовнику РФЗО из 2012. године износи 457 динара, али се може узети њихово запажање да ценовник *MEDICARE*, самим тим и РФЗО, може само представљати грубу процену директних медицинских трошкова пружања услуга мамографије и тренутно, у недостатку других мерила, они су једини разуман и практичан сурогат за оквирну процену наведених трошкова. Из наведеног рада се уочава и немогућност процене директних немедицинских трошкова (нпр. трошкови превоза становника до МЈ, трошкови пропагандног материјала и слања поште итд.), што доводи до потцењивања укупних директних трошкова које генерише Национални програм скрининга за сваки примењени циклус.

Један од главних проблема у овом раду је непостојање података о мамографима у здравственим установама и да ли они задовољавају критеријуме квалитета.

У оквиру активности пројекта Министарства здравља „Развој здравства Србије – додатно финансирање“ било је предвиђено да се од септембра до децембра 2011. године преко мреже института и завода за јавно здравље изврши попис медицинске опреме у свим здравственим установама у Србији, међутим, наведени пројекат је у октобру прошле године обустављен, тако да су у раду коришћени подаци о распореду донираних мамографа (стање из марта 2012. године), добијени од Канцеларије ЕУ „Подршка увођењу Националног програма за рано откривање рака у Србији“.

ЗАКЉУЧАК

Неопходна финансијска средства за скрининг рака дојке би у првој години требало повећати, у зависности од сценарија, од 0,14% до 0,20%, а у другој години од 0,12% до 0,18% финансијског плана РФЗО. Имајући у виду чињеницу да је најважније да се мамографска услуга обави квалитетно, требало би се ослонити само на дониране мамографе уз следствено смањење капацитета и број МЈ.

Према резултатима овога рада, у садашњим условима кадровске структуре, финансијских ресурса и расположиве опреме, реално је очекивати да скрининг рака дојке може тек за три до пет година да поприми динамику по којој би највећи део циљне популације био радиографисан сваке друге године. Резултати истраживања истовремено указују на потребу пажљиве процене потребних кадрова, опреме и финансијских средстава за примену националних програма и прихватање само оних за које су кадрови обучени а финансијска средства и опрема обезбеђени, како би они били одрживи.

ЛИТЕРАТУРА

1. Institut za javno zdravlje Srbije „Dr Milan Jovanović Batut“. Standardizovane stope smrtnosti stanovništva (prema standardnoj populaciji Evrope) iz baze podataka umrlih Republičkog zavoda za statistiku. Nepublikovani podaci, 2010.
2. WHO European mortality database – MDB [Internet]; c2010 [accessed 2012 Mar 5]. Available from: <http://data.euro.who.int/hfad>.
3. Institut za javno zdravlje Srbije „Dr Milan Jovanović Batut“, Zdravstveno-statistički godišnjak Republike Srbije 2010. Beograd; 2011.
4. Ministarstvo zdravlja Republike Srbije. Nacionalni program za prevenciju raka dojke. Službeni glasnik RS, br. 15/2009.
5. Evropska unija. Podrška uvođenju Nacionalnog programa za rano otkrivanje raka u Srbiji. [accessed 2012 Feb 5]. Available from: <http://www.screeningsrbia.rs/>.
6. Keber D. Prezentacija na temu: Principi planiranja i financiranja programa skrininga raka [Internet]. Kancelarije Evropske unije „Podrška uvođenju Nacionalnog programa za rano otkrivanje raka u Srbiji“. Seminar o skriningu karcinoma za osoblje regionalnih zavoda za javno zdravlje Srbije, novembar 2011; [accessed 2012 Feb 5]. Available from: <http://www.screeningsrbia.rs/sites/default/files/Keber%20Organizacija%20i%20finansiranje%20skrininga.pdf>.
7. European guidelines for quality assurance in breast cancer screening and diagnosis [Internet]. Fourth Edition. c2006 [accessed 2012 Feb 6]. Available from: <http://bookshop.europa.eu/en/european-guidelines-for-quality-assurance-in-breast-cancer-screening-and-diagnosis-pbND7306954/>.
8. Rakočević Z. Prezentacija na temu: Skrining raka dojke [Internet]. Republička radna grupa za rano otkrivanje i skrining raka dojke; decembar 2010 [accessed 2012 Mar 5]. Available from: URL: <http://minzdravlja.info/.../2010/.../Decembar2010SrbijaProtivRaka3.pdf>.
9. Zakon o platama državnih službenika i nameštenika. Službeni glasnik RS, br. 62/06, 63/06 - ispr., 115/06 - ispr., 101/07 i 99/10.
10. Pravilnik o nomenklaturi nematerijalnih ulaganja i osnovnih sredstava sa stopama amortizacije. Službeni glasnik RS, br. 17/97 i 24/00.
11. Pravilnik o načinu razvrstavanja stalnih sredstava po grupama i načinu utvrđivanja amortizacije za poreske svrhe. Službeni glasnik RS, br. 116/2004.
12. Zakon o deviznom poslovanju. Službeni glasnik RS, br. 62/2006.
13. NHS Manual for Accounts Programme Budgeting 2010/11 – Programme Budgeting Guidance 2010/11 [Internet], c 2011 [accessed 2012 Mar 5]. Available from: <http://www.info.doh.gov.uk/doh/finman.nsf>.
14. Republički fond za zdravstveno osiguranje. Pravilnik o uslovima, kriterijumima i merilima za zaključivanje ugovora sa davaocima zdravstvenih usluga i za utvrđivanje naknada za njihov rad 11 [Internet], c 2011 [accessed 2012 Mar 5]. Available from: <http://www.rfzo.rs/index.php/pravilnici>.
15. Pravilnik o sadržaju i obimu prava na zdravstvenu zaštitu iz obaveznog zdravstvenog osiguranja i o participaciji. Službeni glasnik RS, br. 12/2012.
16. Rojnik K, Naversnik K, Mateović-Rojnik T, Primic Žakelj M. Probabilistic cost-effectiveness modeling of different breast cancer screening policies in Slovenia. Value Health. 2008; 11(2):139-48.

17. Arveux P, Wait S, Schaffer P. Building a model to determine the cost-effectiveness of breast cancer screening in France. *Eur J Cancer Care*. 2003; 12:143-53.
18. Norum J. Breast cancer screening by mammography in Norway: is it cost-effective? *Ann Oncol*. 1999; 10:197-203.
19. Lidgren M, Wilking N, Jönsson B. Cost of breast cancer in Sweden in 2002. *Eur J Health Econ*. 2007; 8(1):5-15.
20. Poplack S, Carney P, Weiss J, Titus-Ernstoff L, Goodrich M, Tosteson A. Screening mammography: costs and use of screening-related services. *Radiology*. 2005; 234(1):79-85.

Assessment of Required Resources for Implementation of National Breast Cancer Screening Program in Serbia

Nemanja Majstorović¹, Snežana Simić², Bojana Matejić², Mladen Čudanov³

¹Republic Fund of Health Insurance, Belgrade, Serbia;

²Institute of Social Medicine, Faculty of Medicine, University of Belgrade, Belgrade, Serbia;

³Faculty of Organizational Sciences, University of Belgrade, Belgrade, Serbia

SUMMARY

Introduction High values of standardized mortality and morbidity rates of standardized cancer mortality in Serbia, especially colorectal, cervical and breast cancer led to creation of national programs for their early detection and engagement of the international support for their implementation.

Objective Assessment of required resources (time, personnel, financial) to implement the National program for screening of breast cancer in the Republic of Serbia.

Methods Three possible scenarios have been prepared (optimistic, realistic and pessimistic) based on the expected coverage by screening of women aged 45 to 69 years, and time, personnel and financial feasibility estimates were made for a two-year screening cycle.

Results Time aspect of feasibility even under conditions of "relaxation" of the assumption on the number of working days

during the year did not question feasibility of any of the scenarios. Personnel feasibility is only possible in the pessimistic scenario, while the financial feasibility only makes sense in optimistic scenario as the least unfavorable solution due to economies of scale.

Conclusion Establishment of the initial base of skilled radiologists and radiology technicians and the system for their continuous medical education as well as allocation of specific MoH budget line for screening program expenditures, along with donated mammographs and good organization and coordination, may provide unobstructed implementation of the National program for early detection of breast cancer in the Republic of Serbia.

Keywords: breast cancer screening; resources; possible scenarios; Republic of Serbia

Примљен • Received: 19/02/2013

Прихваћен • Accepted: 19/06/2013

Surgical Treatment of Intradiploic Epidermoid Cyst Treated as Depression

Nenad Živković^{1,2}, Marko Marković^{1,2}, Goran Mihajlović^{3,4}, Milan Jovanović⁵

¹Department of Neurosurgery, Clinical Hospital Center Zemun, Belgrade, Serbia;

²Faculty of Medicine, University of Belgrade, Belgrade, Serbia;

³Clinic for Psychiatry, Clinical Center, Kragujevac, Serbia;

⁴Faculty of Medical Sciences, University of Kragujevac, Kragujevac, Serbia;

⁵Otorhinolaryngology Department, Clinical Hospital Center Zemun, Belgrade, Serbia

SUMMARY

Introduction Extradural intradiploic epidermoid cysts are rare, representing less than 0.25% of all primary intracranial tumors. They can be neurologically silent and can only present psychiatric symptoms like depression, cognitive or personality changes.

Case Outline A 68-year-old male with two year long history of depressive mood, lack of motivation, helplessness, hopelessness and poor response to antidepressive drug therapy was described. CT scan showed a well-defined mass in the parietal scalp with destruction of the skull. He underwent intracranial tumor resection. Surgical resection and cranioplasty were performed. Pathology confirmed intradiploic epidermoid cyst.

Conclusion Total removal of these cysts and repeated washing of the cavity with 0.9 % saline may prevent recurrence and aseptic meningitis and may improve mental state of the patient. We also emphasize the need for neuroimaging studies in a patient with atypical changes in mental status, even without neurological signs or symptoms.

Keywords: epidermoid cyst; brain tumor; depression

INTRODUCTION

The cysts originate during weeks 3–5 of gestation from the ectodermal cellular remnants that arise from the incomplete cleavage of the neural ectoderm from the cutaneous ectoderm. Epidermoid cysts have been described as non-neoplastic cysts and represent approximately 1% of all primary intracranial tumors. They may be intradural (usually extra-axial) or extradural (usually arising in the diploic space of calvaria). Intradural cysts most frequently involve the posterior cranial fossa, especially the cerebellopontine angle (CPA).

Extradural intradiploic epidermoid cysts, like epidermoid cysts in other cranial locations, are rare, accounting for less than 0.25% of all primary intracranial tumors [1, 2]. They can be located in any part of the skull, and occur from the first to the seventh decade [3]. These lesions are usually discovered incidentally and may remain asymptomatic for many years. They can be often manifested only through the changes in mental state and remain undiscovered for many years if they grow intracranially and produce brain compression or undergo malignant change [4].

Intracranial tumors may give rise to symptoms simulating depression, anxiety states, hypomania and schizophrenia [5]. Most often, it is slow-growing benign tumors that are responsible.

Epidermoid cysts usually grow insidiously at a linear rate, and can result in slow onset

of neurological and psychiatric symptoms. Patients can present with depression, anxiety, cognitive or personality changes, psychosis, apathy/abulia [5, 6]. Psychiatric symptoms, such as depression or mania, may be initial presenting symptoms in some cases of brain tumors [7–11].

In this report, we describe the clinical, radiologic and pathologic aspects of a 68-year-old male with an epidermoid cyst of the parietal bone.

CASE REPORT

A 68-year-old male patient was admitted to Neurosurgery Department, Clinical Hospital Center Zemun, with minor weakness of the right side of his body and subcutaneous mass on the left parietal scalp.

A year and a half ago, before admission, he consulted a psychiatrist due to depressive thoughts and problems with memory and motivation. The patient had frequent headaches, depressed mood most of the day, diminished interest in almost all activities, insomnia, increased appetite and diminished ability to think or concentrate and remember. There was no organic problem in his medical history, no head traumas, and there was no family history of neuropsychiatric diseases. He also mentioned the dysesthesia on the left side of the skull. The patient was treated after being diagnosed as psycho-organic syndrome (mild

Correspondence to:

Nenad ŽIVKOVIĆ
Department of Neurosurgery
Clinical Hospital Center Zemun
Vukova 9, 11000 Belgrade
Serbia
drnzivkovic@yahoo.com

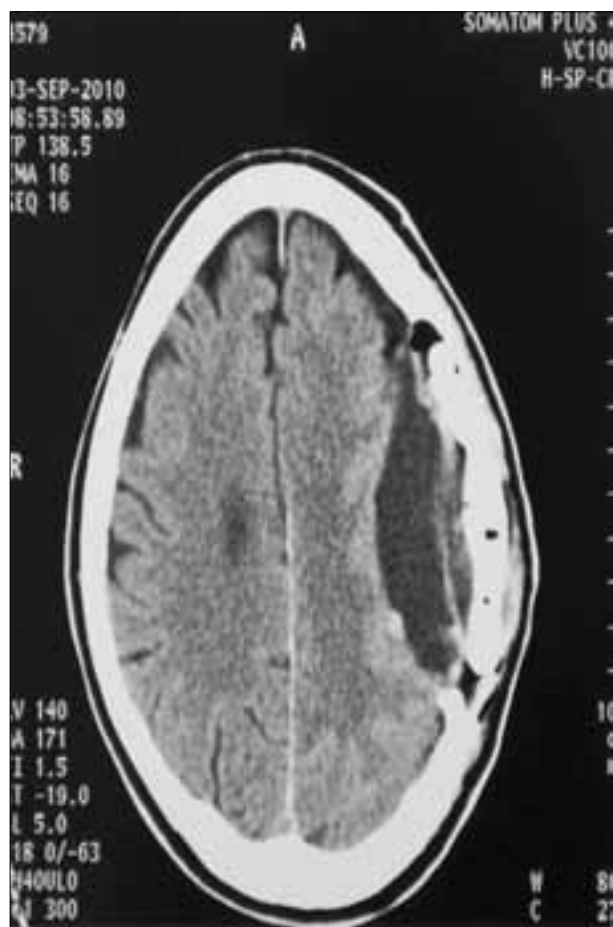


Figure 1. CT scan showing well-defined mass (6×7 cm) in the parietal scalp with destruction of the skull and compressed brain tissue

cognitive disorder) and major depression with tanzan, sertraline and lorazepam. After one-year treatment with antidepressive drugs there was no change in his symptomatology. An electroencephalogram (EEG) was done and it was normal. He was examined by the psychiatrist one month before hospitalization because his symptoms progressively worsened and he got weakness of the right side of his body and difficulties with speaking.

CT scan was indicated and showed a well-defined mass (6×7 cm) in the parietal scalp with the destruction of the skull (Figure 1) and compressive effect on the left ventricle. Epidermoid cyst originating from diploe and eosinophilic granuloma was considered. Preoperative cerebral angiography was undertaken to check the blood supply of the mass and eliminate vascular anomalies: abnormality was not observed. No further neuroradiological examination was needed because the present finding showed clearly extracerebral mass with parietal bone erosion. The patient denied any kind of trauma to this region. His routine hematological and biochemical parameters were normal.

There were no well-defined margins in the deep portion and the mass was totally removed under general anesthesia. Intraoperatively, epidermoid tumor was exposed upon the skin incision beneath the galea aponeurotica pericranial layer. The tumor was light and white colored and was associated with parietal bone erosion (Figure 2). After the

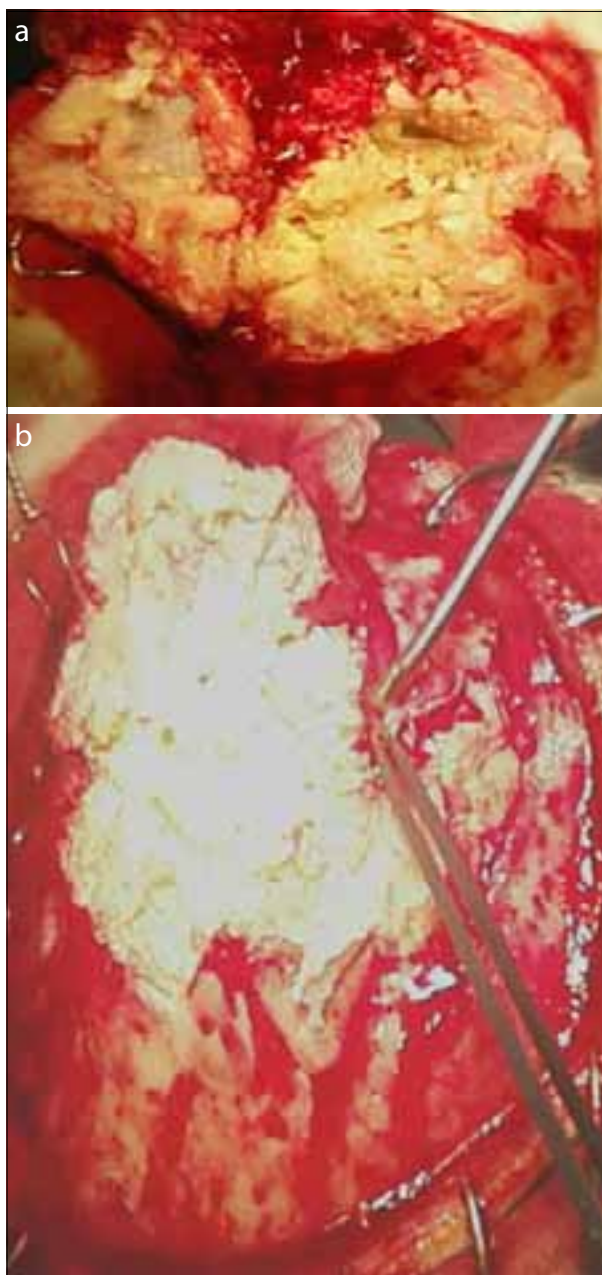


Figure 2. Intraoperative images: a) the tumor was avascular, lightly colored, and soft; b) the parietal bone was partially eroded and damaged

dissection of tumor margins, it was intraoperatively shown that the tumor infiltrated all parietal bone tissue with its intracranial extension to the dura. Dura matrix was intact. Surgical finding confirmed that the tumor originated from diploe. Complete removal of the tumor and cranioplasty were carried out (Figure 3).

Frozen and paraffin sections showed that the cystic structure was lined by squamous epithelium containing laminated keratin material. Pathologic findings confirmed the suspicion of intradiploic epidermoid cyst.

Postoperative recovery was uneventful, and the patient was discharged nine days after surgery without neurological signs and antidepressive medications were not restarted following the surgery. In the early postoperative period, an improvement in his psychic condition was evident. He



Figure 3. CT scan after six months showing no recurrence of epidermoid cyst

had not symptoms of frequent headaches and manifested depressive thoughts. His motivation was improved, he started to sleep and eat better and his activities in every day life improved. During the following six months after the surgery there was no evidence of tumor recurrence.

DISCUSSION

Epidermoid tumors were first described in 1829 by the French pathologist Cruveilhier. Since Cushing [12] first described a large diploic epidermoid cyst in 1922, only a few cases of giant calvarial intradiploic epidermoids have been reported.

These rare lesions arise from displaced ectodermal cells during the closure of the neural tube in weeks 3–5 of embryonic life. The lesions grow very slowly along natural cleavage planes. By the time of diagnosis, they usually involve several regions; therefore, it is difficult to locate their exact origin. Approximately 40% to 50% of intracranial epidermoid tumors are localized to the CPA, making it the most common intracranial location. Extradural intradiploic epidermoid cysts, like epidermoid cysts in other cranial locations, are rare, representing less than 0.25% of all primary intracranial tumors [1, 2]. Epidermoid neoplasms are more common in men than in women, with the onset of symptoms occurring between the ages of 20 and 50 years [2]. Although both diploic tables are frequently involved, giant diploic epidermoids are associated with

the extensive destruction of the inner table and prevalent intracranial growth [13, 14].

The diagnosis of epidermoid cyst was suggested by imaging (skull radiographs, CT scan, MRI) and confirmed by histology. CT scan allows for good assessment of both skull involvement and intracranial extension and reveals the exact site, limits, and characteristic bone defects of these lesions [3]. The typical CT aspect is a large homogeneous hypodense unenhancing mass, with or without calcifications, typically showing a density range of -20 to $+20$.

Differential diagnosis should include dermoid cyst, hydatid cyst, arachnoid cyst, cholesterol granuloma, eosinophilic granuloma, aneurysmal bone cyst, and meningioma [3]. It is particularly common to misdiagnose an epidermoid cyst as a dermoid cyst, as the difference between them is mainly histological.

The definite diagnose can be achieved by surgical removal and histopathological confirmation.

The indications for surgery include cosmetic effect, prevention of progression of psychiatric symptoms and neurological deficit, treatment of osteomyelitis, and resection of cysts with malignant degeneration [1]. Most cranial epidermoids are small and do not extend intracranially, but progressive growth may result in large cranial defects or compression of the brain and vascular structures [15, 16]. Removal of these tumors and subsequent cranioplasty, despite their large size, are recommended [17], particularly for very large intradiploic epidermoid cysts associated with significant bony defects [1]. Total removal of these cysts is associated with a very good long-term prognosis [18, 19]. Recurrence is likely if the cyst wall is not completely removed, with a recurrence rate of 8.3–25.0% [20]. We were able to remove the cyst and capsule completely in our patient. Repeated washing of the cavity with 0.9% saline prevented aseptic meningitis and recurrence. A postoperative antibiotic regimen was implemented to prevent infection.

This case also illustrates the need for a prompt thorough assessment when patients present any atypical psychiatric symptoms or changes in their mental state. Brain imaging should be undertaken.

Our 68-year-old male patient was treated in a psychiatric department for a year and a half before the brain tumor was diagnosed. It is unclear in our case whether his psychiatric symptoms were caused by large epidermoid cyst or he developed tumor at a later stage. Atypicality of presentation, poor response to treatment or waxing of symptoms should lead to suspicion of brain tumor. It is possible that magnetic resonance imaging/CT scan with contrast may have detected the mass earlier.

As in our case, the mass was associated with the massive bone destruction and intracranial extension with the compressive effect on the brain, which caused depression and psycho-organic syndrome in the first place and later on the weakness on the left side of his body and dysphasia. A lot of tumors are manifested only with changes in the mental state and usually with uncommon symptoms. The most common is depression, lack of motivation and memory deficits. One of the alarming signs of the tumor presence is resistance to antidepressive drug therapy. Treatment of

diagnosed depression is sometimes problematic in patients with brain tumors. The timing of the initial prescription of the medications relative to the diagnosis of the tumor is unknown. The side effects of antidepressant medications on patients with brain tumors are not well featured. Almost all antidepressant medications may lower seizure threshold [21, 22]; which antidepressant would be least likely associated with the increased seizure activity in this situation is not clearly defined. The usual side-effects of particular anti-depressant medications are at risk for being magnified by the presence of the brain tumor. Perhaps most importantly, the efficacy of anti-depressant medications in this patient population is unknown.

Intradiploic epidermoid cysts are benign lesions of the skull that may undergo malignant transformation. It is important to consider this diagnosis in a patient who presents with a slowly progressive scalp mass that demonstrates a lytic lesion on the x-ray. Precise radiological assessment and complete removal of the tumor and its capsule are essential for a good long-term prognosis. Repeated washing of the cavity with 0.9% saline may prevent aseptic meningitis and recurrence. This case also illustrates the need for prompt assessment when patients present with any atypical psychiatric symptoms or changes in the mental state. Brain imaging should be undertaken in such cases.

REFERENCES

1. Prall JA, Lloyd GL, Breeze RE. Traumatic brain injury associated with an intradiploic epidermoid cyst: case report. *Neurosurgery*. 1995; 37:523-5.
2. Hakyemez B, Aksoy U, Yildiz H, Ergin N. Intracranial epidermoid cysts: diffusion-weighted, FLAIR and conventional MR findings. *Eur J Radiol*. 2005; 54:214-20.
3. Bikmaz K, Cosar M, Bek S, Gokduman CA, Arslan M, Iplikcioglu AC. Intradiploic epidermoid cysts of the skull: a report of four cases. *Clin Neurol Neurosurg*. 2005; 107:262-7.
4. Tamura K, Aoyagi M, Wakimoto H, Tamaki M, Yamamoto K, Yamamoto M, et al. Malignant transformation eight years after removal of a benign epidermoid cyst: a case report. *J Neurooncol*. 2006; 79:67-72.
5. Madhusoodanan S, Danan D, Brenner R, Bogunovic O. Brain tumor and psychiatric manifestations: a case report and brief review. *Ann Clin Psychiatry*. 2004; 16:111-3.
6. Moise D, Madhusoodanan S. Psychiatric symptoms associated with brain tumors: a clinical enigma. *CNS Spectr*. 2006; 11:28-31.
7. Bunevicius A, Deltuva VP, Deltuviene D, Tamasauskas A, Bunevicius R. Brain lesions manifesting as psychiatric disorders: eight cases. *CNS Spectr*. 2008; 13:950-8.
8. Litofsky NS, Resnick AG. The relationships between depression and brain tumors. *J Neurooncol*. 2009; 94:153-61.
9. Arnold SD, Forman LM, Brigidi BD, Carter KE, Schweitzer HA, Quinn HE, et al. Evaluation and characterization of generalized anxiety and depression in patients with primary brain tumors. *Neuro Oncol*. 2008; 10:171-81.
10. Jarquin-Valdivia AA. Psychiatric symptoms and brain tumors. *Arch Neurol*. 2004; 61:1800-4.
11. Živković N, Berisavac I, Marković M, Benović R, Samardžić M, Popović I. Psychiatric manifestations of brain tumors. *Materia Medica*. 2010; 26:173-6.
12. Cushing H. A large epidermal cholesteatoma of the parietotemporal region deforming the left hemisphere without cerebral symptoms. *Surg Gynecol Obstet*. 1922; 34:557-66.
13. Arana E, Latorre FF, Revert A, Menor F, Riesgo P, Liano F, et al. Intradiploic epidermoid cysts. *Neuroradiology*. 1996; 38:306-11.
14. Constans JP, Meder JF, de Divitiis E, Donzelli R, Maiuri F. Giant intradiploic epidermoid cysts of the skull. Report of two cases. *J Neurosurg*. 1985; 62:445-8.
15. Rengachary S, Kishore PR, Watanabe I. Intradiploic epidermoid cyst of the occipital bone with torcular obstruction. Case report. *J Neurosurg*. 1978; 48:475-8.
16. Skandalakis JE, Godwin JT, Mabon RF. Epidermoid cyst of the skull: report of four cases and review of the literature. *Surgery*. 1958; 43:990-1001.
17. Jaiswal AK, Mahapatra AK. Giant intradiploic epidermoid cysts of the skull. A report of eight cases. *Br J Neurosurg*. 2000; 14:225-8.
18. Constans JP, Meder JF, De Divitiis E, Donzelli R, Maiuri F. Giant intradiploic epidermoid cysts of the skull. Report of two cases. *J Neurosurg*. 1985; 62:445-8.
19. Guridi J, Ollier J, Aguilera F. Giant intradiploic epidermoid tumor of the occipital bone: case report. *Neurosurgery*. 1990; 27:978-80.
20. Yanai Y, Tsuji R, Ohmori S, Tataru N, Kubota S, Nagashima C. Malignant change in an intradiploic epidermoid: report of a case and review of the literature. *Neurosurgery*. 1985; 16:252-6.
21. Baldessari RJ. Drug therapy of depression and anxiety disorders. In: Brunton LL, editor. *Goodman and Gilman's the Pharmacological Basis of Therapeutics*. 11th ed. New York: The McGraw Hill Companies, Inc; 2006. Ch. 17 [on-line edition].
22. Hall G, Fitzgerald DJ. Psychiatric emergencies. In: Stone CK, Humpries RL, editors. *Current Diagnosis and Treatment: Emergency Medicine*. 6th ed. Texas: The McGraw Hill Companies, Inc; 2008. Ch. 47 [on-line edition].

Хируршко лечење интрадиплоичне епидермоидне цисте лечене као депресија

Ненад Живковић¹, Марко Марковић¹, Горан Михајловић², Милан Јовановић³

¹Одељење неурохирургије, Клиничко-болнички центар „Земун“, Београд, Србија;

²Клиника за психијатрију, Клинички центар, Крагујевац, Србија;

³Одељење за оториноларингологију, Клиничко-болнички центар „Земун“, Београд, Србија

КРАТАК САДРЖАЈ

Увод Екстрадуралне интрадиплоичне епидермоидне цисте су ретке и чине мање од 0,25% свих интракранијалних тумора. Болесници с овим цистама могу бити без неуролошких тегоба и испољити само психијатријске симптоме, као што су депресија, когнитивне или промене личности.

Приказ болесника Приказан је мушкарац стар 68 година који се две године пре пријема лечио због депресивног расположења, недостатка мотивације и беспомоћности и код којег је забележен лош одговор на терапију антидепресивима. Скенер ендокранијума је показао јасно дефинисану масу паријетално са деструкцијом кости лобање. Урађена

је екстирпација интракранијалног тумора са краниопластиком. Патохистолошки налаз је потврдио интрадиплоичну епидермоидну цисту.

Закључак Екстирпација епидермоидне цисте и прање кавума физиолошким раствором у концентрацији од 0,9% може да спречи рецидив и појаву асептичног менингитиса, а може и побољшати психичко стање болесника. Такође наглашавамо потребу за раном неурорадиолошком дијагностиком код особа са нетипичним променама менталног статуса, чак и без неуролошких симптома и знакова обољења.

Кључне речи: епидермоидна циста; тумор на мозгу; депресија

Примљен • Received: 17/04/2012

Прихваћен • Accepted: 09/07/2012

Prophylactic Thyroidectomy for Asymptomatic 3-Year-Old Boy with Positive Multiple Endocrine Neoplasia Type 2A Mutation (Codon 634)

Maja D. Ješić^{1,2}, Milina Tančić-Gajić³, Miloš M. Ješić^{1,2}, Vladan Živaljević^{1,4}, Silvija Sajić^{1,2}, Svetlana Vujović^{1,3}, Svetozar Damjanović^{1,3}

¹Faculty of Medicine, University of Belgrade, Belgrade, Serbia;

²University Children's Hospital, Belgrade, Serbia;

³Clinic of Endocrinology, Diabetes and Metabolic Diseases, Clinical Center of Serbia, Belgrade, Serbia;

⁴Center for Endocrine Surgery, Clinical Center of Serbia, Belgrade, Serbia

SUMMARY

Introduction The multiple endocrine neoplasia type 2A (MEN 2A) syndrome, comprising medullary thyroid carcinoma (MTC), pheochromocytoma and primary hyperparathyroidism (PHPT) is most frequently caused by codon 634 activating mutations of the RET (rearranged during transfection) proto-oncogene on chromosome 10. For this codon-mutation carriers, earlier thyroidectomy (before the age of 5 years) would be advantageous in limiting the potential for the development of MTC as well as parathyroid adenomas.

Case Outline This is a case report of 3-year-old boy from the MEN 2A family (the boy's father and grandmother and paternal aunt) in which cysteine substitutes for phenylalanine at codon 634 in exon 11 of the RET proto-oncogene, who underwent thyroidectomy solely on the basis of genetic information. A boy had no thyromegaly, thyroidal irregularities or lymphadenopathy and no abnormality on the neck ultrasound examination. The pathology finding of thyroid gland was negative for MTC. Two years after total thyroidectomy, 5-year-old boy is healthy with permanent thyroxine replacement. His serum calcitonin level is <2 pg/ml (normal <13 pg/ml), has normal serum calcium and parathyroid hormone levels and negative urinary catecholamines. Long-term follow-up of this patient is required to determine whether very early thyroidectomy improves the long-term outcome of PHPT.

Conclusion Children with familial antecedents of MEN 2A should be genetically studied for the purpose of determining the risk of MTC and assessing the possibilities of making prophylactic thyroidectomy before the age of 5 years.

Keywords: MEN 2A; prophylactic thyroidectomy; medullary thyroid carcinoma; genetic screening; child

INTRODUCTION

The multiple endocrine neoplasia type 2A syndrome (MEN 2A), comprising medullary thyroid carcinoma (MTC), pheochromocytoma (PHE) and primary hyperparathyroidism (PHPT), is inherited in autosomal dominant fashion on chromosome 10 [1, 2]. The specific genetic abnormality was initially localized to a site close to the centromere of chromosome 10 [1, 2]. More recently, it has been identified as a mutation (most commonly exons 10 and 11) in the rearranged during transfection (RET) proto-oncogene [3]. In MEN 2A, the most frequent germ line mutations involve the extracellular domain of RET at codons 634, 620 and 618 [3]. As the invariable component of MEN 2, MTC is present in all affected individuals whereas adrenal PHEs and PHPT occur in only 50% and 10% to 30%, respectively [4].

Previously, the presence of MTC within a family member could only be confirmed by detection of clinical disease (goiter or cervical lymphadenopathy) or by the elevated levels of plasma calcitonin measured basally or following stimulation with a calcitonin secretagogue

such as pentagastrin or calcium. Identification of the specific genetic defect in MEN 2A now permits diagnosis of the syndrome, following routine blood sampling, in patients who may have no clinical or biochemical stigmata of disease. We record the management of a 3-year-old boy from a MEN 2A family (codon 634), who underwent thyroidectomy solely on the basis of genetic information. Prophylactic thyroidectomy before the age of 5 has been recommended by the American Thyroid Association (ATA) [5].

CASE REPORT

Screening of 3-year-old boy of the MEN 2A family member revealed the presence of 634 Cys-Phe mutation within the RET gene. His elder 6-year-old sister was found not to be affected. The family history of affected paternal relatives included a father with MTC and PHE, grandmother with MTC and paternal aunt with MTC and PHE. A boy had no thyromegaly, thyroidal irregularities or lymphadenopathy and no abnormality on

Correspondence to:

Maja D. JEŠIĆ
Department of Endocrinology
University Children's Hospital
Dr Subotića 8, 11000 Belgrade
Serbia
maja.jesic@udk.bg.ac.rs

the neck ultrasound examination. His initial basal serum calcitonin was mildly elevated -19.5 pg/ml (normal <13 pg/ml). Total calcium (TCa) and parathyroid hormone (PTH) values were normal (TCa 2.2 mmol/l, normal 2.02-2.6 mmol/l; PTH 25 ng/l, normal 15-65 ng/l). Pentagastrin stimulation testing, which often results in significant retrosternal and abdominal discomfort, had not been carried out in this child. Urinary catecholamines levels were normal. Following appropriate discussion with parents, and solely on the basis of genetic information and recommendation of ATA consensus group, total thyroidectomy was carried out. The surgical pathology was insignificant for 2.17-g thyroid gland with normal histopathologic findings. The patient developed postoperative hypocalcemia for which both oral calcium and vitamin D supplementation was given. After one month of therapy, with tapering of the oral calcium and vitamin D doses, the treatment was discontinued. Two years after total thyroidectomy, this 5-year-old boy is healthy with permanent thyroxine replacement. His calcitonin level is <2 pg/ml, has normal calcium and PTH hormone levels and negative urinary catecholamines.

DISCUSSION

In MEN 2 mutation carriers, the timing of thyroidectomy depends on the type of RET mutation and the earliest observed occurrence of MTC in patients with the mutation. RET mutations have been shown to be closely associated with specific phenotypes, age of disease onset, and aggressiveness of the disease [4]. It is recommended that routine RET mutation analysis should be performed in all apparently sporadic cases of MTC where the prevalence of familial disease is reported to be between 6% and 25% [5].

The American Thyroid Association has recently updated the classification system to incorporate all known mutations in MEN 2A and recognize more aggressive natural history of codon 634 mutations [5]. A Task Force Committee also introduced an updated set of recommendations for the timing of prophylactic thyroidectomy based on the specific mutation as well as on certain clinical risk factors including patient's age, family history, radiographic findings and serum calcitonin level: risk level A (codons 768, 790, 791, 804 and 891), risk level B (codons 609, 611, 618, 620 and 630) and the highest risk level C (codon 634). The recommendations considered not to allow delay in thyroidectomy for the risk level C. Patients with 634 codon mutations have earlier progression from

C-cell hyperplasia to MTC and higher rates of metastatic disease when compared with patients with other mutated codons from the extracellular domain of chromosome 10 [6]. For this codon-mutation carriers, earlier thyroidectomy (before 5 years of age) would be advantageous in limiting the potential for development of metastatic MTC as well as parathyroid adenomas [7, 8]. At risk levels A and B, C cell disease may appear later in life and thyroidectomy may be performed later in life, depending on calcitonin levels, neck ultrasound findings, family history and family preference.

However, some barriers to earlier thyroidectomy are the morbidity associated with pediatric anesthesia, especially in young infants, as well as surgical risks of recurrent laryngeal nerve palsy and hypocalcemia. The risk of these complications, when thyroidectomy is performed under the care of pediatric-trained anesthetists and surgeons, does not outweigh the benefits of prophylactic thyroidectomy in the affected carriers of 634 codon mutation [6, 7, 8].

In children from MEN 2A kindred, MTC has been found to occur as early as 1 year of age, although nodal invasion rarely develops before adolescence. Once malignant transformation is present, the rate of progression to nodal metastases is estimated to be 6.6 years later [9]. Indeed, lymph node metastases are uncommon in patients with thyroid tumor foci less than 5 mm in diameter and basal calcitonin levels below 40 pg/ml [3]. PHEs and PHPT occur later in childhood; PHE has been identified in a child as early as 12 years old and PHPT in a 10-year-old child [3, 9].

In the present paper, a 3-year-old boy of the MEN 2A family in which cysteine (TGC) substitutes for phenylalanine (TTC) at codon 634 in exon 11 of the RET proto-oncogene, has undergone prophylactic thyroidectomy. The boy manifested no abnormalities on physical examination. He had mildly elevated preoperative calcitonin, aggressive family history and 634 codon mutations (risk level C). The pathology finding was negative for MTC despite elevated preoperative calcitonin. It should be stressed that elevated calcitonin or more histological data for a thyroid specimen may indicate C cell hyperplasia. Furthermore, if the suggestion by Iler et al was correct, prevention of MTC might be also preventive of PHPT [9], although surveillance of this boy would include measurement of PTH hormone levels. Prophylactic thyroidectomy in our patient was exclusively on the basis of the genetic information, supporting the belief that thyroidectomy could be appropriate at an even younger age under circumstances. Long-term follow-up of this patient is required to determine whether very early thyroidectomy improves the long-term outcome of PHPT.

REFERENCES

1. Raue F, Frank-Raue K. Multiple endocrine neoplasia type 2: 2007 update. *Horm Res.* 2007; 68(Suppl 5):101-4.
2. Zenaty D, Aigrain Y, Peuchmaur M, Philippe-Chomette P, Baumann C, Cornelis F, et al. Medullary thyroid carcinoma identified within the first year of life in children with hereditary multiple endocrine neoplasia type 2A (codon 634) and 2B. *Eur J Endocrinol.* 2009; 160:807-13.
3. Skinner MA, Moley JA, Dilley WG, Owzar K, DeBenedetti MK, Wells SA. Prophylactic Thyroidectomy in Multiple Endocrine Neoplasia Type 2A. *N Engl J Med.* 2005; 353:1105-13.
4. Aqarwal S, Aqarwal A, Chand G, Gupta SK, Jain M, Ramakant P. MEN 2A family – prophylactic thyroidectomy for asymptomatic siblings with positive 634 codon mutation. *J Assoc Physicians India.* 2012; 60:127-9.

5. Grubbs EG, Waguespack SG, Rich TA, Xing Y, Ying AK, Evans DB, et al. Do the recent American Thyroid Association (ATA) Guidelines accurately guide the timing of prophylactic thyroidectomy in MEN 2A? *Surgery*. 2010; 148:1302-10.
6. Jackson MB, Guttenberg M, Hedrick H, Moshang T. Multiple endocrine neoplasia type 2A in a kindred with C634Y mutation. *Pediatrics*. 2005; 116:e468-71.
7. Yonekawa H, Sugitani I, Fujimoto Y, Arai M, Yamamoto N. A Family of multiple endocrine neoplasia type 2A (MEN 2A) with Cys630Tyr RET germline mutation: report of a case. *Endocr J*. 2007; 54:531-5.
8. Machens A, Niccoli-Sire P, Hoegel J, Frank-Raue K, van Vroonhoven TJ, Roeher HD, et al. Early malignant progression of hereditary medullary thyroid cancer. *N Engl J Med*. 2003; 349:1517-25.
9. Iler MA, King DR, Ginn-Pease ME, O'Dorisio TM, Sotos JF. Multiple endocrine neoplasia type 2A: a 25-year review. *J Pediatr Surg*. 1999; 34:92-6.

Профилактичка тиреоидектомија код асимптоматског трогодишњег дечака с позитивном мутацијом за мултиплу ендокрину неоплазију 2А (кодон 634)

Маја Д. Јешић^{1,2}, Милина Танчић-Гајић³, Милош М. Јешић^{1,2}, Владан Живаљевић^{1,4}, Силвија Сајић^{1,2}, Светлана Вујовић^{1,3}, Светозар Дамјановић^{1,3}

¹Медицински факултет, Универзитет у Београду, Београд, Србија;

²Универзитетска дечја клиника, Београд, Србија;

³Клиника за ендокринологију, дијабетес и болести метаболизма, Клинички центар Србије, Београд, Србија;

⁴Центар за ендокрину хирургију, Клинички центар Србије, Београд, Србија

КРАТАК САДРЖАЈ

Увод Синдром мултипле ендокрине неоплазије тип 2А (МЕН 2А), који обухвата медуларни тиреоидни карцином (МТК), феохромоцитом и примарни хиперпаратиреоидизам (ПХП), најчешће је узрокован активном мутацијом на кодону 634 *RET* (реаранжиран током трансфекције) протоонкогену хромозома 10. Код носилаца ове мутације профилактичка тиреоидектомија у ранијем узрасту (млађем од пет година) смањује потенцијал за развој МТК, као и паратиреоидног аденома.

Приказ болесника Приказали смо трогодишњег дечака из породице са МЕН 2А (дечаков отац и баба и очева тетка) код којег је цистеин замењен фенилаланином на кодону 634, егзон 11, на *RET* протоонкогену, код којег је урађена профилактичка тиреоидектомија искључиво на основу генетских података. Дечак није имао тиреомегалију, био је нормалног тиреоидног статуса без лимфаденопатије и нормалног

ултразвучног налаза врата. Хистопатолошки налаз је био негативан за МТК. Две године након тоталне тиреоидектомије петогодишњи дечак је здрав и свакодневно прима супституциону терапију тироксином. Његов ниво калцитонина је мањи од 2 pg/ml (нормална вредност <13 pg/ml), ниво калцијума и паратиреоидног хормона је нормалан, а катехоламини у мокраћи негативни. Дугорочним клиничким праћењем овог болесника ће се утврдити да ли је рана профилактичка тиреоидектомија побољшала дугорочно исход за ПХП.

Закључак Код деце са породичним МЕН 2А треба урадити генетску дијагностику ради утврђивања ризика за развој МТК и ради процене могућности примене профилактичке тиреоидектомије пре пете године живота.

Кључне речи: МЕН 2А; профилактичка тиреоидектомија; медуларни карцином штитасте жлезде; генетски скрининг; деца

Примљен • Received: 05/11/2012

Прихваћен • Accepted: 21/01/2013

X-Linked Hypophosphatemic Rickets: Case Report

Vladimir Radlović¹, Željko Smoljanić¹, Nedeljko Radlović^{1,2}, Zoran Leković¹, Dragana Ristić¹, Siniša Dučić¹, Polina Pavićević¹

¹University Children's Hospital, Belgrade, Serbia;

²Faculty of Medicine, University of Belgrade, Belgrade, Serbia

SUMMARY

Introduction X-linked hypophosphatemic rickets (XLHR) is a dominant inherited disease caused by isolated renal phosphate wasting and impairment of vitamin D activation. We present a girl with X-linked hypophosphatemic rickets (XLHR) as a consequence of *de novo* mutation in the PHEX gene.

Case Outline A 2.2-year-old girl presented with prominent lower limb rachitic deformity, waddling gait and disproportionate short stature (79 cm, <P5; -1.85 SD). On the basis of hypophosphatemia, hyperphosphaturia, high serum level of alkaline phosphatase, normal calcemia, 25(OH)D and PTH, as well as characteristic clinical and X-ray findings, diagnosis of hypophosphatemic rickets (HR) was made. Normal calciuria and absence of other renal tubular disorders indicated HR as a consequence of isolated hyperphosphaturia. The treatment (phosphate 55 mg/kg and calcitriol 35 ng/kg per day), introduced 15 month ago, resulted in a stable normalization of alkaline phosphatase and phosphorus serum levels (with intact calcemia and calciuria), disappearance of X-ray signs of the active rickets and improvement of the child's longitudinal growth (0.6 cm per month). Subsequently, by detection of already known mutation in the PHEX gene: c.1735G>A (p.G579R) (exon 17), XLHR was diagnosed. Analysis of the parental PHEX gene did not show the abnormality, which indicated that the child's XLHR was caused by *de novo* mutation of this gene.

Conclusion Identification of genetic defects is exceptionally significant for diagnosis and differential diagnosis of hereditary HR.

Keywords: X-linked hypophosphatemic rickets; diagnostics; therapy

INTRODUCTION

Rickets, i.e. osteomalacia during the period of growth and development represents a highly heterogeneous clinical entity, both from the aspect of etiopathogenesis and clinical expression, therapy and prognosis [1, 2]. It results from the negative calcium and/or phosphorus balance, most often due to vitamin D deficiency, and exceptionally rare due to its activation disorder, deficiency of receptor 1,25(OH)₂, and calcium and phosphorus deficit caused by their insufficient intake or pathological loss through the urine [1-4]. Accordingly, it is classified into two basic forms: calcium deficit and phosphorus deficit [2, 5]. Although from the pathogenic viewpoint such systematization of rickets seems clear enough, it should be pointed out that, due to close association of calcium and phosphorus metabolism, it is not absolutely divisible [2, 3]. The result of this occurrence, i.e. the secondary deficit of phosphorus in the lack of calcium or vice versa, is the participation, not only of parathyroid hormone (PTH) and 1,25(OH)₂, but also of other mediators responsible for their homeostasis [3, 6, 7]. This primarily refers to phosphatonins, fibroblast growth factor 23 (FGF-23) and other, which, in synchronous activity with aforementioned factors, provide the entire body homeostasis of phosphorus and calcium [8-11]. Hence, different pathological conditions, either at the level of regulatory or effector systems, cause the deficit of these two

macroelements with osteomalacia as predominant manifestation [9, 10, 11]. The spectrum of such diseases, both hereditary and acquired, is highly extensive. One of them is X-linked hypophosphatemic rickets (XLHR) which we present on the example of our patient whose diagnosis has been also confirmed genetically.

CASE REPORT

A 2.2-year-old girl presented with typical rachitic deformities, predominantly manifested in the bones of the lower extremity (coxa vara and genu varum), waddling gait and disproportionately short stature (body height 79 cm, <P5; -1.85 SD) (Figure 1). She was born from normal term pregnancy as a first of two children from healthy parents with body weight of 3100 g, body length of 51 cm and head circumference of 34 cm. Through the first year, along with breastfeeding during the first six months followed by standard cow's milk dietary, the patient was on regular intake of 667 IU of vitamin D. She sprouted her first teeth at 7 months, and started to walk at 12 months when first aforementioned skeletal deformities were manifested. As her mother's father had somewhat lower stature and genu varum, the child's problem was attributed to harmless inherited disorder, so that during the following 14 months she was under orthopedic follow-up. On the basis of characteristic history

Correspondence to:

Vladimir RADLOVIĆ
University Children's Hospital
Tiršova 10, 11000 Belgrade
Serbia
vladar@beotel.net



Figure 1. Our patient with XLHR



Figure 2. X-ray of the lower extremities in our patient with XLHR at diagnosis (a) and after 11 months of treatment (b)

data and clinical and X-ray picture, as well as the findings of hypophosphatemia (0.84 and 0.9 mmol/L), increased phosphorus creatinine ratio (mg/mg) in 24-hour urine (5.63), hyperphosphatasemia (547 U/L, normal <383 U/L) and adequate serum level of calcium (2.47 and 2.62 mmol/L), 25 (OH)D (40,6 ng/ml) and PTH (40 pg/ml), the diagnosis of hypophosphatemic rickets (HR) was made. Normal calcium/creatinine ratio (mg/mg) in 24-hour collection of urine (0.25) and absence of other disorders of tubular function indicated HR with an isolated hyperphosphaturia. After the confirmed diagnosis a therapy was initiated (phosphate 55 mg/kg/day in six divided doses and calcitriol 35 ng/kg/day in two doses); it resulted in stable normalization of alkaline phosphatase and phosphorus serum levels, with the intact calcemia and calciuria, disappearance of X-ray signs of the active rickets (Figure 2) and satisfactory longitudinal growth velocity of the child (0.6 cm per month). Up-to-now, there have been no evident signs of deformity correction of the lower extremities. Over the last 15 months of follow-up, neither signs of nephrocalcinosis nor any other adverse effects of treatment were recorded. At the latest control, after 11 months of treatment, calcium/creatinine (mg/dl) ratio was 0.35, so that, beside the advice for better diuresis, daily dosage of Calcitriol was decreased to 23.5 ng/kg.

Subsequently, XLHR was identified by detection of already known mutation in the PHEX gene: c.1735G>A (p.G579R) (exon 17). Maternal and paternal analysis of PHEX did not show any abnormality which indicated that the child's XLHR developed as the result of *de novo* mutation of this gene. Mother gave birth to another child, now 18-month old girl, who is healthy.

DISCUSSION

XLHR is a dominant inherited disease caused by isolated renal phosphate wasting and impairment of vitamin D activation [1, 15, 16, 17]. It is the most common form of heritable rickets, with incidence of 1:20,000 live births [1, 12]. The basis of XLHR is the inactivating mutations in the PHEX gene (phosphate regulating gene with homologies to endopeptidases on the X chromosome) which is located in Xp22.1-22.2 [13-18].

The PHEX gene is expressed in bone, teeth and parathyroid glands and, by yet unexplained mechanisms, negatively regulates FGF-23 expression [6, 10, 13]. The FGF-23, the product of gene located on the chromosome 12p13, is a bone protein hormone with phosphaturic effect directed to maintain circulating phosphate levels within a normal range [10-13, 18-20]. It is excreted by osteocytes and osteoblasts as the physiological response to hyperphosphatemia [6-11, 21]. The same effect on the expression of the FGF-23 has elevated 1,25(OH)₂D level in the blood and probably PTH [6, 10]. The FGF-23, in synergistic activity with PTH, increases renal inorganic phosphate excretion by inhibiting the expression of renal sodium-phosphate cotransporters NaPi-IIa and NaPi-IIc in the proximal tubules [6, 13]. The FGF-23 also suppresses 25(OH)D 1- α hydroxylase (P450c1 α) and conversely enhances the expression of CYP24A1 (24-hydroxylase) activity in the mitochondria of the proximal renal tubule leading to reduced circulating levels of 1,25(OH)₂D₃ and consequently to decreased intestinal resorption and tubular reabsorption of phosphorus [6, 13, 22-25]. Additionally, the deficit of 1,25(OH)₂D also decreases the intestinal absorption of calcium, as well as its proximal tubular reabsorption [8, 22, 23].

Aforementioned facts indicate that the FGF-23 is, as a part of hormonal bone-parathyroid-kidney axis, the essential participant in the regulation of the homeostasis of phosphorus, and partially of calcium, thus also of the bone system, as well as that its dysregulation, either in the sense of excess or deficit can basically disturb this homeostasis [6, 7]. There are numerous diseases, hereditary and acquired, which occur as the result of increased or decreased activity of the FGF-23 [11, 25-29]. One of them, caused by inactivating mutations in the PHEX gene and the consequent excess of FGF-23 followed by isolated renal phosphate wasting and rickets, is XLHR [1, 16, 25]. Beside XLHR, in the group of hereditary HR with isolated renal phosphate wasting, there are three autosomal forms with a much lesser incidence and similar clinical presentation [1, 2]. These include autosomal dominant HR, caused by

mutations in the FGF-23 gene and autosomal recessive HR caused by mutations in dentin matrix protein 1 gene and mutations in ectonucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase-1 gene [26, 27]. In addition, in rare cases HR may be caused by tumor hypersecretion of FGF-23 [28, 29].

Our patient is a classic example of XLHR, both from the clinical and genetic aspect. The disease occurred as the consequence of de novo already known mutation in the PHEX gene c.1735G>A (p.G579R) (exon 17). This refers to one of over 250 so far described mutations [13]. The initial diagnosis was clinical, because our institution lacked the facilities for its genetic verification. Treatment result is outstanding and there have been no adverse effects until now. During the last 15 months the patient has grown 9 cm (0.6 cm per month), which is satisfactory for her age and gender. X-ray signs of the active rickets have disappeared; nevertheless, until these days, there has been no evident improvement of deformities of the lower extremities.

REFERENCES

- Greenbaum LA. Rickets and hypervitaminosis D. In: Kliegman RM, Stanton BF, Schol NF, St Geme III JW, Behrman RE, editors. *Nelson Textbook of Pediatrics*. 19th ed. Philadelphia: Elsevier; 2011. p.200-9.
- Sahay M, Sahay R. Rickets-vitamin D deficiency and dependency. *Indian J Endocrinol Metab*. 2012; 16(2):164-76.
- Ozkan B. Nutritional rickets. *J Clin Res Pediatr Endocrinol*. 2010; 2(4):137-43.
- Unuvar T, Buyukgebiz A. Nutritional rickets and vitamin D deficiency in infants, children and adolescents. *Pediatr Endocrinol Rev*. 2010; 7(3):283-91.
- Rauch F. The rachitic bone. *Endocr Dev*. 2003; 6:69-79.
- Bergwitz C, Jüppner H. Regulation of phosphate homeostasis by PTH, vitamin D, and FGF23. *Annu Rev Med*. 2010; 61:91-104.
- Bergwitz C, Jüppner H. Phosphate sensing. *Adv Chronic Kidney Dis*. 2011; 18(2):132-44.
- Antoniucci DM, Yamashita T, Portale AA. Dietary phosphorus regulates serum fibroblast growth factor-23 concentrations in healthy men. *Clin Endocrinol Metab*. 2006; 91(8):3144-9.
- Berndt T, Kumar R. Phosphatonins and the regulation of phosphate homeostasis. *Annu Rev Physiol*. 2007; 69:341-59.
- Ramon I, Kleynen P, Body JJ, Karmali R. Fibroblast growth factor 23 and its role in phosphate homeostasis. *Eur J Endocrinol*. 2010; 162(1):1-10.
- Farrow EG, White KE. Recent advances in renal phosphate handling. *Nat Rev Nephrol*. 2010; 6(4):207-17.
- de Menezes Filho H, de Castro LC, Damiani D. Hypophosphatemic rickets and osteomalacia. *Arq Bras Endocrinol Metabol*. 2006; 50(4):802-13.
- Morey M, Castro-Feijóo L, Barreiro J, Cabanas P, Pombo M, Gil M, et al. Genetic diagnosis of X-linked dominant Hypophosphatemic Rickets in a cohort study: tubular reabsorption of phosphate and 1,25(OH)₂D serum levels are associated with PHEX mutation type. *BMC Med Genet*. 2011; 12:116.
- Kinoshita Y, Saito T, Shimizu Y, Hori M, Taguchi M, Igarashi T, et al. Mutational analysis of patients with FGF23-related hypophosphatemic rickets. *Eur J Endocrinol*. 2012; 167(2):165-72.
- Baroncelli GI, Bertelloni S, Sodini F, Galli L, Vanacore T, Fiore L, et al. Genetic advances, biochemical and clinical features and critical approach to treatment of patients with X-linked hypophosphatemic rickets. *Pediatr Endocrinol Rev*. 2004; 1(4):361-79.
- Jagtap VS, Sarathi V, Lila AR, Bandgar T, Menon P, Shah NS. Hypophosphatemic rickets. *Indian J Endocrinol Metab*. 2012; 16(2):177-82.
- The HYP Consortium: A gene (PEX) with homologies to endopeptidases is mutated in patients with X-linked hypophosphatemic rickets. *Nat Genet*. 1995; 11(2):130-6.
- Francis F, Hennig S, Korn B, Reinhardt R, de Jong P, Poustka A, et al. A gene (PEX) with homologies to endopeptidases is mutated in patients with X-linked hypophosphatemic rickets. The HYP Consortium. *Nat Genet*. 1995; 11(2):130-6.
- Liu S, Tang W, Zhou J, Stubbs JR, Luo Q, Pi M, et al. Fibroblast growth factor 23 is a counter-regulatory phosphaturic hormone for vitamin D. *J Am Soc Nephrol*. 2006; 17(5):1305-15.
- Andruxhova O, Zeitz U, Goetz R, Mohammadi M, Lanske B, Erben RG. FGF23 acts directly on renal proximal tubules to induce phosphaturia through activation of the ERK1/2-SGK1 signaling pathway. *Bone*. 2012; 51(3):621-8.
- Shaikh A, Berndt T, Kumar R. Regulation of phosphate homeostasis by the phosphatonins and other novel mediators. *Pediatr Nephrol*. 2008; 23:1203-10.
- Holick MF. Vitamin D deficiency. *N Engl J Med*. 2007; 357(3):266-81.
- Radlović N, Mladenović M, Simić D, Radlović P. Vitamin D in the light of current knowledge. *Srp Arh Celok Lek*. 2012; 140(1-2):110-4.
- Miyamoto K, Ito M, Tatsumi S, Kuwahata M, Segawa H. New aspect of renal phosphate reabsorption: the type IIc sodium-dependent phosphate transporter. *Am J Nephrol*. 2007; 27(5):503-15.
- Fukumoto S. Physiological regulation and disorders of phosphate metabolism—pivotal role of fibroblast growth factor 23. *Intern Med*. 2008; 47(5):337-43.
- ADHR Consortium: Autosomal dominant hypophosphatemic rickets is associated with mutations in FGF23. *Nat Genet*. 2000; 26(3):345-8.
- Levy-Litan V, HersHKovitz E, Avizov L, Leventhal N, Bercovich D, Chalifa-Caspi V, et al. Autosomal-recessive hypophosphatemic rickets is associated with an inactivation mutation in the ENPP1 gene. *Am J Hum Genet*. 2010; 86(2):273-8.
- Dhanwal DK. Oncogenic osteomalacia: a reversible metabolic bone disorder. *Indian J Orthop*. 2010; 44(4):361-2.
- Chong WH, Molinolo AA, Chen CC, Collins MT. Tumor-induced osteomalacia. *Endocr Relat Cancer*. 2011; 18(3):R53-77.

ACKNOWLEDGMENT

The authors wish to acknowledge and express their special gratitude to Professor Giuseppe Saggese, MD, PhD and his co-workers of the University of Pisa on the genetic verification of the disease of the presented girl as well as of other patients.

X-везани хипофосфатемијски рахитис – приказ болесника

Владимир Радловић¹, Жељко Смољанић¹, Недељко Радловић^{1,2}, Зоран Лековић¹, Драгана Ристић¹, Сениша Дучић¹, Полина Павићевић¹

¹Универзитетска дечја клиника, Београд, Србија;

²Медицински факултет, Универзитет у Београду, Београд, Србија

КРАТАК САДРЖАЈ

Увод X-везани хипофосфатемијски рахитис је доминантна наследна болест узрокована изолованим реналним губитком фосфора и смањеном активацијом витамина Д. Приказујемо девојчицу с овим обољењем као последицом мутације гена *PHEX de novo*.

Приказ болесника Девојчица узраста од 2,2 године доведена је код лекара због рахитисних деформитета предоминантно испољених на доњим екстремитетима, гегавог ходања и непропорционално ниског раста (79 cm, <P5; -1,85 SD). На основу хипофосфатемије, хиперфосфатурије, високог нивоа алкалне фосфатазе у серуму, нормалне калцемије, вредности 25(OH)D и PTH, као и типичног клиничког и рендгенског налаза, постављена је дијагноза хипофосфатемијског рахитиса (ХР). Нормална калциурија и изостанак других поремећаја тубула бубрега указивали су на ХР као последицу изоловане хиперфосфатурије. Одговарајућа

петнаестомесечна терапија (фосфор у дози од 55 mg/kg и калцитриол у дози од 35 ng/kg дневно) довела је до стабилне нормализације нивоа алкалне фосфатазе и фосфора у серуму (уз непромењену калцемију и калциурију), ишчезавања рендгенских знакова активног рахитиса и побољшања лонгитудиналног раста детета (0,6 cm месечно). Накнадно је, откривањем познате мутације у гену *PHEX*, c.1735G>A (p.G579R) (exon 17), установљен X-везани ХР. Анализа *PHEX* гена родитеља није показала абнормалност, што указује на то да је обољење код детета узроковано мутацијом овог гена *de novo*.

Закључак Утврђивање генског оштећења је веома значајно у дијагностиковању и диференцијалној дијагностици наследног ХР.

Кључне речи: X-везани хипофосфатемијски рахитис; дијагностика; лечење

Примљен • Received: 18/12/2012

Прихваћен • Accepted: 01/02/2013

A Case of Human Monocytic Ehrlichiosis in Serbia

Bogdan Arsić¹, Ana Gligić², Elizabeta Ristanović³, Branislav Lako⁴, Aleksandar Potkonjak⁴, Milan Peruničić⁵, Momčilo Pavlović⁶

¹Department of Infectious Diseases, General Hospital, Subotica, Serbia;

²Institute of Immunology and Virology "Torlak", Belgrade, Serbia;

³Institute of Microbiology, Military Medical Academy, Belgrade, Serbia;

⁴Department of Veterinary Medicine, Faculty of Agriculture, Novi Sad, Serbia;

⁵Institute of Infectious and Tropical Diseases, Clinical Center of Serbia, Belgrade, Serbia;

⁶Pediatric Department, General Hospital, Subotica, Serbia

SUMMARY

Introduction Ehrlichiosis is a bacterial zoonosis transmitted by hematophagous arthropods – ticks. In humans, it occurs as monocytic, granulocytic, and *ewingii ehrlichiosis*. Pathological process is based on parasitic presence of Ehrlichia organisms within peripheral blood cells – monocytes and granulocytes.

Case Outline Fifty-two year old patient was admitted to hospital due to high fever of over 40°C that lasted two days, accompanied with chills, muscle aches, malaise, loss of appetite, headache, confusion, breathing difficulties, and mild dry cough. The history suggested tick bite that occurred seven days before the onset of disease. Doxycycline was introduced and administered for 14 days, causing the disease to subside. Indirect immunofluorescence assay was used to analyze three serum samples obtained from this patient for *Ehrlichia chaffeensis* antibodies, and peripheral blood smear was evaluated for the presence of Ehrlichia and Ehrlichia aggregation into morulae.

Conclusion Ehrlichiosis should be considered in each case where there is a history of tick bite together with the clinical picture (high fever, chills, muscle aches, headache, generalized weakness and malaise, and possible maculopapular rash). The presence of *Ehrlichia chaffeensis* antibodies was confirmed in a patient with the history of tick bite, appropriate clinical picture and indirect immunofluorescence assay. This confirmed the presence of human monocytotropic ehrlichiosis, a disease that is uncommonly identified in our country.

Keywords: *Ehrlichia chaffeensis*; human ehrlichiosis; fluorescent antibody technique; indirect; doxycycline

INTRODUCTION

Ehrlichiosis, as human infectious disease, was described in 1986, although Ehrlichia has been studied as a cause of disease in animals until 1968, when *Ehrlichia canis* was identified as the cause of disease of a large number of military dogs in Vietnam. The similarity between *E. canis* and *E. sennetsu* (previously known as *Rickettsia sennetsu*), causing fever in humans in Japan, was then observed. Recent findings have suggested that *Ehrlichiae*, together with *Rickettsiae*, form a subgroup of Proteobacteria [1]. Bacteria from the Ehrlichia genus were classified to the Anaplasmataceae family [2]. Based on their genetic characteristics, Ehrlichia organisms were divided into 3 genogroups. Genogroup I includes *E. chaffeensis* (cause of human monocytotropic ehrlichiosis – HME), *E. canis*, and *E. ewingii*. Genogroup II (Anaplasma group) includes *Anaplasma phagocytophilum* – human granulocytic ehrlichiosis – HGE, and *E. equi*. Genogroup III (called *Neorickettsiae*) includes *E. sennetsu* and *E. risticii* [1].

The first case of human ehrlichiosis, similar to *E. canis*, was described in the USA in late 1980s [3]. Patients with specific antibodies to *E. chaffeensis* were later described in other continents and countries: Israel [4], Thailand [5], and Argentina [6]. *E. chaffeensis* was isolated from the tick *Ixodes ricinus* in Germany [7]

and Bulgaria [8]. The human infections caused by *E. chaffeensis* were confirmed by numerous seroepidemiological studies in Italy [9], Czech Republic [10], Portugal [11], Slovenia [12], and Croatia [13], while there has been one case reported in Serbia [14]. Retrospective studies showed that Ehrlichiae, as causes of infectious diseases, had been present in human population even before 1980s [15].

The aim of this paper was to present clinical characteristics of the serologically confirmed case of ehrlichiosis in a patient who had previously been bitten by a tick.

CASE REPORT

Fifty-two year old patient was admitted to Department for Infectious Diseases of General Hospital in Subotica due to high fever of over 40°C that lasted for two days and was accompanied by chills, muscle aches, malaise, loss of appetite, headache, confusion, breathing difficulties, and mild dry cough. Seven days before the onset of disease, the patient noticed a tick in his scrotal region and removed it himself. Before admission to hospital, the patient took antipyretics only. On admission, he had high fever, was adynamic to prostration, and confused. The remaining physical findings appeared normal, as well as local findings at the site of tick bite.

Correspondence to:

Bogdan ARSIĆ
Department of Infectious
Diseases
General Hospital
Izvorska 3, 24000 Subotica
Serbia
momodec@tippnet.rs

Laboratory findings immediately upon admission were the following: WBC $2.9 \times 10^9/L$, platelets $72 \times 10^9/L$, RBC $4.44 \times 10^{12}/L$, hemoglobin 129 g/L, AST 82 U/L (normal level: up to 37), ALT 55 U/L (normal level: up to 42), CK 1890 U/L (normal level: up to 195), and CRP 29.2 mg/L. Urine examination showed normal results. Blood and urine cultures were negative to *Mycobacterium tuberculosis*. Serologic reactions to *Rickettsia prowazekii*, *Coxiella burnetii*, *Brucella abortus*, *Borrelia burgdorferi*, as well as TPHA were negative. Furthermore, serologic reactions to EBV, CMV and HSV were negative. RF and ANA were also negative. Lung X-ray, and the abdominal and urinary tract ultrasound suggested normal findings. Peripheral blood smear showed morulae in small number of monocytes (less than 10%) staining darker than the rest of the monocytes.

On the second day of hospital stay, doxycycline was introduced at a dose of 2×100 mg orally, and on the following day, the patient's fever subsided. Treatment lasted 14 days, after which the patient had no subjective complaints and the physical findings were normal.

Laboratory findings at discharge: WBC $7.5 \times 10^9/L$, platelets $220 \times 10^9/L$, RBC $4.1 \times 10^{12}/L$, hemoglobin 120 g/L, AST 32 U/L, ALT 34 U/L, CK 155 U/L, CRP 15.2 mg/L. During the following six months, the patient used to come for regular controls and he had no subjective complaints, while his physical and laboratory findings remained normal.

At the Department for Immunology of the Military Medical Academy, indirect immunofluorescence assay was used to analyze three serum samples from this patient for *E. chaffeensis* antibodies, and peripheral blood smear was evaluated for the presence of Ehrlichia and Ehrlichia aggregation into morulae. Serum samples were taken on days 7 (July 24, 2006), 14 (July 31) and 50 (September 5) of the illness, and the titers of IF antibodies were < 1:32, 1:64, and 1:128, respectively. The peripheral blood smear was dated July 19, 2006.

Indirect Immunofluorescence Assay (IFA)

The antigen for identification of *E. chaffeensis* antibodies (Lot no. 02-0266N) was obtained as a suspension of *E. chaffeensis* replicated in canine monocytes. The suspension was spread over 8-field microscopy slides, dried at room temperature for at least three hours, and fixed with cold acetone (Merck pro analysi) for 10 minutes at $-18^\circ C$. The slides were then dried 10 minutes at room temperature, and immediately used as an antigen, or stored for later use at $-20^\circ C$.

The immune control serum was human serum obtained from convalescents infected with *E. chaffeensis* with titers of 128 or higher. The control negative serum was human serum negative to *E. chaffeensis* antibodies at a dilution of 1:16.

The IFA reaction

After brief rehydration, patient's sera were applied to prepared antigen in series of PBS dilutions ranging from

1:16 to 1:256. After 30 minutes of humidity chamber incubation at $37^\circ C$ and PBS wash-out, in order to remove antibodies not bound to antigen, a mixture of fluorescein labeled goat antihuman IgG (INEP, Belgrade) was added, as well as Evans blue for better contrast when reading the reaction. After 30 minutes of humidity chamber incubation at $37^\circ C$, slides were washed out, dried, and after adding glycerin, the IFA reaction was studied using Leitz fluorescent microscope (at $400\times$ magnification). The last serum dilution showing observable immunofluorescence in monocyte cytoplasm with good positive and negative control was considered to be the titer of *E. chaffeensis* antibodies.

DISCUSSION

The disease of the humans known as humane monocytic or monocytotropic ehrlichiosis is caused by *Ehrlichia chaffeensis*. It dwells and replicates in the cytoplasm of certain host cell types, mainly neutrophil leukocytes, leukocytes and monocytes, within vacuoles that are bound to cellular membrane. The name of the disease HME suggests the tropism of the organism toward peripheral blood monocytes [13]. Until now, only one report on HME in Serbia has been published. Dokić et al. [16] presented the case of HME in a patient admitted to Military Medical Academy.

The HME is a complex zoonosis. The causing organism persists in the nature through the infection of various mammals. Dogs, wolves and deer are considered to be the primary reservoirs of *Ehrlichia chaffeensis*. Fox and goats have been experimentally infected as well. The primary vector is a tick *Amblyomma americanum*. *Ehrlichia chaffeensis* may also be transmitted by a tick *Dermacentor variabilis* [17]. Most ehrlichiosis cases have history of tick bites (as in our patient), although in 32% of cases this information may be missing [18]. Therefore, the absence of definite tick attachment should never dissuade physician from considering the diagnosis of HME.

There is no specific clinical sign that would help in distinguishing this condition. In both HME and HGE, the symptoms may vary in their intensity, ranging from mild disease to life-threatening conditions. The most common symptoms are elevated body temperature ($>90\%$), headache ($>85\%$), fever, muscle aches ($>80\%$), nausea (40%), vomiting (40%), loss of appetite (40%), overall weakness and malaise ($>80\%$), and confusion (20%). The diffuse skin changes are uncommon (10%), and if present, they are manifested as maculopapular rash without any predilection. The central nervous system infection is present in 20% of patients with HME and may manifest as aseptic meningitis with lymphocytic pleocytosis and elevated protein level in cerebrospinal fluid, cranial nerve neuropathy or encephalopathy [19, 20]. Because the signs and symptoms are nonspecific, the clinicians must frequently incorporate clues from the clinical and epidemiologic history and consider other features. Most of these symptoms and signs were present in our patient, and the history of tick bite made our diagnosis of HME easier.

The etiological diagnosis of human ehrlichiosis is based on serological diagnostics or identification of causative microorganism in the elements of peripheral blood. In the peripheral blood smear, morulae are found in granulocytes (25-80%) and in monocytes (less than 10%). Morulae are cytoplasmic vacuoles in which *Ehrlichia* replicates. The most commonly used staining method is Wright's stain. The serological reaction that is used for diagnosis is indirect immunofluorescence (IF) assay [21]. According to the Center of Disease Control (CDC), the first sample should be taken as early as possible, preferably in the first week of symptoms, and the second sample should be taken 2 to 4 weeks later [22]. The IF assay is considered positive if there is an increase or decrease in titer of antibodies 4 times or more during the disease, with minimum titer of 1:80. In our patient, the IF assay was in accordance with these data, and the expected higher levels of antibody titer were not obtained, most probably due to early antibiotic treatment (5th day of the disease).

Doxycycline is a treatment of choice for any type of human ehrlichiosis. It is very efficient; it stops disease progression and leads to recovery [23]. An optimal duration of therapy has not been established; current recommendations for HME treatment are at least 3 days after the fever

subsides and until the clinical improvement is evident, which typically accounts for a minimal total course of 5-7 days [22]. After treatment for 14 days with doxycycline, our patient had no subjective complaints, while his physical and laboratory findings were normal.

The human ehrlichiosis is a newly identified disease that is still being rarely diagnosed. Ehrlichiosis should be considered in each case where there is a history of tick bite together with clinical picture (high fever, chills, muscle aches, headache, generalized weakness and malaise, and possible maculopapular rash). The diagnosis is made with high certainty using serological assays, and the disease is effectively treated with doxycycline.

ACKNOWLEDGMENT

The *E. chaffeensis* antigen and the positive control serum were donated by Dr. Gregory Dasch from Center for Disease Control, Atlanta, USA. This research was a part of the Project: Research of Lyme Disease and Other Vector-borne Zoonoses in Vojvodina, number: 114-451-1892/2011, Provincial Secretariat for Science and Technological Development of AP of Vojvodina.

REFERENCES

- Paddock CD, Childs JE. *Ehrlichia chaffeensis*: a prototypical emerging pathogen. Clin Microbiol Rev. 2003; 16(1):37-64.
- Dumler JS. Anaplasma and Ehrlichia infection. Ann NY Acad Sci. 2005; 1063:361-73.
- Fishbein DB, Sawyer LA, Holland CJ, Hayes EB, Okoroanyanwu W, Williams D, et al. Unexplained febrile illnesses after exposure to ticks. Infection with an Ehrlichia? JAMA. 1987; 257(22):3100-4.
- Keysary A, Amram L, Keren G, Stohoege Z, Potasman I, Jacob A, et al. Serologic evidence of human monocytic and granulocytic ehrlichiosis in Israel. Emerg Infect Dis. 1999; 5(6):775-8.
- Heppner DG, Wongsrichanalai C, Walsh DS, McDaniel P, Eamsila C, Hanson B, et al. Human ehrlichiosis in Thailand. Lancet. 1997; 350(9080):785-6.
- Ripoll CM, Remondegui CE, Ordonez G, Arazamendi R, Fusaro H, Hyman MJ, et al. Evidence of rickettsial spotted fever and ehrlichia infections in a subtropical territory of Jujuy, Argentina. Am J Trop Med Hyg. 1999; 61(2):350-4.
- Baumgarten BU, Röllinghoff M, Bogdan C. Prevalence of *Borrelia burgdorferi* and granulocytic and monocytic ehrlichiae in ixodes ricinus ticks from southern Germany. J Clin Microbiol. 1999; 37(11):3448-51.
- Christova I, Van De Pol J, Yazar S, Velo E, Schouls L. Identification of *Borrelia burgdorferi* sensu lato, *Anaplasma* and *Ehrlichia* species, and spotted fever group Rickettsiae in ticks from Southeastern Europe. Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 2003; 22(9):535-42.
- Nuti M, Serafini DA, Bassetti D, Ghionni A, Russino F, Rombola P, et al. Ehrlichia infection in Italy. Emerg Infect Dis. 1998; 4(4):663-5.
- Hulinska D, Kurzova D, Drevova H, Votypka J. First detection of Ehrlichiosis detected serologically and with the polymerase chain reaction in patients with borreliosis in the Czech Republic. Cas Lek Cesk. 2001; 140(6):181-4.
- Morais JD, Dawson JE, Greene C, Filipe AR, Galhardas LC, Bacellar F. First European case of ehrlichiosis. Lancet. 1991; 338(8767):633-4.
- Arnez M, Luznik-Bufon T, Avsic-Zupanc T, Ruzic-Sabljic E, Petrovec M, Lotric-Furlan S, et al. Causes of febrile illnesses after a tick bite in Slovenian children. Pediatr Infect Dis J. 2003; 22(12):1078-83.
- Topolovec J, Puntarić D, Antolović-Pozgaj A, Vuković D, Topolovec Z, Milas J, et al. Serologically detected "new" tick-borne zoonoses in eastern Croatia. Croat Med J. 2003; 44(5):626-9.
- Samardžić S, Marinković T, Marinković D, Djuričić B, Ristanović E, Simović T, et al. Prevalence of antibodies to Rickettsiae in different regions of Serbia. Vector Borne Zoonotic Dis. 2008; 8(2):219-24.
- Dawson JE, Fishbein DB, Eng TR, Redus MA, Green NR. Diagnosis of human ehrlichiosis with the indirect fluorescent antibody test: kinetics and specificity. J Infect Dis. 1990; 162(1):91-5.
- Djokić M, Čurčić P, Nožić D, Lako B, Begović V, Rajić-Dimitrijević R, et al. Human ehrlichiosis. Vojnosanit Pregl. 2006; 63(4):403-8.
- Skotarczak B. Canine ehrlichiosis. Ann Agric Environ Med. 2003; 10(2):137-41.
- Fishbein DB, Dawson JE, Robinson LE. Human ehrlichiosis in the United States, 1985-1990. Ann Intern Med. 1994; 120(9):736-43.
- Lotrič-Furlan S, Avšič-Zupanc T, Petrovec M, Nicholson WL, Sumner JW, Childs JE, et al. Clinical and serological follow-up of patients with human granulocytic ehrlichiosis in Slovenia. Clin Diagn Lab Immunol. 2001; 8(5):899-903.
- Wallace BJ, Brady G, Ackman DM, Wong SJ, Jacquette G, Lloyd EE, et al. Human granulocytic ehrlichiosis in New York. Arch Intern Med. 1998; 158(7):769-73.
- Brouqui P, Salvo E, Dumler JS, Raoult D. Diagnosis of granulocytic ehrlichiosis in humans by immunofluorescence assay. Clin Diagn Lab Immunol. 2001; 8(1):199-202.
- Chapman AS, Bakken JS, Folk SM, Paddock CD, Bloch KC, Krusell A, et al. Diagnosis and management of tickborne rickettsial diseases: Rocky Mountain spotted fever, ehrlichioses, and anaplasmosis – United States: a practical guide for physicians and other health-care and public health professionals. MMWR Recomm Rep. 2006; 55(RR-4):1-27.
- Horowitz HW, Wormser GP. Doxycycline revisited: an old medicine for emerging diseases. Arch Intern Med. 1998; 158(2):192-3.

Случај хумане моноцитне ерлихиозе у Србији

Богдан Арсић¹, Ана Глигић², Елизабета Ристановић³, Бранислав Лако⁴, Александар Поткоњак⁴,
Милан Перуничић⁵, Момчило Павловић⁶

¹Одељење за инфективне болести, Општа болница, Суботица, Србија;

²Институт за имунологију и вирусологију „Торлак“, Београд, Србија;

³Институт за микробиологију, Војномедицинска академија, Београд, Србија;

⁴Департаман за ветеринарску медицину, Пољопривредни факултет, Универзитет у Новом Саду, Нови Сад, Србија;

⁵Институт за инфективне и тропске болести, Клинички центар Србије, Београд, Србија;

⁶Дечје одељење, Општа болница, Суботица, Србија

КРАТАК САДРЖАЈ

Увод Ерлихиоза је бактеријска зооноза која се преноси хематофагним артроподама – крпељима. Код људи се јавља као моноцитна, гранулоцитна и *ewingii* ерлихиоза. Патолошки процес је последица унутарћелијског паразитирања ерлихије у моноцитима и гранулоцитима периферне крви.

Приказ болесника Болесник стар 52 године примљен је на одељење због високе дводневне фебрилности (преко 40°C) која је праћена дрхтавицом, боловима у мишићима, малаксалошћу, губитком апетита, главобољом, конфузношћу, отежаним дисањем и оскудним сувим кашљем. У анамнези је добијен податак о уједу крпеља седам дана пре пријема. Лабораторијски налази су указали на тромбоцитопенију, леукопенију, анемију и повећање активности трансaminaза у серуму. Болесник је лечен доксициклином 14 дана, након чега су се тегобе повукле. Методом индиректне иму-

нофлуоресценције анализирана су три узорка серума овог болесника на присуство антитела на бактерију *Ehrlichia chaffeensis* и прегледан је узорак размаза периферне крви на присуство ерлихија и конгломерата ерлихије у моруле, које представљају цитоплазматске вакуоле.

Закључак Код болесника с податком о уједу крпеља, одговарајућом клиничком сликом и серолошким тестом индиректне имунофлуоресценције доказана су антитела за бактерију *Ehrlichia chaffeensis*, што указује на хуману моноцитотропну ерлихиозу, болест која се код нас ретко доказује. На ерлихиозу треба мислити када уз клиничку слику (висока фебрилност, грозница, болови у мишићима, главобоља, општа слабост и малаксалост, евентуално макулопапулозна оспа) постоји податак о уједу крпеља.

Кључне речи: *Ehrlichia chaffeensis*; хумана ерлихиоза; индиректна имунофлуоресценција; доксициклин

Примљен • Received: 04/09/2012

Ревизија • Revision: 25/12/2013

Прихваћен • Accepted: 02/01/2014

Post-Transplant Lymphoproliferative Disorder – Case Reports of Three Children with Kidney Transplant

Brankica Spasojević-Dimitrijeva¹, Amira Peco-Antić^{1,2}, Dušan Paripović¹, Divna Kruščić¹, Zoran Krstić^{2,3}, Maja Čupić³, Mirjana Cvetković¹, Gordana Miloševski-Lomić¹, Mirjana Kostić^{1,2}

¹Nephrology Department, University Children's Hospital, Belgrade, Serbia;

²Faculty of Medicine, University of Belgrade, Belgrade, Serbia

³Urology Department, University Children's Hospital, Belgrade, Serbia;

⁴Institute for Microbiology and Immunology, Faculty of Medicine, University of Belgrade, Belgrade, Serbia

SUMMARY

Introduction Post-transplant lymphoproliferative disorder (PTLD) is a heterogeneous group of diseases, characterized by abnormal lymphoid proliferation following transplantation. It is a disease of the immunosuppressed state, and its occurrence is mostly associated with the use of T-cell depleting agents, and also intensification of immunosuppressive regimens. In the majority of cases, PTLD is a consequence of Epstein-Barr virus (EBV) infection and is a B-cell hyperplasia with CD-20 positive lymphocytes. The 2008 World Health Organization classification for lymphoid malignancies divides PTLD into four major categories: early lesions, polymorphic PTLD, monomorphic PTLD and Hodgkin PTLD. The treatment and prognosis depend on histology. The cornerstone of PTLD therapy includes reduction/withdrawal of immunosuppression, monoclonal anti CD-20 antibody (rituximab) and chemotherapy.

Outline of Cases We reported here our experiences with three patients, two girls aged 7.5 and 15 and a 16-year old boy. They had different organ involvement: brain, combined spleen-liver and intestines, respectively. Even though EBV was a trigger of lymphoid proliferation as it was confirmed by histopathology or in cerebrospinal fluid, qualitative EBV-PCR was positive only in one patient at disease presentation. Reduction of immunosuppression therapy was applied in treatment of all three patients, while two of them received rituximab and ganciclovir. They had an excellent outcome besides many difficulties in diagnosis and management of disease.

Conclusion Qualitative EBV-PCR is not useful marker in pediatric transplant recipients. Our suggestion is that patients with the risk factors like T-cell depleting agents, immunosuppressant protocol or increasing immunosuppressive therapy and EBV miss-match with donor must be more accurately monitored with quantitative EBV PCR.

Keywords: post-transplant lymphoproliferative disorder; Epstein-Barr virus; PCR; pediatric renal transplantation

INTRODUCTION

Post-transplant lymphoproliferative disorder (PTLD) is the most-common neoplasm amongst pediatric transplant recipients, accounting for 52% of all malignancies in this group [1]. The incidence of PTLD varies depending on the type of organ transplanted and have been reported in 2.6-9% of all pediatric renal transplant recipients, with malignancy developed in 1.5% [2, 3]. The majority of PTLD is B-cell derived and frequently associated with the Epstein-Barr virus (EBV) infection [4], although some T-cell derived cases have been reported [5]. The risk varies by the intensity and duration of immunosuppressive therapy and is 30-70 times higher in the EBV-naïve recipient [6]. The spectrum of PTLD ranges from lymphoid hyperplasia and infective mononucleosis-like disease to highly malignant lymphoma. The 2008 World Health Organization classification for lymphoid malignancies [7] divides PTLD into four major categories: early lesions, polymorphic PTLD, monomorphic PTLD and Hodgkin PTLD. The usual treatment for this condition includes reduction or withdrawal of

immunosuppression therapy, antiviral treatment, anti-CD20 monoclonal antibody (rituximab) and in resistant cases chemotherapy [8]. This report has presented the outcome of various PTLD organ involvement in 3 children, after kidney transplantation, during period of 10 years (June 2001 – June 2010).

CASE REPORTS

Patients' characteristics, applied immunosuppression treatment, imaging and histopathology findings were shown in Table 1. Applied therapy and patient's outcome were shown in Table 2.

Patient 1

A girl with primary diagnosis of congenital nephrotic syndrome underwent a living related renal transplantation from her father when she was 3 years old. Since she had transplantation in another Center, her and donor's EBV sero status were unknown. Her initial immuno-

Correspondence to:

Brankica SPASOJEVIĆ-DIMITRIJEVA
University Children's Hospital
Tiršova 10, 11000 Belgrade
Serbia
brankicaspasojevic@yahoo.com

Table 1. Patient’s characteristics, pre-PTLD immunosuppression, presentation of PTLD, imaging and histopathology findings

Parameter	Patient		
	1	2	3
Age (years)	7.5	15	16
Gender	Female	Female	Male
Primary disease	Congenital nephrotic Sy	Sy Frasier	Polycystic kidney disease
PTLD onset post tx (months)	48	9	12
EBV mismatch (D-/R+)	NA	Yes	Yes
HCV infection	No	No	Yes
ATG induction	No	Yes	No
Immunosuppression	MMF, CSA	MMF, CSA	MMF, TAC, SRL
High CNI levels	No	No	Yes
Immunosuppression intensifications/ acute rejection episodes	Yes/No	No/No	Yes/Yes
Initial presentation	Right-sided hemiparesis	Liver and spleen ultrasound changes	Fever, weight loss, melena, ileus
PCR EBV (at onset/follow up)	-/+	+/+	-/+
Imaging	CNS multifocal lesions	Liver and spleen multifocal lesions	Liver multifocal changes, hilum spleen lymphadenopathy
Intraoperative findings and PH	/	PH: Diffuse non-Hodgkin lymphoma of large, CD20+ cells	Multiple small bowel perforation PH: diffuse non-Hodgkin lymphoma of large cells, CD20+, CD79a +, Ki67 + (70% of tumor cells nuclei)

PTLD – post-transplant lymphoproliferative disorder; EBV – Epstein-Barr virus; D – donor; R – recipient; NA – not available; HCV – hepatitis C virus; ATG – anti thymocyte globulin; MMF – mycophenolate mofetil; CSA – cyclosporine A; TAC – tacrolimus; SRL – sirolimus/rapamycin; CNI – calcineurin inhibitors; PCR – polymerase chain reaction; CNS – central nervous system; PH – histopathology findings

Table 2. Applied therapy and outcome

Parameter	Patient		
	1	2	3
Ganciclovir	Yes	Yes	No
IVIg	No	Yes	Yes
Immunosuppression withdrawal (except prednisone)	No, only reduction	Yes	Yes
Rituximab	No	Yes, V cycles	Yes, VI cycles
Therapy response	After 1 year almost complete remission	After 8 months complete remission	After 4 months complete regression with mild hilum spleen lymphadenopathy
Current therapy	Prednisone, AZA, SRL	Prednisone, SRL (after 1 year and 9 months)	Prednisone, SRL (after 1 year)
Outcome (year)	Remission (7)	Remission (6.5)	Remission (5)
Creatinine (μmol/l)	550	128	121
GFR (ml/min/1.73m2)	15	56	84

IVIg – intravenous immunoglobulin; AZA – azathioprine; SRL – sirolimus/rapamycin; GFR – glomerular filtration rate

suppression included prednisone, cyclosporine A (CSA) and azathioprine (AZA). NV did well almost 4 years after transplant, aside from reflux at her ureterocystoneostomy and subsequent repeated urinary tract infection with mild graft dysfunction. Three years after transplantation, AZA was replaced by MMF (mycophenolate mofetil). Four years after transplantation, she presented with sudden onset of right-sided hemiparesis. Endocranial MRI showed multiple lesions in white matter (left parietal-temporal lobe, cerebellar peduncles, pons, Figure 1). Cerebrospinal fluid (CSF) cytology revealed 2% of blasts in 36 leukocytes/mm³. Oligoclonal IgG bounds were also found in CSF with EBV IgG 1:1280 positivity. An EBV-PCR in CSF and serum were obtained and no virus was detectable with this qualitative method. Brain biopsy was refused by parents. The following infections were excluded: HIV, mycobacterium tuberculosis, toxoplasmosis, rubella, morbilli, and mycoplasma. Since no precise diagnosis was made, and

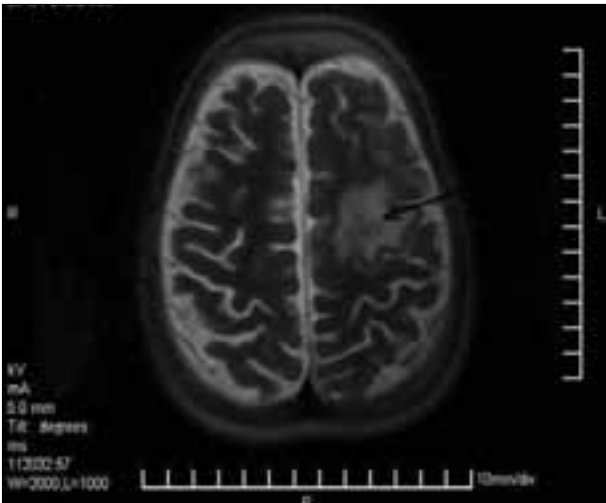


Figure 1. Endocranial lesion in the white matter marked with an arrow (patient 1)

PTLD was highly suspected, MMF and CSA were reduced and ganciclovir and dexamethasone were administered for a month. After 1 month of Ganciclovir, it was replaced by Acyclovir given orally for 6 months. Following 4.5 months, CSA was switched to sirolimus (SRL), and MMF to AZA. Two weeks later, endocranial lesions were in significant regression with normal neurological status. In a year period, almost complete regression was noted, apart from only mild linear lesions in pons. It has been 11 years after the transplantation and 7 years after high suspicion on PTLD. There is no evidence of disease recurrence, but she has advanced graft failure.

Patient 2

A girl was referred to our clinic for kidney transplant evaluation at the age of 14.5. At the age of 3.5, she was diagnosed with nephrotic syndrome (focal segmental glomerulosclerosis). Karyotype was 46 XY and genetic analyses revealed WT1 mutation in intron 9 (T->C at position +2), which confirmed diagnosis of syndrome Frasier. Eight months of hemodialysis treatment was finalized with the kidney transplantation (donor - mother) at the age of 15. The induction therapy included antithymocyte globulin, corticosteroids, MMF and CSA. There were EBV mismatch findings (recipient-negative and donor positive). Eight months upon transplantation, the patient had only one episode of fever, lasting for two days. Physical examination and laboratory findings were completely normal. Abdominal ultrasound revealed multifocal hypoechogenic changes in liver and spleen. Computed tomography (CT scan) showed diffuse focuses of changed liver and spleen tissue in length up to 4.5 cm (Figure 2). After liver biopsy, histopathological examination confirmed diffuse large cell B lymphoma (CD 20 positive, moderate risk). Qualitative PCR for EBV was positive. The patient was treated with intravenous ganciclovir for two months. CSA and MMF were reduced gradually within two weeks, up to their complete discontinuation. At the same time, prednisone was increased up to 0.3 mg/kg per day. Seven weeks from initiating ganciclovir therapy, the patient was treated with rituximab (375 mg/m² per dose) weekly for five courses.



Figure 2. Multiple liver lesions, the largest one marked with an arrow (patient 2)

Eight months after the initiation of rituximab, CT scan revealed normal findings. Therapy with sirolimus was introduced for 1 year and 9 months after diagnosing PTLD. After 6 years and 10 months from diagnosing PTLD, the patient is without evidence of B-cell lymphoma and her graft function is stable.

Patient 3

A boy with primary diagnosis of polycystic kidney disease was transplanted at his age of 15 (graft donor was his mother). At the time of transplantation, the recipient was Epstein-Barr virus (EBV-) sero-negative and the donor was sero-positive (EBV+). Induction immunosuppressive therapy included steroids, CSA and MMF.

Eleven months after transplantation, the patient presented with fever, dehydration, leucopenia, anemia and worsening of graft function. The etiology for his fever was unknown. Two months later he developed significant gastrointestinal symptomatology: epigastric pain, dysphagia and melena. Esophagogastroduodenoscopy revealed gastroesophageal reflux, grade II. Due to increasing abdominal pain, the patient underwent exploratory laparotomy, and multiple perforations of distal ileum were identified. Pathological examination demonstrated a diffuse large B-cell lymphoma (CD 20 positive). Initial qualitative EBV PCR method was negative and became positive in the further course of disease. Following PTLD diagnosis, the patient's immunosuppression therapy was withdrawn and he was treated with six cycles of rituximab (375 mg/m² per dose). First dose of rituximab cycle was administered two weeks after the surgery. Seven days after the first dose, he developed profuse intestinal hemorrhage, which progressed to hypovolemic shock. Abdominal ultrasound showed multiple small hypoechogenic focuses (up to 3 mm) in liver, and massive splenic hilum lymphadenopathy (up to 64 mm, Figure 3). Six weeks after the surgery, the patient developed pseudomonas aeruginosa septic shock, with multi organ system failure (MOSF). He was treated with broad-spec-



Figure 3. Spleen ultrasound: hilum lymphadenopathy marked with an arrow (patient 3)

trum antibiotics, dopamine and other supportive therapy. The patient was on mechanical ventilation for additional seven days, and due to anuric renal failure, continuous hemodiafiltration was performed during this period. He also underwent successful resuscitation due to cardiac arrest. Total parenteral nutrition was applied for two months. After completing VI cycles of rituximab, abdominal ultrasound showed disappearance of previous spleen lesions as well as significant regression of lymphadenopathy (up to 15 mm). Sirolimus was introduced after 1.5 year from PTLD diagnosis. At the time of the patient's latest control, it was 6 years after transplantation and 5 years after PTLD diagnosis. The patient was in complete remission with stable graft function.

DISCUSSION

The development of PTLD is one of the most lethal complications of solid organ transplantation. The variability of incidence of PTLD is related to the type of solid organ transplanted, adult versus pediatric recipients and the immunosuppressant protocol. The highest incidence of PTLD has been reported after intestinal transplant (20%), followed by lung transplant (15%), liver transplants (5–10%) and heart transplants (6%). The lowest incidence is found in 2%–3% of kidney transplant recipients [9]. Previous studies (in 1990s) from pediatric kidney transplant centers reported the mortality rate of 48%. More recent single center series and prospective trials data suggested better prognosis. In a recent large study of 92 patients with PTLD, the survival rate was 84.7% at 5 years [10]. Clinically, PTLD most commonly involves lymphoid tissue such as cervical or mesenteric lymph nodes, tonsils and adenoids [11]. Like in our patients' series, PTLD can involve other organs including lungs, central nervous system, gastrointestinal tract, liver and spleen. Great majority of PTLD cases are associated with EBV infection (80%–90%), but this is not the only risk factor of PTLD development. In addition, CMV seronegativity increases the PTLD risk due to cross-reactivity of the EBV and CMV antibodies. Younger children are usually considered to be at higher risk than adolescents [9] which may be attributed to EBV serostatus at transplantation. In a large pediatric cohort, complete HLA-DR miss-match between graft and recipient was significantly associated with more frequent PTLD development [12]. Moreover, the immunosuppressive regimen with tacrolimus (TAC) vs CSA and induction therapy with anti-T-cell antibodies were associated with an increased risk of PTLD [13]. Additional risk factors have been suggested including: male sex, white race, and simultaneous hepatitis C infection (like in patient 3 from our data). Histological evaluation of the tissue involved is necessary to differentiate PTLD from the acute cellular rejection as well as for prognosis and therapy. Early lesions and polymorphic PTLD (WHO 2008) are not classical malignant lymphoma. Most monomorphic PTLD are of B cell origin with diffuse large B cell lymphoma being the most frequent subtype in children [9]. CD 20 expression (patients 2 and 3 in our series) is associated with good

prognosis. Monomorphic T cell-PTLD and Burkitt or Burkitt-like PTLD are markers of poor prognosis. Other inferior prognostic markers are: age (older children), patients with late PTLD onset (>1 year after transplantation), patients with elevated LDH, with bone marrow or CNS involvement and those that are non-responders to first line therapy [9]. Elevated levels of EBV DNA were correlated with PTLD in several quantitative assays [14, 15]. In our case series, only one patient had initially positive qualitative EBV-PCR (Table 1). The development of quantitative PCR technique has significantly improved the specificity for PTLD and may serve as an early marker in high-risk patients. Frequent monitoring with this technique and treatment with reduction of immunosuppression therapy, coupled with anti-viral therapy have been reported to reduce the incidence of PTLD in pediatric liver transplant patients from 10% to 5% when compared with the historical controls [16]. It is very important to note that one of our patients (patient 2) was almost asymptomatic, no other symptoms were manifested except two days of moderate fever. This underlines that transplanted patient need very careful and detailed clinical, laboratory and imaging examination. To date, there has been no standard evidence-based treatment of PTLD. The universal first maneuver in over 90% of cases is reduction of immunosuppression. This alone can lead to complete remission in subfraction of cases [17], like in patients with early lesions and polymorphic proliferations. In PTLD cases with overt malignant transformation/lymphoma, rituximab alone or in combination with chemotherapy should also be administered [6]. Our two patients with histology findings of diffuse large B cell lymphoma (monomorphic) and CD20 + cells were treated successfully with rituximab, despite late diagnosis and severe septic shock in case 3. Considering transplanted children with abdominal pain, like in our third case, intestinal biopsies should be thoroughly investigated in order to exclude initial PTLD. Although the reduction of immunosuppression, immunotherapy (rituximab) and surgery, well described as first line therapy regimen [18] led to tumor elimination, the clinical course with ileum perforation in our patient was a life-threatening event. Similar to Green et al. [19], new perforation of the intestine in our patient was associated with the onset of septic shock as PTLD lesions resolved on this site. It is very interesting to note that the acute clinical deterioration may be sequel of improvement as well as of progression. Besides two confirmed PTLD cases, a girl with highly suspected CNS PTLD has been in stable remission over 7 years. Very important finding in her CSF which is consistent with the most probable PTLD diagnosis is high EBV IgG titer (1:1280). We suppose that she had benign lymphoproliferation, since she was successfully treated only with ganciclovir and reduction of immunosuppression. Before kidney transplantation, all our patients presented here received T-cell depleting agents or immunosuppression intensification, and two of them had confirmed EBV miss match. So, they were in a very high risk group where their EBV status had to be checked regularly with more precise method-quantitative EBV PCR. With this method

we could reduce on time their immunosuppression and prevent EBV replication.

In conclusion, our cases with confirmed PTLD and follow-up data suggested that combination of immunosuppression reduction and rituximab without chemotherapy results in a high rate of long term remission. This therapy is safe and effective for EBV related PTLD, taking into consideration that early recognition of disease is very important. Qualitative EBV-PCR method is not proved as a reliable marker for diagnosis and follow-up of patients with PTLD. Besides positive outcomes in described

patients/cases, we would like to stress the following: the attending physician must pay attention to more accurate PTLD diagnosis, which implies monitoring of high risk patients with quantitative PCR EBV methods.

ACKNOWLEDGEMENTS

This work was supported by the Ministry of Education, Science and Technological Development, Republic of Serbia, Project 175085.

REFERENCES

- Shroff R, Rees L. The post-transplant lymphoproliferative disorder – a literature review. *Pediatr Nephrol.* 2004; 19:369-77.
- Wingen AM, Wiesel M, Mohring K, Scharer K, Mahis O. Malignancies in children with renal replacement therapy. *Transplant Proc.* 1994; 26:5-6.
- Caillard S, Dharnidharka V, Agodoa I, Bohen E, Abbott K. Posttransplant lymphoproliferative disorders after renal transplantation in the United States in era of modern immunosuppression. *Transplantation.* 2005; 80:1233-43.
- Capello D, Rossi D, Gaidano G. Post-transplant lymphoproliferative disorders: molecular basis of disease histogenesis and pathogenesis. *Hematol Oncol.* 2005; 23:61-77.
- Pascual J, Torrelo A, Teruel JL, Bellas C, Marcén R, Ortuño J. Cell lymphomas after renal transplantation. *Transplantation.* 1992; 53:1143-5.
- Cleper R, Ben Shalom E, Landau D, Weissman I, Krause I, Konen O, et al. Post-transplantation lymphoproliferative disorder in pediatric kidney-transplant recipients – a national study. *Pediatr Transplantation.* 2012; 16:619-26.
- Swerdlow SH, Campo E, Harris NL, Jaffe ES, Pileri SA, Stein H, et al. *WHO Classification of Tumors of Haematopoietic and Lymphoid Tissues.* 4th ed. Geneva: World Health Organization; 2008.
- EBPG Expert Group on Renal Transplantation. European best practice guideline for renal transplantation. Section IV: long term management of the transplant recipient. IV.6.1. Cancer risk after renal transplantation. Posttransplant lymphoproliferative disease (PTLD): prevention and treatment. *Nephrol Dial Transplant.* 2002; 17:31-3.
- Mynarek M, Hussein K, Kreipe H, Maecker-Kolhoff B. Malignancies after pediatric kidney transplantation: more than PTLD? *Pediatr Nephrol.* 2013 [in press] DOI: 10.1007/s00467-013-2622-5.
- Dharnidharka VR, Martz KL, Stablein DM, Benfield MR. Improved survival with recent post-transplant lymphoproliferative disorder (PTLD) in children with kidney transplants. *Am J Transplant.* 2011; 11:751-8.
- Cheng E, Fustino N, Klesse L, Chinnakotla S, Sanghavi R. Post-transplant lymphoproliferative disorder resembling Wilms tumor. Diagnostic dilemma: renal biopsy or nephrectomy? *Pediatr Transplantation.* 2011; 15:E187-91.
- Opelz G, Dohler B. Pediatric kidney transplantation: analysis of donor age, HLA match, and posttransplant non-Hodgkin lymphoma: a collaborative transplant study report. *Transplantation.* 2010; 71:1065-8.
- Opelz G, Dohler B. Lymphomas after solid organ transplantation: a collaborative study report. *Am J Transplant.* 2004; 4:222-30.
- Niesters HG, van Esser J, Fries D, Wolters KC, Cornelissen J, Osterhaus AD. Development of real-time quantitative assay for detection of Epstein-Barr virus. *J Clin Microbiol.* 2000; 38:712-5.
- Rowe DT, Webber S, Schauer EM, Reyes J, Green M. Epstein-Barr virus monitoring: its role in the prevention and management of the post-transplant lymphoproliferative disease. *Transpl Infect Dis.* 2001; 3:79-87.
- McDiarmid SV, Jordan S, Kim GS, Toyoda M, Goss JA, Vargas JH, et al. Prevention and preemptive therapy of posttransplant lymphoproliferative disease in pediatric liver recipients. *Transplantation.* 1998; 66:1604-11.
- Hussein K, Tiede C, Maecker-Kolhoff B, Kreipe H. Posttransplant lymphoproliferative disorder in pediatric patients. *Pathobiology.* 2013; 80:289-96.
- Svoboda J, Kotloff R, Tsai DE. Management of patients with post-transplant lymphoproliferative disorder: the role of rituximab. *Transpl Int.* 2006; 19:259-69.
- Green M, Michaelis MG, Weber SA, Rowe D, Reyes J. The management of Epstein-Barr virus associated post-transplant lymphoproliferative disorders in pediatric solid-organ transplant recipients. *Pediatr Transplant.* 1999; 3:271-8.

Посттрансплантациона лимфопрولیферативна болест – приказ три детета са пресађеним бубрегом

Бранкица Спасојевић-Димитријева¹, Амира Пецо-Антић^{1,2}, Душан Париповић¹, Дивна Крушчић¹, Зоран Крстић^{2,3}, Маја Чупић³, Мирјана Цветковић¹, Гордана Милошевић-Ломић^{1,2}, Мирјана Костић^{1,2}

¹Одељење нефрологије, Универзитетска дејча клиника, Београд, Србија;

²Медицински факултет, Универзитет у Београду, Београд, Србија

³Одељење урологије, Универзитетска дејча клиника, Београд, Србија;

⁴Институт за микробиологију и имунологију, Медицински факултет, Универзитет у Београду, Београд, Србија

КРАТАК САДРЖАЈ

Увод Посттрансплантациона лимфопрولیферативна болест (енгл. *post-transplant lymphoproliferative disorder – PTLD*) је хетерогена група болести коју одликује поремећена лимфоидна пролиферација после трансплантације. Ова болест се јавља у стањима имуносупресије, а њена појава је углавном удружена с применом анти-Т-лимфоцитних лекова и интензивирањем имуносупресивне терапије. Код већине болесника *PTLD* је последица инфекције Епстин–Бар вирусом (*Epstein–Barr virus – EBV*) и хиперплазије Б-лимфоцита позитивних на *CD-20*. Према новој класификацији малигнитета лимфоног ткива, Светска здравствена организација је 2008. године поделила *PTLD* у четири главне групе: ране лезије, полиморфни, мономорфни и *PTLD* типа Хочкиновог лимфома. Лечење ових болесника и даља прогноза битно зависе од хистолошке слике. Лечење укључује смањење или потпуно обустављање примене имуносупресивне терапије, затим примену моноклонских анти-*CD-20* антитела (ритуксимаб) и хемиотерапије.

Прикази болесника Приказујемо три болесника са дијагнозом *PTLD*: две девојчице узраста од седам и по и петнаест

година и шеснаестогодишњег дечака. Они су имали различите локализације болести: млађа девојчица вишеструке лезије мождане масе, старија истовремену лезију јетре и слезине, а дечак лезију танког црева. Иако је *EBV* окидач лимфоидне пролиферације, која је потврђена било патохистолошки, било у цереброспиналном ликвору, налаз квалитативне *EBV-PCR* методе је био позитиван само код једног болесника на почетку обољења. У лечењу сва три болесника примењивано је смањење имуносупресивне терапије, а код два детета ритуксимаб и ганцикловир. Болесници су имали одличан исход и поред бројних потешкоћа како у дијагностици, тако и у лечењу.

Закључак Квалитативна *EBV-PCR* метода није поуздан показатељ у клиничком праћењу деце с пресађеним бубрегом. Сматрамо да се болесници код којих се установе фактори ризика за развој *PTLD* морају много чешће надгледати применом квантитативне *EBV-PCR* методе.

Кључне речи: посттрансплантациона лимфопрولیферативна болест; Епстин–Бар (*Epstein–Barr*) вирус; *PCR*; трансплантација бубрега код деце

Урођена псеудоартроза потколенице излечена већ скоро заборављеном методом – приказ болесника

Зоран Вукашиновић^{1,2}, Душко Спасовски^{1,2}, Игор Шешлија², Исмет Гавранкапетановић^{3,4}, Елвир Баждар^{3,4}, Зорица Живковић⁵

¹Медицински факултет, Универзитет у Београду, Београд, Србија;

²Институт за ортопедско-хируршке болести „Бањица“, Београд, Србија;

³Медицински факултет, Универзитет у Сарајеву, Сарајево, Босна и Херцеговина;

⁴Клиника за ортопедију и трауматологију, Клинички центар Универзитета у Сарајеву, Сарајево, Босна и Херцеговина;

⁵Клиничко-болнички центар „Др Драгиша Мишовић“, Београд, Србија

КРАТАК САДРЖАЈ

Увод Урођена псеудоартроза потколенице је редак урођени деформитет који се прогресивно развија. Лечење је неизвесно и тешко, а обухвата бројне описане методе, од некад обавезне ране ампутације до савремених хируршких захвата (Илизаровљева метода, слободни микроваскуларни фибуларни калем) и адјувантних метода (електростимулација, бифосфонати, коштани морфогени протеин). Описујемо примену некада широко примењиване методе реконструкције тибије хомологним калемом уз интрамедуларну фиксацију.

Приказ болесника Код дечака је псеудоартроза обе кости потколенице (Бојдов тип 5) примећена још док је био новорођенче. Деформитет је безуспешно лечен корективним гипсевима током прве године по рођењу, али дечак није проходао. У узрасту од три и по године примењено је хируршко лечење: ресекција псеудоартрозе обе кости уз остеопластику тибије цилиндричним хомокалемом, интрамедуларну фиксацију Штајнмановим клином кроз ножје и постоперациону натколену гипсану имобилизацију. Клини је извађен након десет месеци, а физикална терапија започета је годину и по од операције, уз увођење ослонца и ношење потколенице ортозе још годину дана. Две и по године после операције утврђено је потпуно зарастање псеудоартрозе и дозвољен је пун ослонац на оперисану ногу. На завршном контролном прегледу пет година и три месеца након операције осовина потколенице је била нормална, ноге једнаке дужине, а ходање правилно уз пун обим покрета у свим зглобовима оперисане ноге. Рендгенски снимак је показао потпуно зарастање обе кости потколенице.

Закључак Упркос лошим прогностичким факторима (мали узраст, велики деформитет), примена старих и готово заборављених метода може дати одличан резултат лечења.

Кључне речи: конгенитална псеудоартроза потколенице; хомологни калем; интрамедуларна фиксација

УВОД

Урођена псеудоартроза потколенице убраја се у највеће изазове у дечјој ортопедији. Инциденција ове ретке болести је свега 4–7 оболелих на милион новорођене деце. Јавља се у неколико облика, од којих је најчешћи (40–80% случајева) повезан с неурофиброматозом тип 1 [1]. Деформитет постаје видљив најчешће до друге године, док се у ретким случајевима дијагностикује у адолесцентском узрасту [2, 3]. Већ више од једног века истражују се етиолошки фактори одговорни за настанак конгениталне псеудоартрозе потколенице [4] и може се рећи да није било методе лечења која се примењује у дечјој ортопедији а да се није покушала применити на ово стање [5, 6, 7]. Упркос томе, обољење одликују прогресивно погоршање деформитета, непредвидљив ток и неизвесна прогноза [8, 9, 10].

Клинички приступ дијагностиковању и лечењу конгениталне псеудоартрозе потко-

ленице има три доминантне компоненте: 1) етиолошку, која се односи на клиничко и лабораторијско испитивање постојања неурофиброматозе тип 1; 2) функционалну, која обухвата испитивање покретљивости псеудоартрозе, постојања деформитета, контрактура околних зглобова или неуроваскуларних поремећаја, као и процену квалитета меких ткива захваћене потколенице; и 3) радиолошку, где се применом дугих радиографија у два правца у стојећем положају одређују ниво и структура псеудоартрозе, квалитет кости, те прецизно утврђује величина и оријентација деформитета осовине костију потколенице и дужина ногу [11]. Од неколико класификација конгениталне псеудоартрозе потколенице најчешће се користи Бојдова (Boyd) класификација [4].

Лечење је усмерено на подстицање зарастања костију потколенице уз спречавање настанка аксијалног и ротационог деформитета, изједначавање дужине ногу и обезбеђење одговарајуће стабилности скочног

Correspondence to:

Zorica ŽIVKOVIĆ
Knežinje Zorke 9, 11000 Beograd
Srbija
zorica.zivkovic@beotel.net



Слика 1. Урођена псеудоартроза потколенице у узрасту од четири године – преоперациони налаз

Figure 1. Congenital pseudoarthrosis of the lower leg at the age of four years – preoperative finding

зглоба и стопала при ослонцу и ходању. Избор методе зависи од врсте псеудоартрозе, величине скраћења ноге и узраста болесника [12, 13]. Типични план лечења обухвата ресекцију псеудоартрозе, премошћавање насталог дефекта биолошки здравим ткивом и стабилну фиксацију уз тродимензионалну корекцију односа колена и скочног зглоба и очувану функцију екстремитета, те постоперациону гипсану или ортотску имобилизацију и одложено, поступну рехабилитацију [14].

Основни проблем у избору концепта лечења конгениталне псеудоартрозе потколенице јесте чињеница да се успех лечења може сагледати тек након достизања коштане зрелости болесника, док се евентуални неуспех лечења приказује знатно раније. Неизвесно и дуготрајно лечење са собом носи и ризик од развоја многих компликација, међу којима су најчешће незарастање [15], рефрактура, контрактура скочног зглоба и тарзалних зглобова, развој валгус или варус деформитета скочног зглоба и поремећај раста потколенице. Прогноза је уопште лошија уколико је деформитет изражен у ранијем добу, крајеви псеудоартрозе захваћени склерозом, а раст костију потколенице више оштећен. Упркос биолошком лечењу, ампутација је индикована код половине болесника.

ПРИКАЗ БОЛЕСНИКА

Дечак рођен у новембру 2004. године примљен је као новорођенче у Клинику за ортопедију и трауматологију Клиничког центра Универзитета у Сарајеву с клиничком сликом скраћења и деформитета десне потколенице. После клиничког прегледа и радиографске дијагностике постављена је дијагноза урођене псеудоартрозе обе кости потколенице. Почетно лечење је било конзервативном, гипсаном имобилизацијом, примењеном од другог месеца по рођењу с кратким



Слика 2. Хируршки налаз

Figure 2. Operative finding

паузама током 18 месеци. Упркос томе, до излечења псеудоартрозе није дошло и дете није проходило на десну ногу.

У узрасту од две године и осам месеци, након консултативног прегледа лекара Института за ортопедско-хируршке болести „Бањица“ у Београду, установљена је етаблирана псеудоартроза тип 5 према класификацији Бојда (Слика 1) и постављена индикација за хируршко лечење, те је дете два дана касније и оперисано. Учињене су ресекција псеудоартрозе обе кости потколенице, остеопластика тибије цилиндричним, тзв. муф хомокалемом, и интрамедуларна фиксација Штајнмановим клином пласираним кроз ножје, уз реконструкцију осовине потколенице (Слика 2). Коришћен је хомокалем пореклом од другог болесника дејег узраста, добијен након ресекције бутне кости у склопу лечења развојног поремећаја кука методом крваве репозиције кука. Фибула није ни пластицирана, нити фиксирана. Ради заштите остварене фиксације, имајући у виду пречник и механичка својства Штајнмановог интрамедуларног клина, после операције је стављена и гипсана имобилизација. Дете је примало антибиотску профилаксу седам дана.

У даљем поступку урађена је поступна вертикализација детета уз ходање помоћу штака и забрану ослонца на оперисану ногу. Интрамедуларна фиксација и гипсана имобилизација трајале су десет месеци (Слика 3), након чега је интрамедуларни клин извађен,



Слика 3. Осам месеци после операције
Figure 3. Eight months after the operation



Слика 4. Осамнаест месеци после операције
Figure 4. Eighteen months after the operation

а гипсана имобилизација без ослонца настављена још осам месеци. После укупно осамнаест месеци од операције, гипсана имобилизација је уклоњена и замењена потколеним ортозом, уз дозволу додирног ослонца на десну, оперисану ногу (Слика 4). Истовремено је започета физикална терапија ради разраде скоочног зглоба и колена. Поменути ортозу дете је носило укупно дванаест месеци, уз прогресију ослонца. Две и по године након операције, у узрасту од пет година и два месеца, установљено је потпуно зарастање псеудоартрозе. Ортоза је уклоњена и дозвољен је пун ослонац на оперисану ногу.



Слика 5. Завршни резултат пет година и три месеца после операције
Figure 5. The final result five years and three months after the operation

На последњем контролном прегледу, обављеном у узрасту детета од осам година, односно пет година и три месеца после операције, забележен је нормалан клинички налаз, без клинички видљиве разлике у дужини ногу, што посредно указује на то да интрамедуларни клин који је прошао кроз плочу раста доњег дела тибије није довео до њеног оштећења. Постигнута је потпуна корекција осовине лечене потколенице и у фронталној и у сагиталној равни, уз пун обим покрета у коленом и скочном зглобу, без болова. На рендгенском снимку уочено је потпуно зарастање обе кости оболеле потколенице (Слика 5). Детету су саветовани нормалан животни режим и бављење физичким активностима у оквиру школске наставе и рекреативно.

ДИСКУСИЈА

Откада је Хацехер 1708. године описао „интраутерини прелом потколенице“, стање које данас познајемо као конгениталну псеудоартрозу потколенице, примењиване су бројне варијације хируршких и конзервативних метода лечења. До тридесетих година двадесетог века рана ампутација је била уобичајена метода лечења [16]. Некада коришћене методе лечења (примена аутокалема или хомокалема узетог са фибуле, здраве тибије или са гребена бедрене кости, уз мноштво варијанти адаптације контакта с примајућом регијом и начина унутрашње фиксације) [4] данас су потиснуте применом интрамедуларне фиксације, микроваскуларног калема са фибуле и Илизаровљевог методом, са додатном стимулацијом физикалним (једносмерна струја, пулсно електромагнетно поље) или фармаколошким агенсима (бифосфонати, коштани морфогени протеин) или без њих [17, 18, 19]. Међу њима, интрамедуларна фиксација је у употреби деценијама и је-

дан од најпоузданијих начина фиксације ресециране псеудоартрозе тибије [20-25]. Примена Илизаровљевог спољашњег фиксатора отворила је нове могућности хируршког лечења овог деформитета директном компресијом или поступном надокнадом ресекцијом насталог оштећења, уз специфичне предности у виду могућности извођења раног ослонца и ходања, као и прецизног и поступног решавања инегалитета дужине ногу [26, 27]. Описани су и случајеви комбинација ове две методе [28]. Ипак, свесни лоших резултата примене Илизаровљевог метода код деце млађе од пет година [6, 26], код описаног дечака одлучили смо се за ресекцију измењеног сегмента тибије, а настали дефект је премошћен хомокалемом уз интрамедуларну фиксацију калема и окрајака тибије [20, 29]. Цилиндрични облик калема омогућио је квалитетну механичку интеракцију са ресецираним окрајцима тибије.

Избор Штајнмановог клина као средства фиксације условљен је пречником медуларног канала тибије код троипогодишњег детета, а стабилност такве фиксације надокнађена је продуженом гипсаном имобилизацијом и одложеном рехабилитацијом. Разлог за овакву предострожност лежи у високој стопи поновних прелома након примене интрамедуларних имплантата: 25–40% после 3–5 година клиничког праћења [20]. Осим врсте фиксације, ризик од поновног прелома се повећава уколико је операција изведена у узрасту млађем од четири године и уколико је зарасла само псеудоартроза тибије, али не и фибуле [26]. Проблем смањеног лонгитудиналног раста оболеле потколенице представља важну компоненту деформитета и битно утиче на функционални налаз. Сматра се да је узрок скраћења прерано затварање дисталне тибијалне физе као резултат основног патолошког процеса, независно од примене лечења и избора врсте калема или начина његове фиксације. Други аутори су уочили да су израженија атрофија тибије и мањи дистални фрагмент повезани с ограничењем покрета и појавом бола у скочном зглобу и стопалу [30]. У том смислу, величина скраћења потколенице има прогностичку вредност, а њена успешна корекција обезбеђује услове за нормалан ход. Уколико се биолошки већ оштећена дистална тибијална физа додатно јатрогено оштети имплантационим материјалом, могућности за пово-

љан функционални налаз на крају лечења се смањују. Код приказаног дечака Штајнманов клин је постављен лонгитудинално кроз задњи део стопала и тибију, пробијајући хрскавицу раста. Међутим, до поремећаја раста није дошло, што објашњавамо значајним биолошким потенцијалом веома младог болесника, употребом глатког клина малог пречника и предузетим мерама предострожности у виду веома спорог пласирања клина, чиме је избегнуто термичко оштећење ткива. Наш налаз је у складу са савременим схватањем етиологије конгениталне псеудоартрозе потколенице, јер се тек након довољно широке ресекције патолошки измењеног псеудоартротичног сегмента биолошки процеси у костима потколенице несметано успостављају [23, 27, 31].

Тудиско (*Tudisco*) и сарадници [9] наводе да су код срасле псеудоартрозе тибије уочена три фактора лошег функционалног налаза: знатна неједнакост ногу, контрактура скочног зглоба и псеудоартроза фибуле, која такође доприноси валгус деформитету скочног зглоба [12] и повећава могућност да поново дође до прелома тибије [11]. У нашем случају ови фактори ризика су избегнути, а псеудоартроза фибуле је срасла без унутрашње фиксације, што је код примене интрамедуларне фиксације тибије и очекивано [20, 32].

Главна ограничење у примени овога метода лечења јесте извор довољно великих цилиндричних хомокалемова (и по пречнику и по дужини). Њих углавном на располагању имају центри који се баве крвавим репозицијама ишчашених кукова код деце узраста 4–7 година. Наравно, неопходно је да такви центри имају и добро организоване коштане банке, које испуњавају критеријум сигурности прималаца коштаних калемова (у вези са заштитом од преносних болести и одговарајућом ткивном подударношћу) и критеријум испуњености свих предвиђених етичких норми у вези с поступком ткивне трансплантације.

НАПОМЕНА

Рад је настао у оквиру пројекта број ИИИИ 41004, који финансира Министарство просвете, науке и технолошког развоја Републике Србије.

ЛИТЕРАТУРА

- Mahnken AH, Staatz G, Hermanns B, Gunter RW, Weber M. Congenital pseudarthrosis of the tibia in pediatric patients: MR imaging. *AJR Am J Roentgenol*. 2001; 177(5):1025-9.
- Vander Have KL, Hensinger RN, Caird M, Johnston C, Farley FA. Congenital pseudarthrosis of the tibia. *J Am Acad Orthop Surg*. 2008; 16:228-36.
- Ferguson J, Wainwright A. Tibial bowing in children. *Orthopaedics and Trauma*. 2013; 27(1):30-41.
- Boyd HB. Pathology and natural history of congenital pseudarthrosis of the tibia. *Clin Orthop Relat Res*. 1982; (166):5-13.
- Boero S, Catagni M, Donzelli O, Facchini R, Frediani PV. Congenital pseudarthrosis of the tibia associated with neurofibromatosis-1: treatment with Ilizarov's device. *J Pediatr Orthop*. 1997; 17(5):675-84.
- Guidera KJ, Raney EM, Ganey T, Albani W, Pugh L, Ogden JA. Ilizarov treatment of congenital pseudarthroses of the tibia. *J Pediatr Orthop*. 1997; 17(5):668-74.
- Crawford AH, Schorry EK. Neurofibromatosis update. *J Pediatr Orthop*. 2006; 26(3):413-23.
- Horn J, Steen H, Terjesen T. Epidemiology and treatment outcome of congenital pseudarthrosis of the tibia. *J Child Orthop*. 2013; 7(2):157-66.
- Tudisco C, Bollini G, Dungal P, Fixsen J, Grill F, Hefti F, et al. Functional results at the end of skeletal growth in 30 patients affected by congenital pseudarthrosis of the tibia. *J Pediatr Orthop B*. 2000; 9(2):94-102.
- Sakamoto A, Yoshida T, Uchida Y, Kojima T, Kubota H, Iwamoto Y. Long-term follow-up on the use of vascularized fibular graft for the treatment of congenital pseudarthrosis of the tibia. *J Orthop Surg Res*. 2008; 3:13.
- Johnston CE. Congenital pseudarthrosis of the tibia: results of technical variations in the Charnley-Williams procedure. *J Bone Joint Surg Am*. 2002; 84(10):1799-810.

12. Dobbs MB, Rich MM, Gordon JE, Szymanski DA, Schoenecker PL. Use of an intramedullary rod for treatment of congenital pseudarthrosis of the tibia: a long-term follow-up study. *J Bone Joint Surg Am.* 2004; 86(6):1186-97.
13. Kim HW, Weinstein SL. Intramedullary fixation and bone grafting for congenital pseudarthrosis of the tibia. *Clin Orthop Relat Res.* 2002; (405):250-7.
14. Baker JK, Cain TE, Tullos HS. Intramedullary fixation for congenital pseudarthrosis of the tibia. *J Bone Joint Surg Am.* 1992; 74(2):169-78.
15. Sulaiman AR, Nordin S, Faisham WI, Zulmi W, Halim AS. Residual nonunion following vascularised fibular graft treatment for congenital pseudarthrosis of the tibia: a report of two cases. *J Orthop Surg.* 2006; 14(1):64-6.
16. Hiromoto I, Yasumasa S, Yoshikazu G. A Case of Congenital Pseudarthrosis of the Tibia Treated with Pulsing Electromagnetic Fields. *J Nippon Med Sch.* 2000; 67(3):198-201.
17. Lee FY, Sinicropi SM, Lee FS, Vitale MG, Roye DP Jr, Choi IH. Treatment of congenital pseudarthrosis of the tibia with recombinant human bone morphogenetic protein-7 (rhBMP-7): a report of five cases. *J Bone Joint Surg Am.* 2006; 88:627-33.
18. Schindeler A, Ramachandran M, Godfrey C, Morse A, McDonald M, Mikulec K, et al. Modeling bone morphogenetic protein and bisphosphonate combination therapy in wild-type and Nf1 haploinsufficient mice. *J Orthop Res.* 2008; 26:65-74.
19. Kirin I, Jurisić D, Mokrović H, Salem O, Zamolo G, Kovačević M. Advantages of intramedullary fixation in treatment of congenital tibial pseudarthrosis – a case report. *Coll Antropol.* 2011; 35(3):933-5.
20. Joseph B, Mathew G. Management of congenital pseudarthrosis of the tibia by excision of the pseudarthrosis, onlay grafting, and intramedullary nailing. *J Pediatr Orthop B.* 2000; 9(1):16-23.
21. Ohnishi I, Sato W, Matsuyama J, Yajima H, Haga N, Kamegaya M, et al. Treatment of congenital pseudarthrosis of the tibia: a multicenter study in Japan. *J Pediatr Orthop.* 2005; 25:219-24.
22. Soldado F, Fontecha CG, Haddad S, Hernandez E, Fernandez A, Corona P, et al. Treatment of congenital pseudarthrosis of the tibia with vascularized fibular periosteal transplant. *Microsurgery.* 2012; 32(5):397-40023.
23. Hung NN. Use of an intramedullary Kirschner wire for treatment of congenital pseudarthrosis of the tibia in children. *J Pediatr Orthop B.* 2009; 18(2):79-85.
24. Sulaiman AR, Simbak N, Wan Ismail WF, Wan Z, Halim AS. Breakage of an intramedullary rod after bone union in congenital pseudarthrosis of the tibia: a report of two cases. *J Orthop Surg (Hong Kong).* 2011; 19(2):250-3.
25. Bobotas K, Lallios SN, Nikolaou VS, Korres DS, Efstathiopoulos NE. Successful treatment of congenital pseudarthrosis of the tibia: still a challenge. *Eur J Orthop Surg Traumatol.* 2013; 23(Suppl 2):S303-10.
26. Cho TJ, Choi IH, Lee SM, Chung CY, Yoo WJ, Lee DY, et al. Refracture after Ilizarov osteosynthesis in atrophic-type congenital pseudarthrosis of the tibia. *J Bone Joint Surg Br.* 2008; 90(4):488-93.
27. Hermanns-Sachweh B, Senderek J, Alfer J, Klosterhalfen B, Büttner R, Füzesi L, et al. Vascular changes in the periosteum of congenital pseudarthrosis of the tibia. *Pathol Res Pract.* 2005; 201:305-12.
28. Vikasgashe M, Song SH, Ahmedrefai M, Park KW, Song HR. Congenital pseudarthrosis of the tibia treated with a combination of Ilizarov's technique and intramedullary rodding: 15 cases followed for mean 4.5 years. *Acta Orthopaedica.* 2012; 83(5):515-22.
29. Shah H, Doddabasappa SN, Joseph B. Congenital pseudarthrosis of the tibia treated with intramedullary rodding and cortical bone grafting: a follow-up study at skeletal maturity. *J Pediatr Orthop.* 2011; 31(1):79-88.
30. Fernández Gómez E, Castro Torre M, González-Herranz P, Delgado Sotorrio C, Rodríguez Lorenzo A. Early reconstruction of congenital pseudoarthrosis of the tibia with free vascularized fibular grafts. *Cir Pediatr.* 2012; 25(2):113-6.
31. Takazawa A, Matsuda S, Fujioka F, Uchiyama S, Kato H. Split tibia vascularized fibular graft for congenital pseudarthrosis of the tibia: a preliminary report of 2 cases. *J Pediatr Orthop.* 2011; 31(4):e20-4.
32. Shah H, Rousset M, Canavese F. Congenital pseudarthrosis of the tibia: Management and complications. *Indian J Orthop.* 2012; 46(6):616-26.

Congenital Pseudarthrosis of Lower Leg Treated by Almost Outdated Method – Case Report

Zoran Vukašinović^{1,2}, Duško Spasovski^{1,2}, Igor Šešlija², Ismet Gavrankapetanović^{3,4}, Elvir Baždar^{3,4}, Zorica Živković⁶

¹Faculty of Medicine, University of Belgrade, Belgrade, Serbia;

²Institute for Orthopedic Surgery "Banjica", Belgrade, Serbia;

³Faculty of Medicine, University of Sarajevo, Sarajevo, Bosnia and Herzegovina;

⁴Orthopedics and Traumatology Clinic, Clinical Center, University of Sarajevo, Sarajevo, Bosnia and Herzegovina;

⁵Clinical Hospital Center "Dr Dragiša Mišović", Belgrade, Serbia

SUMMARY

Introduction Congenital pseudarthrosis of tibia is a rare congenital deformity with progressive evolution. Treatment is vague and difficult, and many methods have been used – from once mandatory early amputation to contemporary operative (Ilizarov method, free microvascular fibular graft) and adjuvant methods (electrostimulation, bisphosphonates, bone morphogenetic protein). We present the usage of once popular method of homologous graft insertion and intramedullary fixation.

Case Outline This is a case report of male patient with pseudarthrosis involving both crural bones (Boyd type 5), diagnosed in neonatal age. Early conservative treatment was unsuccessful, so child never initiated gait. At the age of three and a half years, operative treatment was applied: resection of pseudarthrosis on both tibia and fibula, and osteoplasty of tibia using cylindric

homologous graft and intramedullary fixation with transtarsal Steinman pin, followed by long leg cast immobilization. Pin was removed after ten months, and physical therapy was initiated 1.5 year after surgery, with initial to partial weight bearing and short leg cast throughout another year. Two and a half years after surgery complete union of graft was documented, and then full weight bearing was allowed. At final visit, five years and three months after surgery, shin axis was correct, leg lengths were equal, and child had normal walk with full range of motion. X-ray showed complete union of both tibia and fibula.

Conclusion Despite bad prognostic factors (young age, severe deformity), utilization of obsolete and almost forgotten treatment methods can provide excellent result.

Keywords: congenital pseudarthrosis of tibia; homologous graft; intramedullary fixation

Акутно некротизирајуће запаљење једњака – црни једњак

Слободан Николић, Владимир Живковић

Институт за судску медицину, Медицински факултет, Универзитет у Београду, Београд, Србија

КРАТАК САДРЖАЈ

Увод Болести органа за варење су релативно ретки узроци напрасне и изненадне смрти у било којем животном добу, а болести једњака посебно. Црни једњак (енгл. *black esophagus*) је акутно некротизирајуће запаљење слузокоже доњих делова једњака које дифузно захвата цео обим овог органа. Ово запаљење може бити извор профузног крварења и узрок напрасне и изненадне смрти.

Приказ случаја Приказан је мушкарац стар 76 година који је дуже време био лечен од повишеног крвног притиска и шећерне болести. Неколико месеци пре смрти имао је и мождани удар, те је био непокретан. Умро је у болници, напрасно и изненада. Обдукцијом су установљени акутно некротизирајуће запаљење једњака и акутне гризлице слузокоже желуца и дванаестопалачног црева. Ове су промене биле узрок смртоносном губитку крви.

Закључак Акутно некротизирајуће запаљење једњака треба препознати током обдукције и довести га у везу како с узроком смрти, тако и с удруженим болестима других органа које ово запаљење једњака прате или олакшавају његову појаву.

Кључне речи: црни једњак; акутни некротизирајући езофагитис; гастроинтестинално крварење; напрасна смрт; обдукција

УВОД

Болести органа за варење су релативно ретки узроци напрасне и изненадне смрти у било којем животном добу, а болести једњака посебно [1, 2, 3]. Болести једњака које могу бити установљене током обдукције и које могу бити узрок напрасном и/или изненадном умирању јесу оне које изазивају неко профузно крварење (нпр. проширене вене једњака – варикси, Малори–Вајсов синдром, аномалије крвних судова једњака, тумори) или перфорације праћене запаљењем медијастинума (нпр. улкуси, Баретов једњак, Берхаев синдром, тумори) [4].

Црни једњак (енгл. *black esophagus*) је акутно некротизирајуће запаљење слузокоже доњих делова једњака које дифузно захвата цео обим овог органа. Ово запаљење може бити извор профузног крварења и узрок напрасне и изненадне смрти. Овом приликом приказујемо један такав случај.

ПРИКАЗ СЛУЧАЈА

Мушкарац стар 76 година је око четири месеца пре смрти примљен у болницу и лечен због немогућности кретања и левостране слабости удова услед инфаркта мозга. Болесник је боловао и од повишеног крвног притиска и шећерне болести, а десетак година раније имао је и операцију левог кука. Око месеца дана касније пребачен је на даље лечење у центар за рехабилитацију, где је боравио наредна два месеца, али се његово оп-

ште здравствено стање није побољшавало. Био је потпуно завијан од туђе неге и помоћи (због одузетости леве ноге није могао да стоји и хода, постојала је скоро потпуна одузетост леве руке, није контролисао мокрење и дефекацију, развили су се декубитус у крсном пределу и запаљење мокраћних путева због катетера). Током лечења вредности броја еритроцита и хемоглобина биле су од 3,90 до $3,47 \times 10^{12}/l$, односно од 89 до 107 g/l, а гликемије од 4,7 до 12,3 mmol/l.

По завршетку лечења болесник је био код куће око седам дана. Због погоршања општег стања, поново је примљен на болничко лечење. Према хетероanamnestичким подацима, имао је пролив последња три дана, а иначе је „одбијао да једе и пије“ и био „стално поспан“. У болницу га је упутила екипа Службе хитне медицинске помоћи због хипотензије и хипергликемије. На пријему болесник је био свестан и бдељив, видљивих слузокожа. Установљене су следеће вредности посматраних параметара: фреквенција откуцаја срца 80/минут, крвни притисак 60/40 mm Hg, гликемија 24,3 mmol/l, број еритроцита у крви $3,54 \times 10^{12}/l$, концентрација хемоглобина 92 g/l, вредност хематокрита 0,297. Болесник је интензивно надгледан и лечен наредних пет дана. Последњег дана пожалио се на горушицу, подригивање и „киселину и печење у грудима“. Стање болесника мало се побољшало после примљене антацидне терапије, али је убрзо након тога дошло до наглог пада крвног притиска, појаве убрзаног и тешког дисања и напрасне смрти болесника.

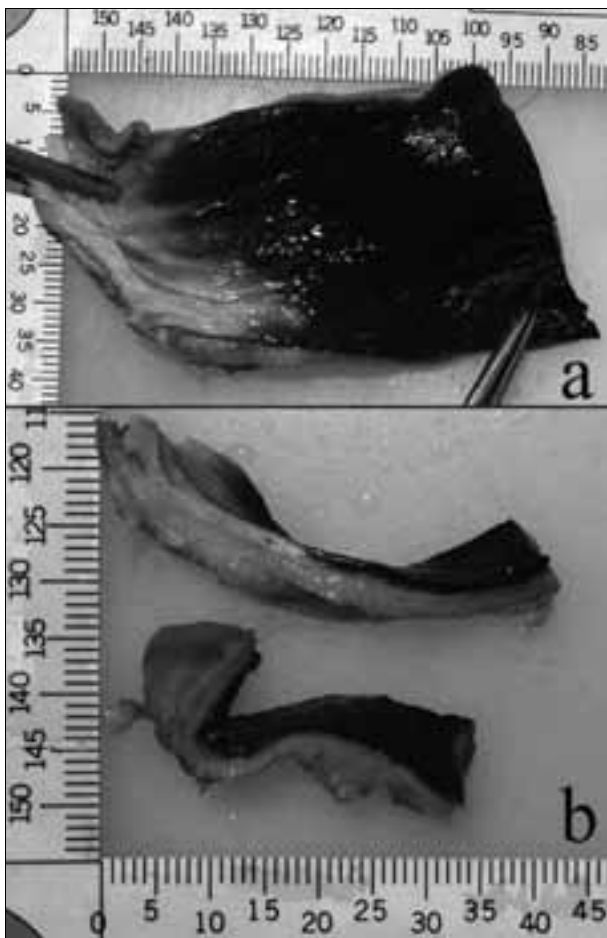
Correspondence to:

Vladimir ŽIVKOVIĆ
Institut za sudsku medicinu
Medicinski fakultet
Deligradska 31a, 11000 Beograd
Srbija
vladinmej@yahoо.com;
vladimir.zivkovic@mfub.bg.ac.rs



Слика 1. Макроскопски изглед уздужно отвореног једњака током обдукције, пресеченог непосредно изнад желуца

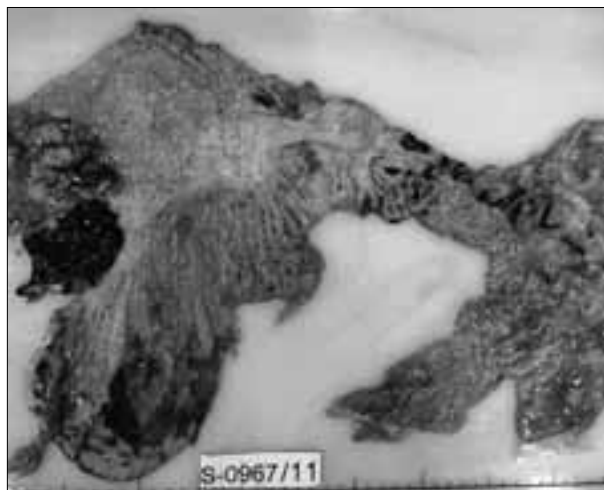
Figure 1. Gross view of the unfixed, native autopsy specimen of longitudinally opened esophagus



Слика 2. Макроскопски изглед споја једњака и желуца после фиксирања у формалину (а); исти препарат исечен уздужно и попречно (б)

Figure 2. Closer macroscopic view of the fixed esophagogastric junction with demarcation black discoloration of the esophageal mucosa (a); longitudinal and cross-section of the same specimen (b)

Следећег дана урађена је клиничка обдукција тела покојника, која је показала да је мушкарац био слабо развијене остеомикулатурне грађе, да је тело покојника било дужине 157 cm и процењене тежине око 55 kg. Спољашњим прегледом тела уочени су стари ожиљак од операције левог кука и декубитус у крсном пределу. Унутрашњим танатолошким прегледом установљени је глиозни ожиљак у пределу десних базалних ганглија и атрофија мозга васкуларног порекла. Утврђене су и генерализоване тешке атеросклеротске промене на свим крвним судовима, а посебно срца, блага



Слика 3. Макроскопски изглед отвореног завршног дела једњака, желуца и дванаестопалачног црева током обдукције

Figure 3. Macroscopic view of the unfixed, native autopsy specimen of the lowest part of esophagus, stomach and duodenum

хипертрофија срчаног мишића, почетна хипостатска пнеумонија, застојне промене у ткиву јетре, бенигна нефросклероза, акутно запаљење слузокоже бешике, тешка сколиоза кичменог стуба и инволутивне старачке промене на свим органима. Обдукцијом је установљена и блеђа зона у горњој трећини међукоморске преграде срца, која је макроскопски одговарала акутном инфаркту миокарда старом неколико дана. Сви органи и ткива били су анемични с танатолошким знацима искрварења.

Обдукцијом је утврђен и тзв. црни једњак – акутно некротизирајуће запаљење слузокоже једњака. Слузокожа целог обима, скоро целом дужином једњака била је једнолично црно пребојена и некротична (Слика 1), с јасном границом у нивоу споја са слузокожом желуца (Слика 2). Слузокоже желуца и дванаестопалачног црева биле су са бројним појединачним и сливеним, мањим и већим акутним гризлицама (Слика 3). У желуцу се налазило око 200 ml течне мрко пребојене крви. Мрко пребојена крв налазила се и у лумену танког и почетног дела дебелог црева, помешана с уобичајеним садржајем црева.

На основу обдукционог налаза и података из медицинске документације, закључено је да је непосредни узрок смрти био велики губитак крви из акутних гризлица желуца и дванаестопалачног црева и акутног некротизирајућег запаљења једњака, те насталих компликација.

ДИСКУСИЈА

Голденберг (Goldenberg) и сарадници [5] први су 1990. године описали акутно некротизирајуће запаљење једњака, тзв. црни једњак, као клиничку појаву. Они су ендоскопским путем видели сливене црне промене у доњим трећинама једњака које су захватале цели обим органа и биле јасно ограничене од нештећене слузокоже желуца на месту споја ова два органа. Ово запаљење

може, али и не мора, да захвати и горњу трећину једњака [6]. Учесталост ове појаве је мала – до 0,2% у обдукционом материјалу [7, 8], а још и мања када су у питању велике клиничке ендоскопске серије – 0,008–0,01% [9, 10, 11]. Најчешће се бележи код старијих мушкараца [8–11], као у нашем приказаном случају.

Клиничка слика обухвата бол у пределу желуца, повраћање, муку, отежано гутање, све до стања обилног, чак смртоносног крварења из горњег дела гастроинтестиналног тракта (хематемеза, мелена), али ова лезија може бити и потпуно асимптоматска [11, 12]. Ова појава је удружена са другим болестима срца, плућа или бубрега, шећерном болешћу, коагулопатијама различитог порекла, чиром желуца, кахексијом, цирозом јетре, алкохолизмом, панкреатитисом, сепсом, исхемијским процесима уопште, укључујући и мождани удар, као и повредама. Клиничким и лабораторијским прегледима све ове болести и стања могу се дијагностиковати, али су најупадљивији и најчешћи кахексија, повишена температура, хипоксија и хемодинамска нестабилност болесника, хипотензија, аритмије, леукоцитоза и анемија [6, 13]. Код нашег болесника су постојале удружене болести (пре свега, шећерна болест и исхемијске промене које га прате), а од лабораторијских налаза најупадљивија је била анемија.

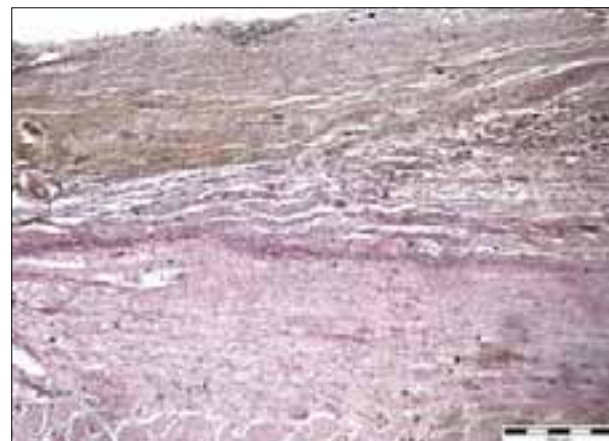
Дијагноза овог запаљења једњака се једино поставља ендоскопским прегледом болесника [6, 13]. Тзв. горњом ендоскопијом види се једнолично црна слузокожа доњих трећина једњака, целим обимом овог органа, с јасном границом према очуваној слузокожи желуца, као у приказаном случају. Током обдукције ове се промене могу видети голим оком врло јасно (Слике 1, 2 и 3), као и то да некроза захвата само слузокожу, али не и дубље слојеве зида једњака (Слика 2). Ређе, уместо да промене захватају једњак целим обимом, оне могу захватити само његове доње делове у виду уздужних мање јасно раздвојених пруга [12]. Понекад је ово стање удружено с акутним ерозивним гастритисом [12], као у нашем приказаном случају. Меланоза и псевдомеланоза једњака, те *acanthosis nigricans* јесу стања која личе на акутни некротизирајући езофагитис [9, 11, 13]. Некроза слузокоже једњака може да настане и као опортунистичка инфекција (*Lactobacillus acidophilus*, *herpes simplex* или *Candida albicans*), али је то ретко [9, 11, 13]. У форензичкој патологији ова лезија личи на промене настале дејством корозивних отрова на слузокожу једњака, али је диференцијална дијагноза ипак увек јасна: код дејства корозива увек је захваћена и слузокожа језика и усне дупље [12].

Код приказаног болесника се није ни посумњало на ову ретку појаву, па није ни урађен ендоскопски преглед горњих делова дигестивног тракта, који би брзо и јасно указао на постојање црног једњака. И поред јасних клиничких и лабораторијских знакова и симптома анемије, очигледно да је изостанак мелене одложио за касније извођење других инвазивнијих дијагностичких метода, укључујући и ендоскопски преглед једњака и желуца. Могуће је да је и опште тешко стање болесника било узрок одлагања ендоскопског прегле-

да. С друге стране, и директни клинички симптоми и знаци постојања црног једњака и губитка крви због тога могли су бити маскирани симптомима и знацима других постојећих болести осталих органа: на пример, печење у грудима и хипотензија због црног једњака и губитка крви могли су се схватити и као знак болести кардиоваскуларног система.

Микроскопски се у овим случајевима види дифузна некроза слузокоже једњака до базалне мембране, с хеморагичним пољима и некротичним епителним ћелијама. У горњим слојевима едематозног субмукозног слоја уочава се демаркациони слој инфламаторних ћелија, и то углавном неутрофилних гранулоцита, с врло мало макрофага. Поред застоја крви, у крвним судовима нема знакова запаљења, нити тромбозе. Дубљи слојеви зида једњака и слузокожа желуца уопште нису захваћени било каквим променама или су захваћени у врло малој мери [9, 12, 13]. Оваква микроскопска слика постојала је и код приказаног болесника (Слика 4). Упадљиво мањи број макрофага у односу на неутрофиле и непостојање хемосидеринских наслага показују да се акутни некротизирајући езофагитис развија између 24 и 72 сата пре смрти у случајевима где је дијагностикован постмортално [12].

Изгледа да је узрок настанка ове некрозе једњака исхемија услед поремећене циркулације у овом органу [9, 11, 12, 13]. Како различите артерије исхрањују различите делове једњака (горњу трећину исхрањују гране доње тиреоидне артерије, средњу трећину гране бронхијалних и интеркосталних артерија и ситни огранци грудног дела аорте, а доњу трећину гране целијачног стабла и леве желудачне артерије), то су инфаркти овога органа врло ретки [13]. Пошто је некрозом захваћен цео једњак, једнолично, мора се претпоставити да је узрок поремећај исхране читавог једњака, односно да је у питању генерализована и пролонгирана хипотензија и следствена исхемија [9, 12, 13]. Изгледа да зато ова некроза обично настаје код старијих људи, особа које већ болују од различитих поремећаја циркулације



Слика 4. Микроскопски изглед зида једњака: некроза горњих слојева слузокоже са демаркационом зоном од запаљењских ћелија према дубљим слојевима

Figure 4. Microscopic aspect of the esophageal wall: full-thickness necrosis of the mucosa sharply demarcated by neutrophilic granulocytes located in the upper layer of submucosa

(нпр. васкулопатија код шећерне болести, као што је у нашем описаном случају, или код болести бубрега) [9]. Не може се искључити ни могућност настанка некрозе услед дејства желудачне киселине на слузокожу једњака (због нпр. изненадне опструкција желуца) [6, 13]. Наравно, могуће је да је у питању и комбинација поремећаја циркулације у једњаку и дејство желудачне киселине на слузокожу овог органа [6, 12, 13]. Смртност је велика [6].

Узрок смрти у овим случајевима обично је акутно унутрашње искрварење и у форензичкој патологији је од интереса као узрок напрасне, незнане и изненадне смрти [14-17]. Ако приликом обдукције нема јасних танатолошких знакова искрварења, онда се може претпоставити да је узрок смрти фатална аритмија услед хиперкалијемije због масивне некрозе ћелија слузокоже једњака [18].

У приказаном случају, поред акутног некротизирајућег запаљења слузокоже једњака, установљене су и бројне акутне гризлице слузокоже желуца и дванаестопалачног црева. Ове су гризлице такође могле да буду извор губитка веће количине крви. Међутим, као и другим случајевима [12], и у нашем појава промена слузокоже једњака с једне стране, и желуца и дванаестопалачног црева с друге, могла је да буде случајност: акутни улкуси слузокоже желуца и дванаестопалачног

црева могли су да буду само терминалне, агоналне лезије настале услед тешке хиповолемије због искрварења због запаљења једњака. Ова је дилема, међутим, само академске природе. Акутни инфаркт миокарда код приказаног болесника може се прихватити као компликација губитка веће количине крви: исхемија у миокарду развија се истовремено са запаљењем једњака, на шта указује и његова макроскопски процењена старост од неколико дана. Настанак исхемије у миокарду, наравно, био је олакшан и постојањем тешких атеросклеротских промена на коронарним артеријама насталим у склопу шећерне болести.

Приказан је случај с акутним некротизирајућим запаљењем једњака, тзв. црним једњаком, променом која се врло ретко среће у форензичкој патологији. Овај феномен треба препознати током обдукције и довести га у везу како с узроком смрти, тако и с удруженим болестима других органа које ово запаљење једњака прате или олакшавају његову појаву.

НАПОМЕНА

Рад је реализован у оквиру пројекта бр. 45005 Министарства просвете, науке и технолошког развоја Републике Србије.

ЛИТЕРАТУРА

1. Saukko P, Knight B. Knight's Forensic Pathology. 3rd ed. London: Arnold; 2008.
2. Di Maio VJ, Di Maio D. Forensic Pathology. 2nd ed. Boca Raton: CRC Press; 2001.
3. Spitz WU. Spitz and Fisher's Medicolegal Investigation of Death: Guidelines for the Application of Pathology to Crime Investigation. 4th ed. Springfield Illinois: Charles C. Thomas – Publisher; 2006.
4. Byard RW. Esophageal causes of sudden and unexpected death. J Forensic Sci. 2006; 51:390-5.
5. Goldenberg SP, Wain SL, Marignani P. Acute necrotizing esophagitis. Gastroenterology. 1990; 98:493-6.
6. Gurvits GE, Shapsis A, Lau N, Gualtieri N, Robilotti JG. Acute esophageal necrosis: a rare syndrome. J Gastroenterol. 2007; 42:29-38.
7. Postlethwait RW, Musser AW. Changes in the esophagus in 1,000 autopsy specimens. J Thorac Cardiovasc Surg. 1974; 68:953-6.
8. Etienne JP, Roge J, Delavierre P, Veyssier P. Esophageal necrosis of vascular origin. Semin Hop Paris. 1969; 45:1599-606.
9. Grudell ABM, Mueller PS, Viggiano TR. Black esophagus: report of six cases and review of the literature, 1963-2003. Dis Esophagus. 2006; 19:105-10.
10. Moretó M, Ojembarrena E, Zaballa M, Tánago JG, Ibáñez S. Idiopathic acute esophageal necrosis: not necessarily a terminal event. Endoscopy. 1993; 25:534-8.
11. Ben Soussan E, Sovoye G, Hochain P. Acute esophageal necrosis: a 1-year prospective study. Gastrointest Endosc. 2002; 56:213-7.
12. Tsokos M, Herbst H. Black oesophagus: a rare disorder with potentially fatal outcome. A forensic pathological approach based on five autopsy case. Int J Legal Med. 2005; 119:146-52.
13. Gurvits GE. Black esophagus: Acute esophageal necrosis syndrome. World J Gastroenterol. 2010; 16:3219-25.
14. Lacy BE, Toor A, Bensen SP, Rothstein RI, Maheshwari Y. Acute esophageal necrosis: report of two cases and a review of the literature. Gastrointest Endosc. 1999; 49:527-32.
15. Altenburger DL, Wagner AS, Li S, Garavaglia J. A case of black esophagus with histopathologic description and characterization. Arch Pathol Lab Med. 2011; 135:797-8.
16. Tsokos M. Black esophagus. Forensic Sci Med Pathol. 2011; 7:374-6.
17. Unumaa K, Harada K, Funakoshi T, Uemura K. Sudden death of an alcoholic elderly man with acute esophageal necrosis (black esophagus). Forensic Sci Int. 2011; 212:e15-7.
18. Venara A, Pavageau AH, Maillart CR, Jousset N. Sudden death due to black esophagus. Am J Forensic Med Pathol. 2013; 34(1):16-7.

Black Esophagus – Case Report

Slobodan Nikolić, Vladimir Živković

Institute of Forensic Medicine, Faculty of Medicine, University of Belgrade, Belgrade, Serbia

SUMMARY

Introduction Diseases of the gastrointestinal system, and especially diseases of esophagus, are a rare cause of sudden unexpected death in any age group. Black esophagus is an acute necrotizing inflammation of the mucosa of the lower parts of esophagus, diffusely affecting its entire circumference. This inflammation could be a source of profuse bleeding and cause sudden unexpected death.

Case Outline A case of 76-year-old male was presented herein. He has been treated for hypertension and diabetes for several years. As a consequence of stroke, which happened several

months prior to death, he had been hemiplegic and immobilized. He died in hospital, suddenly and unexpectedly. The autopsy showed the acute necrotizing esophagitis, as well as the acute gastric and duodenal erosions of mucosa. These were the causes of fatal blood loss.

Conclusion Acute necrotizing esophagitis should be recognized during autopsy and related to the immediate cause of death as well as to concomitant diseases of other organs, which either potentiate or facilitate presentation of this disease.

Keywords: black esophagus; acute necrotizing esophagitis; gastrointestinal hemorrhage; sudden death; autopsy

Примљен • Received: 20/12/2012

Прихваћен • Accepted: 03/07/2013

Примена ваздушне абразије у стоматологији

Зоран Мандинић, Зоран Р. Вулићевић, Милош Белоица, Ивана Радовић, Јелена Мандић, Момир Царевић, Јасмина Текић

Клиника за децу и превентивну стоматологију, Стоматолошки факултет, Универзитет у Београду, Београд, Србија

КРАТАК САДРЖАЈ

Један од основних циљева савремене стоматологије јесте очување здравог зубног ткива применом превентивних метода и техника неинвазивног лечења. Ваздушна абразија је минимално инвазивна техника препарације кавитета која користи кинетичку енергију за уклањање каријеса. Усперавање праволинијског млаза честица алуминијум-оксида на површину зуба која се обрађује доводи до абразије супстрата без топлоте, вибрација и звука. Фактори који утичу на брзину препарације укључују интензитет ваздушног притиска, величину честица абразива, брзину протока честица, пречник врха каниле, величину угла каниле и удаљеност врха каниле од површине зуба која се обрађује. Њена употреба се саветује у дијагностици ране каријесне лезије gleђи на оклузалним површинама зуба и минималној препарацији кавитета. Поједини аутори препоручују и употребу оптичких помагала. Предности технике ваздушне абразије укључују смањење буке, вибрација и оперативне осетљивости, која је веома субјективна и променљива код пацијената. Кавитети препарисани ваздушном абразијом имају заобљене ивице, за разлику од кавитета препарисаних стандардним техникама. То може повећати дуготрајност постављених испуна, јер се смањује могућност настанка њиховог одламања, неутралисањем сила унутрашњег напона у поређењу са стресом који се јавља код ангуларних препарација. Примена технике ваздушне абразије је контраиндикована код особа алергичних на прашину, оболелих од астме или хроничне опструктивне болести плућа, пацијената са постекстракционим ранама, пародонтопатијом, ортодонтским апаратима или дубоким каријесом, јер се овом техником препарације не одстрањује успешно мекана дентинска структура. Многа ова стања повећавају ризик од настанка ваздушне емболије у неким оралним ткивима. Контрола расејања честица абразива представља изазов клиничком стоматологу, а захтева и примену кофердама, јакних аспиратора, заштитних маски и заштитних наочара како код пацијента, тако и код терапеута.

Кључне речи: ваздушна абразија; препарација кавитета; минимално инвазивна стоматологија

УВОД

Један од основних циљева савремене стоматологије јесте очување здравог зубног ткива применом превентивних метода, односно употребе флуорида и техника неинвазивног лечења [1-4]. Како је терапијски захват на тврдим зубним ткивима неопходан због постојања каријеса, као алтернатива традиционалним методама лечења развила се клиничка стоматологија која уз посебне вештине терапеута и примену нових метода лечења може обликовати минимално инвазивне кавитете [5, 6]. Циљ минимално инвазивне стоматологије јесте тачна дијагностика каријесне лезије која може нарушити орално здравље човека, а затим и заустављање развоја, односно уклањање каријеса уз што мање залажење у здраво зубно ткиво [7]. Хируршке технике које подразумевају минимално инвазивну препарацију кавитета најчешће су оне које се могу изводити помоћу високотуражних насадних инструмената с малим сврдлима, ласера и ваздушне абразије [8]. Ваздушна абразија представља пренос кинетичке енергије праволинијског кретања млаза честица абразива алуминијум-оксида (Al_2O_3) на површину зуба која се обрађује. Систем омогућава ефикасно укла-

њање пигментација и препарацију чврстих зубних ткива (често без анестезије) и без топлоте, вибрација и буке, па је погодан за веома мале и превентивне препарације кавитета [9-14].

ИСТОРИЈАТ ВАЗДУШНЕ АБРАЗИЈЕ

Класичан начин уклањања каријесног ткива подразумева употребу ротирајућег сврдла или ручних инструмената (нпр. екскаватора). Данашња становишта у стоматологији подразумевају што мању трауму уз што веће очување здравих зубних ткива, како у дијагностиковању, тако и у лечењу оболелих зуба [15, 16]. Захваљујући бољем разумевању етиологије и могућности превенције каријеса, као и развоју савремених стоматолошких материјала који успостављају адхезивну, микромеханичку, односно хемијску везу са зубним ткивима, ствара се могућност уштеде зубне супстанце. У лечењу каријеса су последњих деценија уведени разни терапијски поступци чији је циљ да се постигне ефикасно и селективно уклањање каријесног ткива, а да при том примењена метода буде пријатнија за пацијенте [17]. Нове могућности, поред ултразвука, полимерних

Correspondence to:

Zoran MANDINIĆ
Klinika za dečju i preventivnu
stomatologiju
Stomatološki fakultet
Univerzitet u Beogradu
Dr Subotića 11, 11000 Beograd
Srbija
zoran.mandinic@stomf.bg.ac.rs



Слика 1. Апарат за ваздушну абразију EMS⁺ (AIR-FLOW[®] K1 MAX)
Figure 1. Device for air abrasion EMS⁺ (AIR-FLOW[®] K1 MAX)

борера, ензима, система за хемијско-механичко уклањање каријеса и ласера, обухватају и примену ваздушне абразије и ваздушног полирања (Слика 1) [18].

Обрада зубних ткива ваздушном абразијом почела је да се примењује средином четрдесетих година двадесетог века, када је ову методу описао Роберт Блек (Robert Black) [13, 19, 20]. Блек је био свестан чињенице да она неће истиснути употребу класичних ротирајућих насадних инструмената, те је његов почетни циљ био да установи могућности ваздушне абразије као могуће хируршке технике у уклањању каријеса [13, 19]. Та техника је постала врло брзо веома популарна. Међутим, убрзо након почетка њене примене показали су се недостаци, који су преваходно били везани за врсту материјала који се најчешће користио за израду кончаног испуна и недовољно ефикасну могућност уклањања честица праха које су се несметано расејавале по усној дупљи. Препарација кавитета ваздушном абразијом није била у складу с тадашњим потребним клиничким протоколима, какве је у то време захтевала најчешће коришћена врста препарације за амалгамски испун с јасно дефинисаним зидовима и рубовима кавитета [21]. Због бројних клиничких проблема, као што су лошија контрола тока процеса рада, заступљености честица у аеролу и могућности њихове аспирације од стране пацијента или терапеута, те опасности по околна мека ткива, та метода се није шире примењивала. Међутим, технолошки напредак у обради абразивних честица и појава алтернативних биотолерантних абразива, односно честица натријум-бикарбоната (NaHCO_3), опреме за ваздушну абразију и помоћних система, првенствено заштитних, омогућили су да она стекне већу употребну вредност као минимално инвазивна метода препарације кавитета [22, 23].

ОСНОВЕ ТЕХНИКЕ ВАЗДУШНЕ АБРАЗИЈЕ

Обрада каријесне лезије се дуже од једног века обавља помоћу машинских ротирајућих инструмената,

који обезбеђују брз и прецизан третман [22]. Током самог поступка уклањања каријеса конвенционалним методама развијају се висока температура, притисак и вибрације, што је потенцијална опасност од оштећења зубне пулпе [23]. Поред тога, уклањање каријеса овим техникама доводи до болних реакција и захтева примену локалних анестетика, што је често основни разлог због којег велики број пацијената има одбојност према стоматолошким интервенцијама.

Усмеравање праволинијског млаза честица абразива на површину зуба која се обрађује доводи до абразије супстрата без топлоте, вибрација и звука. Размекшани каријесни дентин спорије се уклања, јер се део енергије губи на савладавање отпорности мекшег материјала [9]. Истраживања показују да је у експерименталним условима постигано селективно уклањање каријеса променом притиска при раду и величине и тврдоће честица, док је метода у клиничким условима испољила мању ефикасност [14].

Резултати новијих истраживања показују да би примена честица NaHCO_3 , односно биоактивног стакла, које су мекше од честица Al_2O_3 , могла обезбедити селективније уклањање ткива измењених каријесом, док би здрава ткива остала непромењена [9, 20, 24, 25, 26].

Биоактивно стакло увели су Хенч (Hench) и сарадници [27] 1972. године. Реакцијом биоактивног стакла с воденим раствором настају хемијске и структурне промене у формирању површинског хидроксикарбонатног апатитног слоја. Поред тога, биоактивно стакло се у усној дупљи користи и као материјал за коштани калем (енгл. *bone graft*). Он је значајно мекши од честица Al_2O_3 , са тврдоћом од око 420 KHN (*Knoop Hardness Number*) у поређењу са 21000 KHN за Al_2O_3 , и на тај начин обезбеђује потенцијал за селективно уклањање меканијег супстрата, док оставља тврђе, хистолошки непромењено здраво ткиво [24, 25, 26].

Успешност уклањања зубне супстанце може бити мања или већа с обзиром на тврдоћу ткива или материјала који одстрањује ткиво, као и осталих оперативних параметара самог уређаја:

- врсте и величине честица абразива – најчешће (Al_2O_3 ; α -алумина) с просечном величином 27,5–50 μm ;
- облика и тврдоће честица (честице већих димензија производе већу кинетичку енергију);
- млаза ваздуха и воде – притисак 40–140 *psi* (енгл. *pounds per square inch pressure*), где је 15 *psi* приближно 1 бар;
- угла под којим се делује на површину, 40–120°;
- удаљености од површине која се обрађује (постојање од врха каниле до 2 *mm* од супстрата обезбеђује оптималну ефикасност млаза абразивних честица);
- дужине деловања; и
- врсте супстрата на који се делује [28–36].

Данас на тржишту постоји много уређаја за ваздушну абразију, међу којима су: RONDOflex Plus KaVo, PrepStart Air Abrasion Unit/Dentalcompare, Aquacut Quattro Air Abrasion System/Velopex, KCP-1000 Air Abrasion Unit A.D.T. и др.

КЛИНИЧКА ПРИМЕНА

Техника ваздушне абразије може да се користи у дијагностици раног оклузалног каријеса у пределу јамца и фисуре и његовом лечењу применом минималне препарације кавитета (Слике 2, 3 и 4) [14, 29, 37]. Усмеравањем млаза абразивних честица широког око 500 μm на дно јамце или фисуре долази до незнатног проширења зидова фисуре, што је изузетно клинички значајно за дијагностиковање почетне каријесне лезије глеђи [10]. Такође се саветује коришћење технике ваздушне абразије у препарацији кавитета IV и V класе без употребе локалне анестезије [6]. Препарација кавитета II и III класе може да се врши техником ваздушне абразије уз неопходну заштиту суседних зуба, како би се избегло њихово оштећење абразивним дејством честица [6]. Коначна рестаурација кавитета препарисаних ваздушном абразијом се постиже употребом композитних, односно естетских материјала [38, 39, 40].

Предности ваздушне абразије су смањење звучних сензација, вибрација и претеране осетљивости. Кавитет препарисан ваздушном абразијом има заобљене ивице, које одговарају адхезивном облику кавитета, и храпаве површине, које повећавају укупну површину кавитета, чиме се стварају идеални услови за примену савремених адхезивних рестауративних материјала, за разлику од кавитета препарисаних конвенционалним техникама (оштре ивице) [41]. То може повећати дуготрајност постављеног адхезивног композитног или испуна од гласјономер-цемента, имајући у виду да се на тај начин смањује стрес унутар самог испуна у поређењу са стресом присутним у ангуларним препарацијама [29].

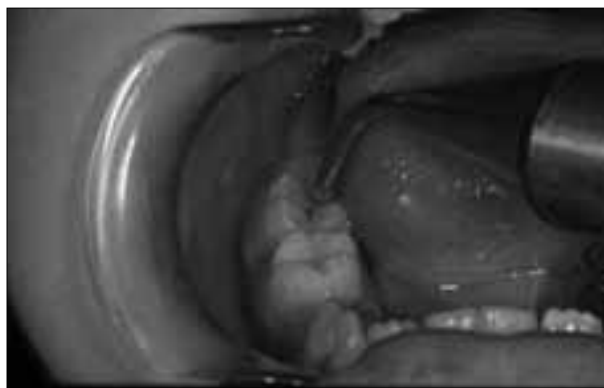
Скенинг електронска микроскопија (СЕМ) показује правилне ивице кавитета код обраде кавитета ротирајућим инструментима и ултразвуком, док се код обраде ваздушном абразијом примећује много већа површина кавитета кратерастог облика (Слике 5–7) [16]. Овакав облик кавитета несумњиво утиче на дужину трајања постављених испуна, јер се смањује могућност њиховог одламања неутралисањем сила унутрашњег напона [29, 42].

Примена технике ваздушне абразије се препоручује у дечјој стоматологији као техника избора код деце која нису навикнута на употребу традиционалних ротирајућих инструмената уз изостанак психолошке трауме [43]. Такође је њена употреба оправдана код особа код којих је примена локалне анестезије контраиндикована због поремећеног општег здравственог стања, као и осталих пацијената код којих постоји страх од стоматолошких интервенција [44].

Ваздушно полирање је нешто блажи облик ваздушне абразије [18]. Водено-ваздушна струја обезбеђује покретање честица NaHCO_3 са додатком честица трикалцијум-фосфата ($\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$). Метода се углавном примењује за уклањање меких наслага и пигментација с површине зуба. Нежељена дејства ове технике могу бити уклањање дентина, цемента, па чак и глеђи,



Слика 2. Каријес локализован у мезијалном делу фисуре зуба 47
Figure 2. Dental caries in the mesial part of the fissure of tooth 47



Слика 3. Минимална препарација кавитета техником ваздушне абразије
Figure 3. Minimal cavity preparation technique by air abrasion

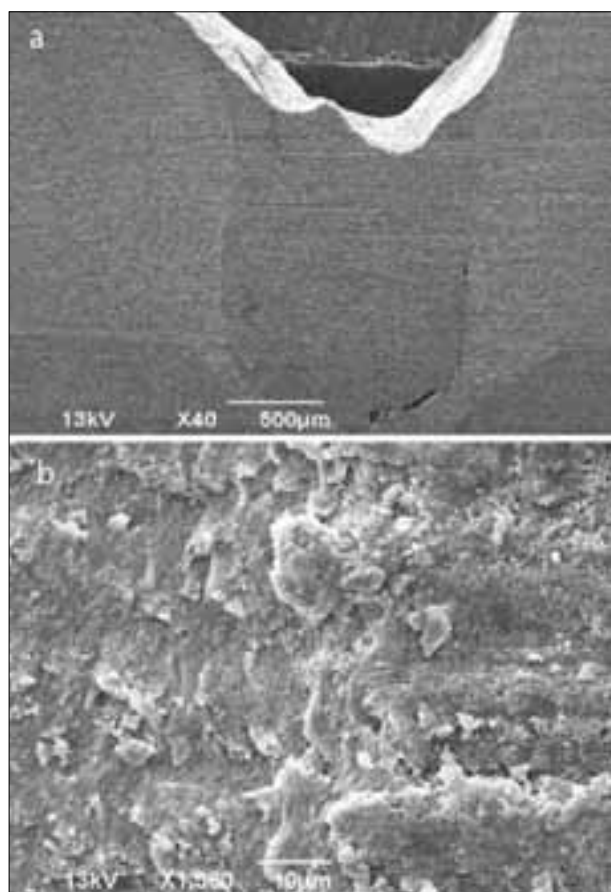


Слика 4. Коначан изглед препарисаног кавитета техником ваздушне абразије на оклузалној површини зуба 47
Figure 4. Final appearance of the prepared cavity by air abrasion technique on the occlusal surface of tooth 47

ђи, док поједини клинички стоматолози препоручују пажљиво коришћење система за ваздушно полирање за уклањање каријесно промењеног дентина на крају препарације кавитета [19, 20].

Индикације за примену ваздушне абразије су следећи спектар клиничких поступака:

- уклањање наслага из фисуре и површинских препарација за постављање заливаца;
- уклањање површинских оштећења глеђи;
- минимална оклузална препарација кавитета;

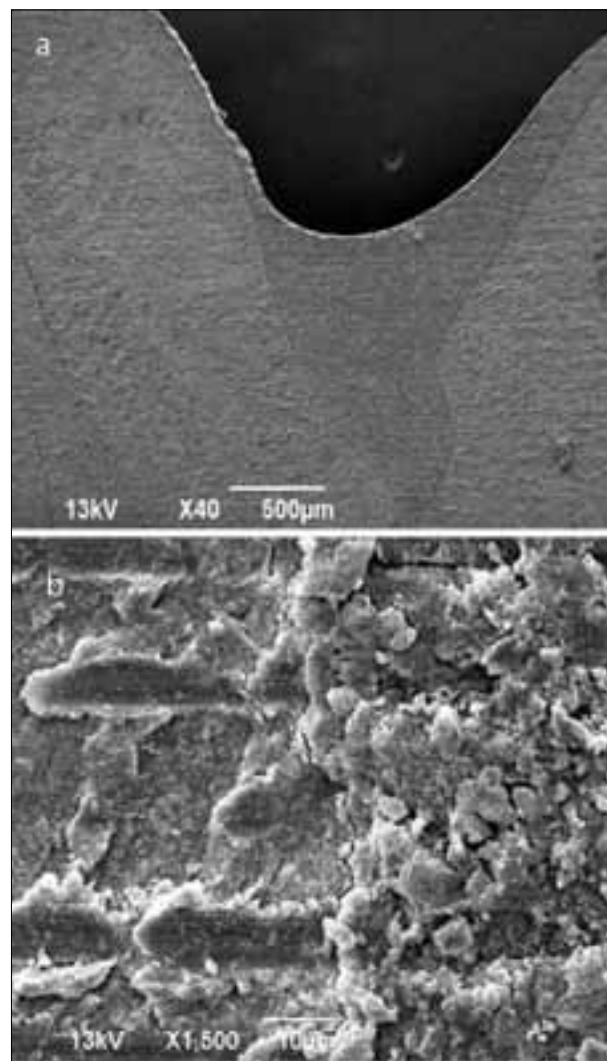


Слика 5a,b. СЕМ споја композита и глеђи кавитета препарисаног конвенционалном техником: а) увећање $\times 40$; б) увећање $\times 1,500$
Figure 5a,b. SEM of the composite-enamel interface in the cavity prepared by conventional technique: a) magnification $\times 40$; b) magnification $\times 1,500$

- уклањање и реконструкција композитних, гласјо-номер-цементних и порцеланских рестаурација;
- мале препарације кавитета од прве до пете класе;
- препарација површина зуба које су последица не-каријесних лезија;
- уклањање површинских пигментација глеђи из јамица и фисура пре постављања композита и других рестауративних или протетичких материјала;
- препарација зуба за цементирање или поновну адхезију [45].

КЛИНИЧКА ОГРАНИЧЕЊА

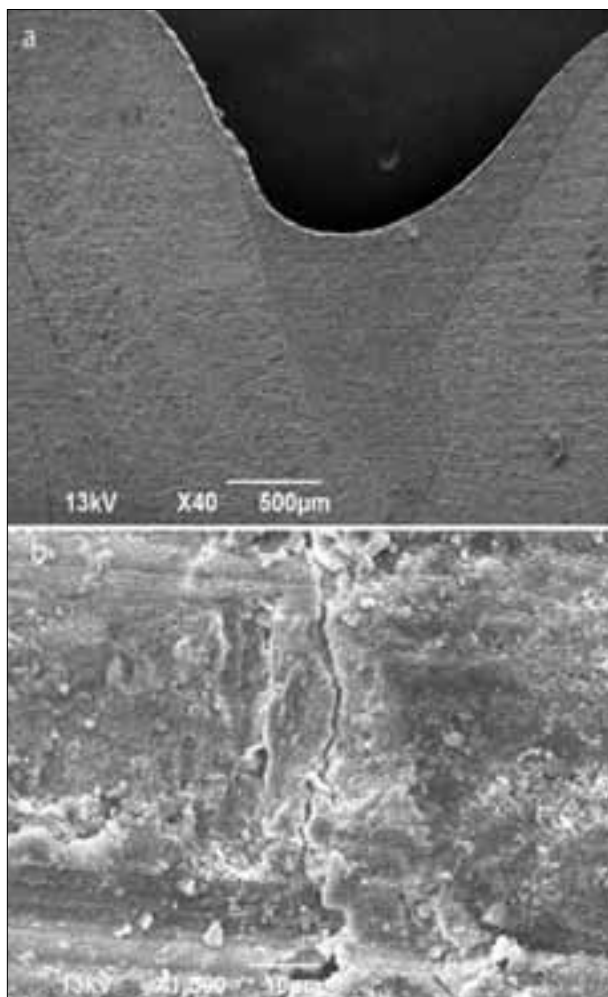
Ваздушна абразија је хируршка техника која има и извесна клиничка ограничења, која се, пре свега, односе на општу медицинску дијагнозу пацијента. Контраиндикивана је код пацијената који су алергични на прашину, код оболелих од астме и хроничне опструктивне болести плућа, особа недавно подвргнутих екстракцији зуба или другим оралнохируршким интервенцијама, код пацијената с отвореним ранама, пародонтопатијом, недавно постављеним ортодонтским апаратом или уклоњеним дубоким каријесом, јер не одстрањује довољно мекану дентинску структуру [5, 6]. Истовремено, многа од ових стања повећавају ри-



Слика 6a,b. СЕМ споја композита и глеђи кавитета препарисаног техником ваздушне абразије: а) увећање $\times 40$; б) увећање $\times 1,500$
Figure 6a,b. SEM of the composite-enamel interface in the cavity prepared by air abrasion: a) magnification $\times 40$; b) magnification $\times 1,500$

зик од настанка ваздушне емболије у неким оралним ткивима [8]. Стога је контрола расејања честица абразива изазов клиничком стоматологу, а захтева и употребу кофердама, јакних аспиратора, заштитних маски и заштитних наочара како код пацијента, тако и код терапеута [46]. Такође, ова техника препарације кавитета није довољно ефикасна ни за уклањање великих амалгамских испуна, јер такве захвате прати опасност од ослобађања живе при абразији [47]. Ваздушна абразија обликује заобљене рубове кавитета и због тога није погодна за рестауративне препарације које су неопходне за конвенционалне материјале – амалгаме и златне рестаурације, те композитне и порцеланске инлеје [47, 48].

Употребом ротирајућих инструмената и конвенционалних техника препарације, стоматолози поседују тактилни осећај екстензије препарације, заснован на дужини самог сврдла и притиска врха радног дела инструмента на површину ткива која се обрађује. Овакав вид „самоконтроле“ не постоји код примене технике ваздушне абразије, што ову технику препарације кави-



Слика 7a,b. СЕМ споја композита и глеђи кавитета препарисаног техником ултразвука: а) увећање $\times 40$; б) увећање $\times 1.500$

Figure 7a,b. SEM of the composite-enamel interface in the cavity prepared by ultrasound: a) magnification $\times 40$; b) magnification $\times 1,500$

тета чини посебно осетљивом, с могућношћу настанка прекомерног третмана, и захтева претходну обуку клиничког стоматолога и употребу оптичких помагала [25, 26, 29, 33].

Клиничка ограничења ваздушне абразије огледају се у следећем:

- не може се применити на све пацијенте;
- није применљива код опсежних каријесних лезија;

- није довољно ефикасна при уклањању великих амалгамских испуна;
- постоји ризик од ваздушне емболије;
- не користи се за уклањање великих златних, полу-племенитих и неплеменитих металних рестаурација [45].

ЗАКЉУЧАК

Као неконвенционална техника препарације кавитета, ваздушна абразија има своје место у савременој минимално инвазивној стоматологији. Нема сумње да ће ваздушна абразија бити метода упамћена по великом напретку клиничке стоматологије, која се удаљава од традиционалних метода лечења каријеса. Смањење инциденције каријеса, примена препарата с флуоридима и препарата за реминерализацију почетних лезија глеђи, уклањање искључиво каријесно промењеног зубног ткива и коначно херметичко затварање кавитета, као и превентивни и интерцептивни захвати, јесу методе којима данашњи клинички стоматолози треба да се усмеравају. Велико задовољство стоматолога које произлази из осећаја да чини управо оно што је најбоље за пацијента, уз изостанак страха од третмана, један је од разлога који их наводи да ваздушну абразију уведу као методу рада у свакодневној стоматолошкој пракси.

Ваздушна абразија је у оквиру минимално инвазивне стоматологије отворила нову страницу у начину лечења пацијената, јер се овом методом може сачувати далеко више здраве зубне супстанце него уобичајеним техникама. Третман траје краће, безболан је и врши се без примене локалне анестезије. Ова метода нуди и високу естетику, јер може значајно квалитетније да припреми површину препарације за адхезивне технике које су неопходне за примену савремених естетских материјала.

НАПОМЕНА

Рад је финансиран средствима с пројекта број 46009 Министарства просвете, науке и технолошког развоја Републике Србије.

ЛИТЕРАТУРА

- Dawson AS, Makinson OF. Dental treatment and dental health. Part 2. An alternative philosophy and some new treatment modalities in operative dentistry. *Aust Dent J.* 1992; 37(3):205-10.
- Anderson MH. Air abrasion in an era of declining caries. *Compend Contin Educ Dent.* 2001; 22(11A):1040-3.
- Mandinic Z, Curcic M, Antonijevic B, Lekic CP, Carevic M. Relationship between fluoride intake in Serbian children living in two areas with different natural levels of fluorides and occurrence of dental fluorosis. *Food Chem Toxicol.* 2009; 47:1080-4.
- Mandinic Z, Curcic M, Antonijevic B, Carevic M, Mandic J, Djukic-Cosic D, et al. Fluoride in drinking water and dental fluorosis. *Sci Total Environ.* 2010; 408:3507-12.
- Kutch VK. Microdentistry: a new standard of care. *J Mass Dent Soc.* 1999; 47(4):35-9.
- Ricketts DN, Pitts NB. Novel operative treatment options. *Monogr Oral Sci.* 2009; 21:174-87.
- Beloica M, Mandinic Z, Vulićević ZR. Led aparati za inicijaciju polimerizacije kompozitnih materijala. *Stomatolog.* 2010; 4:42-6.
- Reyto R. Lasers and air abrasion. New modalities for tooth preparation. *Dent Clin North Am.* 2001; 45(1):189-206.
- Banerjee A, Kidd EAM, Watson TF. In vitro evaluation of five alternative methods of carious dentine excavation. *Caries Res.* 2000; 34:144-50.
- Banerjee A, Watson TF, Kidd EAM. Dentine caries excavation: a review of current clinical techniques. *Br Dent J.* 2000; 188:476-82.
- Banerjee A, Watson TF. Air abrasion – its uses and abuses. *Dental Update.* 2002; 29:340-6.
- Berry EA, Eakle WS, Summitt JB. Air abrasion: an old technology reborn. *Compend Contin Educ Dent.* 1999; 20:751-64.

13. Black RB. Air abrasion: some fundamentals. *J Am Dent Assoc.* 1950; 41:701-10.
14. Laurell KA, Hess JA. Scanning electron micrographic effects of air-abrasion cavity preparation on human enamel and dentin. *Operat Dent.* 1995; 26:139-44.
15. Tekić J. Dijagnostika rizika za pojavu karijesa kod trudnica. *Stomatološki glasnik Srbije.* 2004; 51:188-93.
16. Živojinović V, Vulićević ZR. Minimalno invazivna terapija karijesa. In: Beloica D, Vulićević ZR, editors. *Dečja stomatologija – praktikum.* Beograd: Stomatološki fakultet Univerziteta u Beogradu; 2010. p.78-82.
17. Vulićević ZR, Mandinić Z. Mikroabrazija. In: Kobašljica S. i sar., editors. *Minimalno invazivna terapija.* Sarajevo: Dobra knjiga; 2012. p.289-96.
18. White JM. Ablation rate, caries removal and restoration using Nd:YAG and Er:YAG lasers and air abrasion. In: Featherstone JDB, Rechman P, Fried DS, editors. *Lasers in Dentistry IV. Proc SPIE.* 1998; 3248:98-112.
19. Black RB. Technic for non-mechanical preparations of cavities and prophylaxis. *J Am Dent Assoc.* 1945; 32:955-65.
20. Banerjee A, Kidd EAM, Watson TF. Scanning electron microscopic observations of human dentine after mechanical caries excavation. *J Dent.* 2000; 28:179-86.
21. Wolff MS, Allen K, Kaim J. A 100-year journey from GV Black to minimal surgical intervention. *Compend Contin Educ Dent.* 2007; 28(3):130-4.
22. Vulićević ZR, Beloica M. Minimalne invazivne preparacije kaviteta rotirajućim instrumentima. In: Kobašljica S. i sar., editors. *Minimalno invazivna terapija.* Sarajevo: Dobra knjiga; 2012. p.369-77.
23. Vulićević ZR, Kobašljica S. Preparacije kaviteta ultrazvučnim aparatima. In: Kobašljica S. i sar., editors. *Minimalno invazivna terapija.* Sarajevo: Dobra knjiga; 2012. p.333-40.
24. Banerjee A, Paolinelis G, Socker M, Watson TF, McDonald F. An in vitro investigation of the effectiveness of bioactive glass air-abrasion in the 'selective' removal of orthodontic resin adhesive. *Eur J Oral Sci.* 2008; 116:488-92.
25. Banerjee A, Thompson ID, Watson TF. Minimally invasive caries removal using bio-active glass air-abrasion. *J Dent.* 2011; 39(2):2-7.
26. Banerjee A, Watson TF. *Pickard's Manual of Operative Dentistry.* 9th ed. Oxford, UK: Oxford University Press; 2011.
27. Hench LL, Splinter RJ, Allen WC, Greenlee TK. Bonding mechanisms at the interface of ceramic prosthetic materials. *Journal of Biomedical Materials Research.* 1971; 2:117-41.
28. Bryant CL. The role of air abrasion in preventing and treating early pit and fissure caries. *J Can Dent Assoc.* 1999; 65:566-9.
29. Friedman MJ, Mora AF, Schmidt R. Microscope-assisted precision dentistry. *Compendium.* 1999; 20:723-37.
30. Santos-Pinto L, Peruchi C, Markel VA, Cordeiro R. Effect of handpiece tip design on the cutting efficiency of an air abrasion system. *Am J Dent.* 2001; 14:398-401.
31. Peruchi C, Santos-Pinto L, Santos-Pinto A, Barbarosa e Silva E. Evaluation of cutting parameters produced in primary teeth by an air-abrasion system. *Quintessence Int.* 2002; 33:279-83.
32. Paolinelis G, Banerjee A, Watson TF. Microhardness as a predictor of sound and carious dentine removal using alumina airabrasion. *Caries Res.* 2006; 40:292-95.
33. Banerjee A, Uddin MS, Paolinelis G, Watson TF. An in vitro investigation of the effect of the powder reservoir volume on the consistency of alumina powder flow rates in dental air-abrasion devices. *J Dent.* 2008; 36:224-7.
34. Paolinelis G, Banerjee A, Watson TF. An in-vitro investigation of the effects of variable operating parameters on alumina air-abrasion cutting characteristics. *Oper Dent.* 2009; 34:87-92.
35. Honda K, Kinoshita N, Abe T, Hasegawa M, Shimizu A. Efficacy of a new jet nozzle for removal of carious dentin with an air abrasion system. *Dent Mater J.* 2008; 27(6):835-41.
36. Matusuki C, Lima LM, Bronzi ES, Spolidorio DM, Santos-Pinto L. The effectiveness of alumina powder on carious dentin removal. *Oper Dent.* 2006; 31(3):371-6.
37. Mandić J. Procesi demineralizacije u formiranju i remineralizacije u zaustavljenju početne karijesne lezije. In: Kobašljica S. i sar., editors. *Minimalno invazivna terapija.* Sarajevo: Dobra knjiga; 2012. p.137-54.
38. Vulićević ZR, Mandinić Z. Sredstva za kondicioniranje površine zuba. In: Vulićević ZR, editor. *Klinička primena materijala u dečjoj stomatologiji.* Beograd: Beobook; 2010. p.433-64.
39. Christensen RP, Christensen GJ. Air abrasion, for caries removal. *Clinical Research Associates Newsletter.* 1996; 20:3-4.
40. Tay FR, Frankenberger R, Carvalho RM, Pashley DH. Pit and fissure sealing. Bonding of bulk cured, low filled, light-curing resins to bacteria contaminated uncut enamel in high c-factor cavities. *Am J Dent.* 2005; 18:28-36.
41. De Almeida Neves A, Continho E, Cardoso MV, Lambrechts P, Van Meerbeek B. Current concepts and techniques for caries excavation and adhesion to residual dentin. *J Adhes Dent.* 2011; 13(1):7-22.
42. Vulićević ZR, Mandinić Z. Kompozitni cementi. In: Vulićević ZR, editor. *Klinička primena materijala u dečjoj stomatologiji.* Beograd: Beobook; 2010. p.185-203.
43. Carević M, Vulović M, Šindolić M. Integrated approach in combating early childhood caries. *Balk J Stom.* 2009; 13:15-20.
44. Mount GJ, Ngo H. Minimal intervention: early lesions. *Quintessence Int.* 2000; 31:535-46.
45. Čuković-Bagić I, Jurić H. Vazдушna abrazija. In: Kobašljica S. i sar., editors. *Minimalno invazivna terapija.* Sarajevo: Dobra knjiga; 2012. p.297-313.
46. Vulićević ZR, Medić M. Pomoćna optička sredstva. In: Kobašljica S. i sar., editors. *Minimalno invazivna terapija.* Sarajevo: Dobra knjiga; 2012. p.239-56.
47. Radović I, Beloica M. Materijali u minimalno invazivnoj stomatologiji. In: Kobašljica S. i sar., editors. *Minimalno invazivna terapija.* Sarajevo: Dobra knjiga; 2012. p.379-408.
48. Malmstroem HS, Chaves Y, Moss ME. Patient preference: conventional rotary handpieces or air abrasion for cavity preparation. *Oper Dent.* 2003; 28(6):667-71.

The Application of Air Abrasion in Dentistry

Zoran Mandinić, Zoran R. Vulićević, Miloš Beloica, Ivana Radović, Jelena Mandić, Momir Carević, Jasmina Tekić

Clinic for Pediatric and Preventive Dentistry, Faculty of Dental Medicine, University of Belgrade, Belgrade, Serbia

SUMMARY

One of the main objectives of contemporary dentistry is to preserve healthy tooth structure by applying techniques of noninvasive treatment. Air abrasion is a minimally invasive non-mechanical technique of tooth preparation that uses kinetic energy to remove carious tooth structure. A powerful narrow stream of moving aluminum-oxide particles hit the tooth surface and they abrade it without heat, vibration or noise. Variables that affect speed of cutting include air pressure, particle size, powder flow, tip's size, angle and distance from the tooth. It has been proposed that air abrasion can be used to diagnose early occlusal-surface lesions and treat them with minimal tooth preparation using magnifier. Reported advantages of air abrasion include reduced noise, vibration and sensitivity. Air abrasion cavity preparations have more rounded internal con-

tours than those prepared with straight burs. This may increase the longevity of placed restorations because it reduces the incidence of fractures and a consequence of decreased internal stresses. However, air abrasion cannot be used for all patients, i.e. in cases involving severe dust allergy, asthma, chronic obstructive lung disease, recent extraction or other oral surgery, open wounds, advanced periodontal disease, recent placement of orthodontic appliances and oral abrasions, or subgingival caries removal. Many of these conditions increase the risk of air embolism in the oral soft tissues. Dust control is a challenge, and it necessitates the use of rubber dam, high-volume evacuation, protective masks and safety eyewear for both the patient and the therapist.

Keywords: air abrasion; tooth preparation; minimally invasive dentistry

Примљен • Received: 05/07/2012

Прихваћен • Accepted: 28/11/2012

Current Concepts of Pathophysiology, Epidemiology and Classification of Pruritus

Marina Jovanović^{1,2}

¹Faculty of Medicine, University of Novi Sad, Novi Sad, Serbia;

²Clinic of Dermatovenereology Diseases, Clinical Center of Vojvodina, Novi Sad, Serbia

SUMMARY

Discovery of pruritus-specific mediators and receptors facilitated the neurobiological concept of pruritus: itch-specific (histamine-dependent and histamine-independent C-fibers); itch-specific receptors on cutaneous and spinal neurons; "dialogue" between the pruritus-specific neurons and cells in the skin; peripheral and central mediation of pruritus; functional "pruritus-specific matrix" in the brain with a role of pruritus center. In 10%–50% of persons without skin diseases, pruritus is considered the manifestation of a systemic disorder. Identification of pruritus within autoimmune and inflammatory diseases in dermatology is based on the clinical picture and nature of the underlying disease, implying the development of pruritus on primarily and/or secondarily inflamed skin. In the internal medicine, pruritus commonly presents on primarily non-inflamed skin., involvement of the skin and gastrointestinal tract are two independent risk factors of pruritus in systemic sclerosis, and of anal/vulvar pruritus. Classification combines etiological and clinical criteria and should be considered the only segment of a comprehensive approach to pruritus of unknown origin.

Keywords: pruritus; skin diseases; prevalence; comorbidity

INTRODUCTION

As Liddell [1] wrote in his paper, pruritus vulvae, senile pruritus and prurigo were described by Hippocrates of Cos (460-377 BC). In 1660, a German physician Samuel Hafenreffer [2] was the first to define pruritus (s. itch; kinesis) as a sensation that may provoke scratching. Nowadays, pruritus is considered a sensation that, if sufficiently strong, provokes reflex/conscious scratching or desire to scratch [3]. Previously, pruritus was considered a mild pain. Both sensations share common features: receptors in the form of unmyelinated sensory nerve endings with axons entering the dorsal horn of the spinal cord; secondary transmission neurons that ascend within the contralateral spinothalamic tract. However, pruritus cannot be transformed to pain and stimulation of fascicles that results in pain cannot evoke pruritus, thus two distinct sensations probably interact [4].

If peripheral, itch and pain are induced by activation of receptors, namely, free unmyelinated sensory nerve endings (C-fibers) in the epidermis and epithelia. These fibers are anatomically identical, but functionally distinct. It was believed that itch occurred after stimulation of non-specialized free unmyelinated nerve endings [5]. However, Schmelz et al. [6] demonstrated a small subset (5%) of itch-specific histamine-sensitive slow conducting unmyelinated C-fibers, which only transmit itch (and temperature) but not pain. These are: mechano-insensitive and termed CMi-fibers; selectively activated demonstrating spontaneous activity in chronic pruritic dermatoses. However, mechano- and heat-sensitive C-

fibers (CMH), called polymodal nociceptors, are histamine-insensitive and transmit pain. Identification of the second-order neurons, an itch-specific subclass of lamina I spinothalamic tract neurons, has demonstrated that specific neurons also transmit itch centrally [5, 6, 7].

PATHOPHYSIOLOGY

Different C-fibers are involved in pruritus. There are sensory nerve fibers, present both in peripheral and ascending sensory neurons in the spinal cord and thalamus that are histamine-insensitive but transmit itch, mechanical stimuli and pain. Moreover, the presence of the heat-sensitive receptor TRPV1 (transient receptor potential vanilloid ion channel-1) on the CMi-fibers is needed in histamine-mediated pruritus. These receptors are also expressed on keratinocytes, dendritic and mast cells, and are important for pruritus in the inflammatory skin conditions [8-11].

In the skin, different sensory receptors also exist on resident/temporary present cells. The epidermis itself, particularly keratinocytes, constitute the "itch receptor". Only histamine receptors were previously incorrectly associated with pruritus, since the pain can be evoked by histamine and patients can have pain and itch at the same site [12, 13]. TRPV1, termed the capsaicin receptor, because it can be activated by topical capsaicin, mediates pain and itch. TRPV1 is present on CMi and CMH C-fibers and many cells including keratinocytes. When activated, burning pain occurs initially. In continuous activation of C-fibers, capsaicin

Correspondence to:

Marina JOVANOVIĆ
Clinic of Dermatovenereology
Diseases
Clinical Center of Vojvodina
Hajduk Veljkova 1-9
21000 Novi Sad
Serbia
prof.drmarina@gmail.com

depletes substance P (SP) from the C-fibers which, with destruction of epidermal sensory fibers, reduces pain and pruritus. Neuropeptides (SP, calcitonin gene-related peptide – CGRP, vasoactive intestinal peptide – VIP, endothelin-1 – ET-1, bradykinin), that are potential chemical mediators of pruritus, are released after thermal or chemical activation of TRPV1, producing pruritus e.g., in atopic dermatitis, tissue acidosis activates TRPV1 on its own [8, 11].

Histamine plays primary pruritic role in urticaria and mastocytosis, via histamine receptors 1 and 4 (H1, H4). In the skin, H1 is expressed on sensory nerves and endothelia, H4 on Th2 cells, mast cells, fibroblasts, keratinocytes and hematopoietic cells. When H4 is activated on Th2 cells, these cells produce pruritic IL-31. This production is enhanced by the *Staphylococcus aureus* superantigens. In the skin, receptor for IL-31 is expressed on sensory C-fibers, keratinocytes, and dorsal spinal ganglia. In atopic dermatitis, IL-31 in the peripheral blood and skin is elevated and correlates with the severity of disease. Elevated IL-31 in the peripheral blood was demonstrated in the chronic spontaneous urticaria [14, 15].

Among the external/environmental pruritogens, only chloroquine, opioids and plant cysteine proteases have their own receptors on sensory neurons. The protease-activated receptor (PAR) family comprises G protein-coupled receptors (GPCRs), found on primary sensory neurons and dorsal root ganglia (DRG) neurons. Activated PARs can sensitize TRPV1. Initially, PARs were linked to inflammation: the elevated expression was detected in the lesional skin in atopic dermatitis. During inflammation, there is a cross-talk between dermal mast cells and C-fibers: mast cell-derived tryptase activates PAR2 on neuron terminals triggering secretion/release of CGRP and SP, which bind to the CGRP-receptor (CGRPr) and neurokinin-1 receptor (NK1R), respectively. Neurokinin receptors 1 to 3 are expressed on keratinocytes, endothelium, mast cells and spinal dorsal horn neurons. If it binds to NK1R on mast cells, SP activates (degranulates) them. In the therapy of individual patients with the renal failure, prurigo nodularis, Sézary syndrome, paraneoplastic, drug-induced pruritus, an antipruritic effect was obtained with aprepitant, a NK1R antagonist [16, 17].

Activation of specific opioid receptors is responsible for opioid-induced pruritus [5], which includes mast-cell independent mechanisms: when injected intradermally, morphine and some opiates induce local pruritus which is not opioid receptor-mediated, it can be relieved by H1-antihistamines but not with opioid receptor antagonists; pruritus induced by opioids administered systemically or spinally cannot be relieved by antihistamines, but opioid receptor antagonists. Peripheral- and central-specific μ -opioid and κ -opioid receptors are identified in the skin (μ - on sensory nerve fibers, κ - on keratinocytes, mast cells fibroblasts) and CNS. In the skin and sera of patients with cholestatic pruritus, an increased level of opioid peptides has been detected due to an increased intrahepatic synthesis. An opioid agonist-inducing pruritus acts on central rather than peripheral opioid μ -receptors, e.g., in order to produce analgesia (labor pain or peri-operatively), in-

traspinal administration of opioids produces pruritus (in more than 10% of patients) via central μ -opioid receptors. Opioid receptors exhibit different effect in the skin and the CNS: activation of central μ -receptors induces pruritus; stimulation of the central κ -opioid receptors leads to suppression of pruritus. Thus, antagonists of the μ -opioid receptors (naloxone, naltrexone, nalmefene), are effective in cholestasis, chronic renal failure, prurigo nodularis and opioid-induced pruritus. The κ -opioid receptor agonist nalfurafine exhibited antipruritic activity in hemodialysis-related pruritus [18-21]. Nalbuphine, a mixed μ -receptor antagonist and κ -receptor agonist, appears more effective than naltrexone, since generalized pruritus reflects an imbalance between κ - and μ -opioid receptors [5].

Cannabinoid receptors are present in the CNS, peripheral nervous system (PNS), skin and on immune cells. Nerve cells and keratinocytes release endogenous cannabinoids. Cannabinoids suppress pruritus when bind to specific receptors [22]. Topical application of cannabinoids (e.g., N-palmitoylethanolamine) can reduce pruritus.

Thus, different receptors coexist on a single fiber, concerning the polymodal nature of many primary neurons e.g., mechano-insensitive C-fibers express H1 and TRPV1 receptors and transmit itch; mechano-sensitive C-fibers express TRPV1 receptors (mediating pain and itch) and PAR2 receptors (mediate itch) and transmit pain and itch [5].

Pruritus can originate in the PNS, CNS or spinal cord. A specific GPCR, called mass-related G-protein coupled receptor X1 (mrgrpr X1) that mediates chloroquine-induced pruritus and responds to PAR-2 agonists, was detected in a subset of human neurons in the DRGs. These neurons express gastrin-releasing peptide which is important in the transmission of itch [23].

Itch-specific pathways exist in the spinal cord [7]. Like C-fibers, the primary and secondary sensory neurons in the spinal ganglia are histamine-sensitive and histamine-insensitive [8]. From lamina 1 of the dorsal horn to the thalamic cortex, pruritus-specific sensory spinal neurons form the specific pathway. No pruritus-specific brain center/area has been detected. There are multiple sites in the brain with overlapping of pain and itch: anterior cingulate cortex, supplementary motor area, inferior parietal lobe. Functional differences were detected in pruritus: left hemispheric dominance; no activation of thalamic and somatosensory cortex on parietal brain; predominant activation of ipsilateral motor areas; no subcortical activation [5].

EPIDEMIOLOGY

According to a Norwegian population-based cross-sectional study from 2003, including more than 18,770 adults from Oslo, pruritus was the most prevalent of all reported skin symptoms. The prevalence of the acute itching (during one week) in adults was 8.4% and was worse for younger people aged 30 years (11.9% in females, 9.6% in males), decreasing with age for both genders [24]. In a survey done in the sample of 18.137 surveyed subjects, representative of the French population, the prevalence of perceived chronic

pruritus during 24 months prior to the survey was 12.4%, and the estimated current prevalence was 5.4% [25]. In a German pilot study which objective was to develop and validate an instrument that will measure prevalence and characteristics of chronic pruritus in general population, the point prevalence was 13.9%, annual 16.5%, and lifetime 22.6% [26]. In an African cross-sectional multi-country study made in order to assess the public-health importance of the onchocercal skin disease, 42% of population older than 20 years in highly endemic communities suffered from pruritus. The prevalence strongly correlated with the endemicity of cutaneous onchocerciasis which was measured by the prevalence of nodules in the studied population. Pruritus was more prevalent among those with lower household income and socio-economic status [27]. Patients with skin diseases exhibit a significant negative correlation between the level of psychosocial well-being and the prevalence of itch. Among depressed people the prevalence is significantly higher than in non-depressed, 18% versus 9%, respectively. Depressed patients have an elevated corticotrophin releasing factor in the cerebrospinal fluid, a major physiologic regulator of pro-opiomelanocortin-derived peptides, e.g. beta-endorphin [24, 28].

In age-specific populations, the following prevalences of chronic itch were estimated: 8.8% among adolescents [29]; 9% in pediatric dialysis patients; 22.2% in children on peritoneal dialysis [30]; 19.5% in patients older than 85 years. Chronic pruritus in elderly arises from the following: xerosis; increased mast cell degranulation; skin sensitivity to histamine, higher rate of comorbidity and drug-induced adverse effects that make them more susceptible [31]. We should substitute the term “senile”, with an “inappropriately diagnosed” chronic pruritus.

Pruritus occurs in 18% of all pregnancies. Pruritus leads in intrahepatic cholestasis of pregnancy (ICP), being more prevalent in women on oral contraceptives, with personal history of cholestasis, multiple gestations, advanced maternal age. After viral hepatitis, ICP represents the second most common cause of gestational jaundice: the prevalence ranges from 1% (Europe) to 27.6% (Chile) [32].

PRURITUS IN DERMATOLOGIC DISEASES

In general practice, 50% of dermatological patients report pruritus as their main problem. Skin diseases are present in 57% of patients consulting dermatologists for chronic pruritus [33]. Pruritus represents a characteristic symptom not only in parasitic skin infestations, contact reactions, e.g., dermatitis [34], erythema multiforme [35] urticaria [36], atopic dermatitis [37], but also in psoriasis [38], venous insufficiency, bacterial, fungal, viral infections [39]; bullous diseases, neoplastic, e.g., cutaneous T-cell lymphoma. Drug-induced pruritus may start during the treatment of pruritus [40].

In one report, 87% of patients with the atopic dermatitis reported daily itching; in 65% of them pruritus was most frequent at night [41]. In atopic dermatitis, pathophysiology includes: free nerve endings; keratinocytes expressing

neuropeptides; Th2-lymphocytes; mast cells; keratinocytes and eosinophils expressing neurotrophin NGF (nerve growth factor); ECP (eosinophil cationic protein); IL-31, and receptors H4, IL-31 and PAR2 [8].

Generalized pruritus was reported in 84% of patients with widespread psoriasis; daily occurrence was reported in 77% [42]. Szepietowski et al. [43] reported pruritus in 80% of patients: Psoriasis Severity Index (PASI) was significantly higher among patients with pruritus; in 81%, pruritus was confined to psoriatic lesions; it also involved non-lesional skin in 19%. Local lesion-limited inflammation implies peripheral origin of pruritus, whereas changes in neuropeptide distribution and in epidermal nerve fiber density suggest neuropathic origin! Vulvar psoriasis is significantly more common among women with vulvar pruritus [44]. In a questionnaire-based study in patients with the chronic plaque psoriasis, drying of the skin (80%) and stress (66%) were major pruritus-aggravating factors, while sleep, sun and holidays alleviated chronic pruritus [45]. Depression was the only significant predictor of pruritus in psoriasis and anger in chronic spontaneous urticaria [46]. Apart from histamine acting via H1 receptor, IL-31 and H4 receptors are important mediators in chronic urticaria [8].

Pruritus may follow several months post-burn in 87% of patients. Post-burn represents a scar and a consequence of nerve regeneration (NGF). In a recent investigation, the most significant predictors of pruritus were deep dermal injury and early post-injury stress-symptoms [47].

Pruritus may arise during bacterial, viral, and fungal infections and is usually acute. One third of patients with secondary syphilis have pruritus [4].

PRURITUS IN SYSTEMIC DISEASES

In dermatology departments, 10-50% of patients with pruritus, without obvious dermatologic cause, have an underlying systemic disease. However, if true relationship between the onset/course of both the pruritus and the disease was previously elucidated, such an association would vary between 4.3% and 22%: the most severe pruritus was in patients who had multiple systemic diseases; assessment of patients with chronic pruritus seldom reveals a preexisting unknown systemic disease responsible for pruritus [48, 49].

Investigations of patients with generalized chronic pruritus in France, Germany and Uganda revealed the prevalence of underlying systemic diseases of 40%, 36% and 0%, respectively. In France, the most common systemic disease was toxocariasis (8.4%) [33, 50].

PRURITUS IN INFECTIOUS DISEASES

In herpes zoster, chronic (post-herpetic) pruritus occurs in 4% of patients. Pruritus occurs more frequently if the head, neck or face is affected. Chronic pruritus occurs in 4.5% of patients with varicella [51].

Severe pruritus occurs in advanced HIV disease, and correlates with faster decline of CD4+ T-lymphocyte counts, thus it can be regarded as a cutaneous marker of disease progression [39]. In HIV-related diseases, pruritus may occur without skin disease, but it can frequently be associated with: scabies, seborrheic dermatitis, eczema; renal or hepatic disease, lymphoma; eosinophilic folliculitis, pruritic papular eruption, and prurigo nodularis. In Uganda 28% of dermatological patients have chronic pruritus, 70% are HIV-positive; among all HIV-tested patients with prurigo, 88% were positive [52]. Pruritus is mediated with cytokine-induced prostaglandin E_2 , and the effect of the HIV-1 coat protein gp 120 on C-fibers in the skin, and on inflammatory axonal damage [53].

PRURITUS IN CERTAIN INTERNAL DISEASES

Due to improved technology (polysulphone membrane), pruritus affects not 85%, as a decade ago, but 38-55% of patients receiving dialysis. Pruritus is unrelated to sex, age, duration, cause of dialysis, a list of unproven suggestions: dry skin; mast cell proliferation; Th1 cytokines; secondary hyperparathyroidism; disturbed balance between μ -opioid and κ -opioid receptors; substance P; increased skin ions Ca^{++} , Mg^{++} , PO_4^{--} ; abnormal transmission via the spine (gabapentin represents the first-line systemic therapy); serotonin, (mirtazapine represents the second-line therapy) [54, 55].

In cholestasis pruritus is generalized, migratory, typically triggered by tight clothing, not relieved with scratching; affecting 70% of patients with primary biliary cirrhosis, and 15% of hepatitis-C virus-positive patients. Since the prevalence of HCV-positivity in patients with chronic pruritus did not significantly differ from that in general population, it was proposed not to perform routine testing in the absence of risk factors [56].

In diabetes mellitus, generalized pruritus occurs in less than 10% of patients, which is not significantly higher than in non-diabetic patients. Localized pruritus in the perianal/genital region affects diabetic women more frequently and is significantly associated with poor diabetes control: in some, it may be the consequence of an increased predisposition to fungal infections [48, 57].

The relation between iron deficiency/replacement and chronic pruritus has to be questioned: no control trials have been conducted. There is no evidence supporting the routine determination of iron level in patients with vulvar/perianal pruritus. In polycythemia rubra vera, the history of chronic pruritus has been documented in 48% of patients: water-produced pruritus may precede development of disease by years; pruritus was significantly associated with high leukocyte count and lower blood cell mean corpuscular volume [57]. The exact pathomechanism includes: increased basophils; JAK2 617V>F-mutated cutaneous mast cells [8]. Platelet aggregation has been proposed as a possible mechanism, leading to release of serotonin, and histamine. The treatment includes aspirin, paroxetine, H1-, H2-antihistamines.

Generalized pruritus affects 30% of patients with Hodgkin's lymphoma, 10% with non-Hodgkin's lymphoma (usually with cutaneous lesions). Localized pruritus affects 5% of patients with leukemia. Chronic pruritus precedes Hodgkin's lymphoma by years, if severe/persistent, predicts a poor prognosis, if recurs, it announces tumor recurrence. Pruritus in Hodgkin's disease is mediated by histamine, since it responds to cimetidine, but may follow cholestasis and disturbed central neurotransmission, since its beneficial response to mirtazapine [57, 58].

Chronic pruritus as a paraneoplastic sign, is present in 10% of patients exhibiting pruritus of "undetermined origin" (previously "idiopathic"), with lymphoma and leukemia being the most common malignancies. It is defined as pruritus that: precedes clinical appearance or occurs early during the natural course of the malignancy; is not provoked by mass invasion/compression; subsides after removal of the tumor. Pruritus is common in skin paraneoplastic syndromes: erythroderma (97%), dermatomyositis (18-32%), malignant acanthosis nigricans (41%); aquagenic pruritus (can precede development of T cell lymphoma or myelodysplasia by years). Some known/suggested factors include: histamine release from basophils; eosinophilia. Assessing the roles of IL-6, -8, -31 is a "timely topic" [49, 58].

DRUG-INDUCED PRURITUS

Drug-induced pruritus without skin lesions accounts for 5% of drug-induced cutaneous side-effects among hospitalized patients: it can start with the first dose or be delayed for several weeks/months: it resolves shortly after the drug has been discontinued or lasts for months/years after drug withdrawal. A clear time-relation has been estimated for some drugs: pruritus usually lasts in this group less than 6 weeks. Proposed pathomechanisms include: cholestasis, hepatotoxicity, sebstasis/xerosis, phototoxicity, neurologic mechanisms, deposition (pruritus after hydroxyethyl-starch deposition in the skin lasts 15 months without skin lesions) [4, 31, 58].

There are no epidemiological studies in long-term treatment with morphine and anti-malarials, including chronic drug-induced pruritus in pregnancy. The list of drugs inducing chronic pruritus includes: antihypertensives, antiarrhythmics, anticoagulants, antidiabetics, hypolipemics, antibiotics, chemotherapeutics, psychotropic drugs, antiepileptics, cytostatics, cytokines, growth factors, monoclonal antibodies, plasma volume expanders and others [31, 57].

PRURITUS IN NEUROLOGICAL DISEASES

In a recent study, it has been reported that 17% of patients who were referred to dermatologists due to chronic itch and with no cutaneous lesions, had an underlying neurological disease [48]. Chronic pruritus may arise after neuronal damage, when it is termed neuropathic and should be differentiated from pruritus without neuronal damage, termed neurogenic pruritus. As generated in the central nervous system,

neurogenic pruritus represents a consequence of circulating metabolic or chemical (neurochemical pruritus) pathogens, such as pruritus in cholestasis or in response to intraspinal morphine injection [3, 5, 31]. It has been postulated that any damage along the afferent pathway of the nervous system can elicit chronic pruritus. Neuropathic pruritus is related to primary lesion/dysfunction located at any level along the afferent pathway of the nervous system. It is characterized by the association with other sensory symptoms-signs (pain, paresthesia/hyperesthesia) in a dermatome, or motor or autonomic damage. Pathomechanisms of neuropathic itch are still incompletely elucidated, but several are proposed: local nerve damage; central neuronal deprivation of afferent input, when central itch neurons fire due to increased tone in descending pathways that leads to diminishing of itch traffic; central sensitization; long-term changes in cortical somatosensory pathways. Sensitization of nerve fibers may be peripheral and central. Central sensitization (alloknesis) of nerve fibers is implicated in the majority of cases of neuropathic itch. The phenomenon of central sensitization is explained by the excitation of secondary transmission neurons in the dorsal root spinal ganglia due to continuing activation of C-fibers. Since abnormal transmission via the spine has been proposed, antiepileptic drug – gabapentin, a structural analogue of the inhibitory transmitter γ -aminobutyric acid, represents the first-line systemic therapy in almost all cases of neuropathic itch [5, 13].

Neuropathic pruritus may arise due to peripheral nerve lesions and the central nervous system lesions [5, 13]. More than a half of all patients with postherpetic neuralgia, which is a prototype of peripheral neuropathy, have pruritus. Apart from postherpetic, other types of peripheral sensitization may provoke pruritus such as brachioradial pruritus (compression of the cervical C2-C8 nerve root); notalgia paresthetica (trauma/entrapment of the thoracic T2-T6 nerve root); cheiralgia paresthetica (entrapment of the radial nerve); trigeminal trophic syndrome (ablation of the Gasserian ganglion); pruritus in keloids, burn and postmastectomy scars; anogenital pruritus in lumbosacral radiculopathy. Central nervous system lesions include spinal cord and brain pathologies (tumors, strokes abscesses, multiple sclerosis). The paroxysmal spontaneous pruritus or that triggered by movement, which often awakes patient, occurs in 5% of cases with multiple sclerosis: mediated by impaired synaptic conductivity, rather than by demyelination [13].

According to Jeffrey D. Bernhard [3], terms neurogenic and neuropathic should be considered synonymous.

PRURITUS IN PSYCHIATRIC/PSYCHOSOMATIC DISEASES – SOMATOFORM PRURITUS

If onset of pruritus is temporally connected with significant psychopathology (anxiety, depression, schizophrenia), it is a psychogenic or somatoform pruritus. It represents a psychosomatic definition of “pruritus sine materia”, a diagnosis of exclusion. It can occur with another type of pruritus or/and along with a preexisting psychopathology. It is present in 2-12% of patients visiting dermatologists without pri-

mary skin disease [48, 59]. Depression, psychogenic parasitosis, obsessive-compulsive disorder, anxiety, somatoform disorders, psychosis, substance abuse were reported with pruritus: somatoform pruritus may accompany comorbidities of psychiatric and psychosomatic diseases. Diagnostic criteria that do not include obligatory psychiatric disease have been proposed: 3 compulsory (all must be met) and 7 optional (at least 3 must be present). Compulsory criteria include localized/generalized pruritus: without primary skin lesions; lasting for more than 6 weeks; without somatic cause. Optional criteria are: chronologic relationship with one/several life events that could have psychologic repercussions; variations in intensity associated with stress; nocturnal variations; predominance during rest/inaction; association with psychologic disorders; improvement by psychotropic drugs; improvement by psychotherapy [60-63].

Depression may be the primary condition in somatoform pruritus. Depressed patients have elevated levels of corticotrophin-releasing factor in cerebrospinal fluid that may decrease the threshold for pruritus by increasing the central nervous opiate levels [28].

The secondary skin lesions are found on areas accessible to the hands. There are three types of psychogenic excoriations: obsessive-compulsive (neurotic and those in delusions of parasitosis, affecting middle-aged women, fully aware of what they are doing; impulsive, in anxious and depressive disorders; and mixed. According to Arnold, psychogenic pruritus is a prototype of impulsive excoriations, however, could also develop without any skin signs [13, 59].

Beside many advances in our comprehension of pathophysiology and treatment of pruritus, inconsistencies are still present “when thinking about the most prominent and Zen-like of dermatological symptoms – itch, an invisible sensation in the most visual of medical specialties”. [3].

CLASSIFICATION

Clinically-based classification of pruritus is proposed by the International Forum for the Study of itch [60]. The first part classifies the underlying conditions according to groups I-III (Table 1). Primary skin lesions may be confounded by secondary [60, 64]. Primary skin lesions and secondary (reactive to scratching/rubbing) must be differentiated in, for example, atopic dermatitis. The second part classifies the underlying conditions according to etiology in different categories I-IV (Table 1). Category V or

Table 1. Classification of chronic pruritus

Groups of patients	Classification of diseases
Group I: pruritus on primary diseased skin	Dermatologic
Group II: pruritus on non-diseased skin	Systemic
	Neurologic
	Psychogenic
Group III: chronic secondary scratch lesions	Dermatologic
	Systemic
	Neurologic
	Psychogenic

“mixed” includes patients with more than one underlying disease that may be responsible. Category VI or “pruritus of undetermined origin” includes chronic pruritus without finding of underlying origin.

In management of patients with chronic pruritus, first they should be grouped according to clinical picture/history. Second, they should be classified on the basis of laboratory/histological/radiological findings (Table 1) [60].

CONCLUSION

Pruritus is prevalent in the general population. Pruritus and pain have their own neuronal pathways with wide

interactions. The proposed classification distinguishes between pruritus with and without primary or secondary skin lesions and should be considered as the only segment of a comprehensive approach to pruritus of unknown origin. Thus, persistent pruritus without obvious dermatologic pathology should encourage investigation for the underlying systemic cause.

ACKNOWLEDGMENT

The author acknowledges the Ministry of Education, Science and Technological Development of the Republic of Serbia, Project: 172058.

REFERENCES

- Liddell K. Hippocrates of Cos (460-377 BC). *Clin Exp Dermatol*. 2000; 25:86-8.
- Hafenreffer S. De pruriti, in Nosodochium, in quo cutis, eiqe adhaerentium partium, affectus omnes singulari methodo et cognoscendi et curandi fidelissime traduntur. Ulm: B Kuehn; 1660. p.98-102.
- Bernhard JD. Itch and pruritus: what are they and how should itches be classified? *Dermatol Ther*. 2005; 18:288-91.
- Weisshaar E, Kucenic MJ, Fleischer JR. Pruritus a review. *Acta Derm Venereol Suppl*. 2003; (213):5-32.
- Greaves MW. Pathogenesis and treatment of pruritus. *Curr Allergy Asthma Rep*. 2010; 10:236-42.
- Schmelz M, Schmidt R, Bickel A, Handwerker HO, Torebjork HE. Specific C-receptors for itch in human skin. *J Neurosci*. 1997; 17:8003-8.
- Andrew D, Craig AD. Spinothalamic lamina I neurons selectively sensitive to histamine: a central neural pathway for itch. *Nat Neurosci*. 2001; 4:72-7.
- Ständer S, Raap U, Weisshaar E, Schmelz M, Mettang T, Handwerker H, et al. Pathogenesis of pruritus. *J Dtsch Dermatol Ges*. 2011; 9:456-63.
- Davidson S, Zhang X, Yoon CH, Khasabov SG, Simone DA, Giesler GJ Jr. The itch-producing agents histamine and cowhage activate separate populations of primate spinothalamic tract neurons. *J Neurosci*. 2007; 27:10007-14.
- Imamachi N, Park GH, Lee H, Anderson DJ, Simon MI, Basbaum AI, et al. TRPV1-expressing primary afferents generate behavioral responses to pruritogens via multiple mechanisms. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2009; 106:11330-5.
- Steinhoff M, Biro T. A TRP/P to pruritus research: role of TRPV3 in inflammation and itch. *J Invest Dermatol*. 2009; 129:531-5.
- McNeil B, Dong X. Peripheral mechanisms of itch. *Neurosci Bull*. 2012; 28(2):100-10.
- Yosipovitch G, Samuel L. Neuropathic and psychogenic itch. *Dermatol Ther*. 2008; 21:32-41.
- Cowden JM, Zhang M, Dunford PJ, Thurmond RL. The histamine H4 receptor mediates inflammation and pruritus in Th2-dependent dermal inflammation. *J Invest Dermatol*. 2010; 130:1023-33.
- Gutzmer R, Mommert S, Gschwandtner M, Zwingmann K, Stark H, Werfel T. The histamine H4 receptor is functionally expressed on T(H)2 cells. *J Allergy Clin Immunol*. 2009; 123:619-25.
- Soh UJ, Dores MR, Chen B, Trejo J. Signal transduction by protease-activated receptors. *Br J Pharmacol*. 2010; 160(2):191-203.
- Ständer S, Siepmann D, Herrgott I, Sunderkötter C, Luger TA. Targeting the neurokinin receptor 1 with aprepitant: a novel antipruritic strategy. *PLOS One*. 2010; 5:e10968.
- Metz M, Gundmann S, Stander S. Pruritus: an overview of current concepts. *Vet Dermatol*. 2011; 22:121-31.
- Phan NQ, Bernhard JD, Luger TA, Ständer S. Antipruritic treatment with systemic μ -opioid receptor antagonists: a review. *J Am Acad Dermatol*. 2010; 63:680-8.
- Reich A, Szepletowski JC. Opioid-induced pruritus: an update. *Clin Exp Dermatol*. 2010; 35:2-6.
- Kumagai H, Ebata T, Takamori K, Muramatsu T, Nakamoto H, Suzuki H. Effect of a novel kappa-receptor agonist, nalfurafine hydrochloride, on severe itch in 337 haemodialysis patients: a phase III, randomized, double-blind, placebo- controlled study. *Nephrol Dial Transplant*. 2010; 25:1251-7.
- Kupczyk P, Reich A, Szepletowski JC. Cannabinoid system in the skin – a possible target for future therapies in dermatology. *Exp Dermatol*. 2009; 18:669-79.
- Sun YG, Chen ZF. A gastrin-releasing peptide receptor mediates the itch sensation in the spinal cord. *Nature*. 2007; 448(7154):700-3.
- Dalgard F, Svensson A, Holm JO, Sundby J. Self-reported skin morbidity in Oslo: Associations with sociodemographic factors among adults in a cross-sectional study. *Br J Dermatol*. 2004; 151:452-7.
- Wolkenstein P, Grob JJ, Bastuji-Garin S, Ruszczynski S, Roujeau JC, Revuz J. French people and skin diseases: results of a survey using a representative sample. *Arch Dermatol*. 2003; 139:1614-9.
- Matterne U, Strassner T, Apfelbacher CJ, Diepgen TL, Weisshaar E. Measuring the prevalence of chronic itch in the general population: a pilot study. *Acta Derm Venereol*. 2009; 89:250-6.
- Murdoch ME, Asuzu MC, Hagan M, Makunde WH, Ngoumou P, Ogbuagu KF, et al. Onchocerciasis: the clinical and epidemiological burden of skin disease in Africa. *Ann Trop Med Parasitol*. 2002; 96:283-96.
- Roy A, Pickar D, Paul S, Doran A, Chrousos GP, Gold PW. CSF corticotropin-releasing hormone in depressed patients and normal control subjects. *Am J Psychiatry*. 1987; 144:641-5.
- Halvorsen JA, Dalgard F, Thoresen M, Bjertness E, Lien L. Itch and mental distress: a cross-sectional study among late adolescents. *Acta Derm Venereol*. 2009; 89:39-44.
- Senturk N, Ozkaya O, Aytekin S, Bek K, Acikgoz Y, Aydin F, et al. Characteristics of pruritus in children on peritoneal dialysis. *Nephron Clin Pract*. 2008; 109:168-72.
- Reich A, Stander S, Szepletowski JC. Pruritus in elderly. *Clin Dermatol*. 2011; 29:15-23.
- Black MM, Ambros-Rudolph C, Edwards L, Lynch P, editors. *Obstetric and Gynaecologic Dermatology*. 3rd ed. London: Mosby Elsevier; 2008.
- Weisshaar E, Apfelbacher C, Jager G, Zimmermann E, Bruckner T, Diepgen TL, et al. Pruritus as a leading symptom: clinical characteristics and quality of life in German and Ugandan patients. *Br J Dermatol*. 2006; 155:957-64.
- Jovanović M, Poljački M, Mimica-Dukić N, Boža P, Vujanović Lj, Djuran V, et al. Sesquiterpene lactone mix patch testing supplemented with dandelion extract in patients with allergic contact dermatitis, atopic dermatitis and non-allergic chronic inflammatory skin diseases. *Contact Dermatitis*. 2004; 51:101-10.
- Jovanović M, Mimica-Dukić N, Poljački M, Boža P. Erythema multiforme due to contact with weeds: a recurrence after patch testing. *Contact Dermatitis*. 2003; 48:17-25.
- Jovanović M, Oliwiecki S, Beck MH. Occupational contact urticaria from beef associated with hand eczema. *Contact Dermatitis*. 1992; 27:188-9.

37. Jovanović M, Poljački M, Djuran V, Vujanović Lj, Sente R, Stojanović S. Kontaktna senzibilizacija izazvana Compositae biljkama kod obolelih od atopijskog dermatitisa. *Med Pregl*. 2004; 57:209-18.
38. Jovanović M, Boža P, Karadaglić Dj, Brkić S, Petrović A, Mimica-Dukić N, et al. Contact sensitivity in patients with psoriasis in Vojvodina. *Int Arch Allergy Immunol*. 2009; 148:311-20.
39. Dlova NC, Mosam A. Inflammatory noninfectious dermatoses of HIV. *Dermatol Clin*. 2006; 24:439-48.
40. Jovanović M, Karadaglić Dj, Brkić S. Contact urticaria and allergic contact dermatitis to lidocaine in a patient sensitive to benzocaine and propolis. *Contact Dermatitis*. 2006; 54:124-6.
41. Yosipovitch G, Goon AT, Wee J, Chan YH, Zucker I, Goh CL. Itch characteristics in Chinese patients with atopic dermatitis using a new questionnaire for the assessment of pruritus. *Int J Dermatol*. 2002; 41:212-6.
42. Yosipovitch G, Goon AT, Wee J, Chan YH, Goh CL. The prevalence and clinical characteristics of pruritus among patients with extensive psoriasis. *Br J Dermatol*. 2000; 143:969-73.
43. Szepletowski JC, Reich A, Wisnicka B. Pruritus and psoriasis. *Br J Dermatol*. 2004; 151:1284.
44. Zamirska A, Reich A, Berny-Moreno J, Salomon J, Szepletowski JC. Vulvar pruritus and burning sensation in women with psoriasis. *Acta Derm Venereol*. 2008; 88:132-5.
45. Amaty B, Wennersten G, Nordlind K. Patients' perspective in chronic plaque psoriasis: a questionnaire-based study. *J Eur Acad Dermatol Venereol*. 2008; 22:822-6.
46. Conrad R, Geiser F, Haidl G, Hutmacher M, Liedtke R, Wermter F. Relationship between anger and pruritus perception in patients with chronic idiopathic urticaria and psoriasis. *J Eur Acad Dermatol Venereol*. 2008; 22:1062-9.
47. Van Loey NE, Bremer M, Faber AW, Middelkoop E, Nieuwenhuis MK. Itching following burns: epidemiology and predictors. *Br J Dermatol*. 2008; 158:95-100.
48. Ferm I, Magnus S, Wallengren J. Somatic and psychiatric comorbidity in patients with chronic pruritus. *Acta Derm Venereol*. 2010; 90:395-400.
49. Sommer F, Hensen P, Bockenholt B, Metzke D, Luger TA, Stander S. Underlying diseases and co-factors in patients with severe chronic pruritus: a 3-year retrospective study. *Acta Derm Venereol*. 2007; 87:510-6.
50. Afifi Y, Aubin F, Puzenat E, Degouy A, Aubrion D, Hassam B, et al. Enquête étiologique d'un prurit sine materia: étude prospective d'une série de 95 patients. *Rev Med Interne*. 2004; 25:490-3.
51. Özdemir M, Tuzun Y. Herpes zoster and pruritus. *Int J Dermatol*. 2004; 43:779-80.
52. Schmidt E, Rose C, Mulyowa GK, Jager G. Dermatologie an der Universitätsklinik Mbarara, Uganda. *J Dtsch Dermatol Ges*. 2004; 2:920-7.
53. Herzberg U, Sagen J. Peripheral nerve exposure to HIV viral envelope protein gp120 induces neuropathic pain and spinal gliosis. *J Neuroimmunol*. 2001; 116:29-39.
54. Razeghi E, Eskandari D, Ganji MR, Meysamie AP, Togha M, Khashayar P. Gabapentin and uremic pruritus in haemodialysis patients. *Ren Fail*. 2009; 31:85-90.
55. Davis MP, Frandsen JL, Walsh D, Andersen S, Taylor S. Mirtazapine for pruritus. *J Pain Symptom Manage*. 2003; 25:288-91.
56. Cribier B, Santinelli F, Schmitt C, Stoll-Keller F, Grosshans E. Should patients with pruritus be tested for hepatitis C virus infection? A case controlled study. *Br J Dermatol*. 2000; 142:1249-50.
57. Weisshaar E, Dalgard Florence. Epidemiology of itch: adding to the burden of skin morbidity. *Acta Derm Venereol*. 2009; 89:339-50.
58. Yosipovitch G. Chronic pruritus: a paraneoplastic sign. *Dermatol Ther*. 2010; 23:590-6.
59. Arnold LM, Auchenbach MB, McElroy SL. Psychogenic excoriation. Clinical features, proposed diagnostic criteria, epidemiology and approaches to treatment. *CNS Drugs*. 2001; 15:351-9.
60. Stander S, Weisshaar E, Mattang T, Szepletowski JC, Carstens E, Ikoma A, et al. Clinical classification of itch: a position paper of the international forum for the study of itch. *Acta Derm Venereol*. 2007; 87:291-4.
61. Tey HL, Wallengren J, Yosipovitch G. Psychosomatic factors in pruritus. *Clin Dermatol*. 2013; 31:31-40.
62. Misery L, Wallengren DJ, Weisshaar E, Zalewska A. Validation of diagnostic criteria of functional itch disorder or psychogenic pruritus. *Arch Derm Venereol*. 2008; 88:503-4.
63. Misery L, Alexandre S, Dutray S, Chastaing M, Consoli SG, Audra H, et al. Functional itch disorder or psychogenic pruritus: suggested diagnosis criteria from the French psychodermatology group. *Acta Derm Venereol*. 2007; 87:341-4.
64. Jovanović M. Manifestations of contact allergy. *Srp Arh Cel Lek*. 2012; 140(11-12):786-91.

Актуелни концепти патофизиологије, епидемиологије и класификације пруритуса

Марина Јовановић^{1,2}

¹Медицински факултет, Универзитет у Новом Саду, Нови Сад, Србија;

²Клиника за дерматовенеролошке болести, Клинички центар Војводине, Нови Сад, Србија

КРАТАК САДРЖАЈ

Откривањем медијатора и рецептора специфичних за пруритус постављен је неуробиолошки концепт пруритуса које одликују: Ц неурони специфични за свраб (хистамин и хистамин-независни); рецептори специфични за свраб на кутаним и спиналним неуронима; функционални „дијалог“ између неурона специфичних за пруритус и ћелија стално или привремено (инфламација) заступљени у кожи; периферно и централно преношење пруритуса; функционално активни „пруритус-специфични матрикс“ у мозгу у улози центра за пруритус. Пруритус је најчешће симптом дерматоза, али код 10–50% особа које немају обољење коже он је манифестација системског поремећаја. Издвајање пруритуса у оквиру аутоимунских и упалних болести у дермато-

логији заснива се на клиничкој слици и природи основног обољења и подразумева појаву пруритуса на примарно и/или секундарно инфламираној кожи. Пруритус у интерној медицини првенствено подразумева пруритус у примарно неинфламираној кожи: захватање коже и гастроинтестиналног тракта су независни фактори ризика за појаву пруритуса у системској склерози, аналном и вулварном пруритусу. Класификација пруритуса обједињује етиолошке критеријуме, на којима је заснована неуроанатомска подела, и клиничке критеријуме, на којима се заснива клиничка подела. Класификацију пруритуса треба схватити као део свеобухватног приступа пруритусу неодређеног узрока.

Кључне речи: пруритус; кожне болести; преваленција; коморбидитет

Renal Hypertension and Cardiovascular Disorder in Children with Chronic Kidney Disease

Amira Peco-Antić^{1,2}, Dušan Paripović²

¹Faculty of Medicine, University of Belgrade, Belgrade, Serbia;

²Nephrology Department, University Children's Hospital, Belgrade, Serbia

SUMMARY

Renal hypertension is one of the earliest and the most prevalent complications of pediatric chronic kidney disease (CKD). Among renal patients, hypertension is frequently underdiagnosed and undertreated. For casual blood pressure measurement, the best method is auscultatory, while for ambulatory blood pressure measurement, oscillometric method is the most commonly used. Both casual and ambulatory blood pressure measurement provide more powerful means of diagnosing hypertension. Masked hypertension is a condition in which casual blood pressure is normal but ambulatory blood pressure is elevated. The risk of cardiovascular morbidity and mortality is higher with masked hypertension as compared to the controls. Children and adolescents with CKD are at high risk of cardiovascular disease that has been established as the leading cause of death in patients with end stage renal disease. Left ventricular hypertrophy remains the most thoroughly documented form of end-organ damage caused by hypertension in children and adolescents with CKD. Based on clear evidence on the correlation between blood pressure and cardiovascular morbidity, mortality, and renal function, renal hypertension must be aggressively treated. Target blood pressure for patients with renal hypertension should be at low normal values: <75 percentile for patients without proteinuria and <50 percentile for patients with proteinuria. Renin-angiotensin system antagonists are considered the first choice pharmacological option in hypertensive CKD 2-4 patients while the management of volume overload is the most important in dialysis patients. Successful transplantation can eliminate or significantly improve uremia-related cardiovascular risk factors and increase predicted life expectancy.

Keywords: chronic renal failure; cardiovascular disorders; left ventricular hypertrophy; children

INTRODUCTION

In contrast to adults, secondary forms of arterial hypertension predominate in infancy and childhood but, as adolescence approaches, there is a higher incidence of essential hypertension [1]. Renal hypertension is the most common (approximately 85%) identifiable secondary hypertension in children. It is one of the earliest and most prevalent complications of pediatric chronic kidney disease (CKD). Over a half of all children have hypertension even in early CKD, increasing up to 50-75% in CKD stage 5, and 50-78% in transplanted patients [2]. Long-standing and uncontrolled hypertension is associated with progression of CKD and development of early cardiomyopathy and vascular damage and re-modeling [3]. Aggressive treatment of hypertension is necessary not just to prevent the development of cardiovascular disorder (CVD), but also to improve renal survival in CKD patients. The current review focuses on the early identification and management of hypertensive disease in renal patients during childhood.

UNDERLYING DISEASE

Renal parenchymal disease

Renal hypertension occurs most frequently in renal parenchymal disease; chronic glomeru-

lopathy and renal scarring with or without vesicoureteral reflux and/or obstruction are predominant. In the ESCAPE trial, the prevalence of hypertension was 88% in patients with the acquired glomerulopathies, 38% in children with hypo/dysplastic kidney disorders, and 57% in other congenital or hereditary renal diseases [4]. Renal scarring of reflux nephropathy or obstructive uropathy also significantly contributes to the prevalence of pediatric renal hypertension. Approximately 10% of children with reflux nephropathy will develop hypertension, and by late adolescence, the prevalence will account for 18-20%; in long-term follow between 30% and 40% of subjects will be hypertensive [5, 6]. Other causes, such as the polycystic kidney disease, damaged kidney because of the acute kidney injury (as in patients recovering from severe HUS) and renal tumors are important but less common.

Renovascular hypertension

Renovascular disease (RVD) occurs in approximately 10% of patients with hypertension in tertiary reference center [7]. Fibromuscular dysplasia, neurofibromatosis type I, tuberous sclerosis, Takayasu's arteritis, middle aortic syndrome, and Williams syndrome are some of the conditions that result in renal arterial stenosis and renal ischemia [7]. It is important to diag-

Correspondence to:

Amira PECO-ANTIĆ
University Children's Hospital
Tiršova 10, 11000 Belgrade
Serbia
amirapecoantic@yahoo.com

nose RVD early, as it is potentially curable with interventional treatment. Recent technological advances including Doppler renal ultrasound, radioisotope renogram with ACE inhibitors, high-resolution computed tomographic (CT) angiography, and magnetic resonance (MR) angiography have improved non-invasive investigations, but renal angiography is still a gold standard for diagnosis of RVD [8]. The treatment of children with RVD should be managed by a multidisciplinary team and should be based on a combination of antihypertensive drugs, angioplasty, and surgery.

HYPERTENSION IN PATIENTS WITH THE CHRONIC RENAL FAILURE

The prevalence of hypertension increases directly with the prevalence of concomitant renal failure; by the time CKD reaches stage 5, the majority of affected children have hypertension [2]. Recent ESPN/ERA-EDTA registry [9] found hypertension in over two-thirds of patients on renal replacement therapy (RRT). Hypertension was more prevalent in patients under 3 years compared to 13–17 year old, during the first compared to over 5 years of RRT, and in patients on hemodialysis compared to transplant recipients or those on peritoneal dialysis. Over time, mean blood pressure (BP) decreased in both hemodialysis and transplant recipients patients, but not in patients on peritoneal dialysis [9]. Similar results were obtained in a cross-sectional study sample of patients on chronic dialysis aged 1–21 years enrolled in the North American Pediatric Renal Trials and Collaborative Studies registry from 1992–2008 [10]. At 6 months after dialysis was initiated, 67.9% of 3447 patients (65.7% on peritoneal dialysis and 34.3% on hemodialysis) had uncontrolled or untreated hypertension, and 57.8% were prescribed antihypertensive medications. More recent year of dialysis initiation was associated with higher use of antihypertensive medication and lower systolic BP and diastolic BP Z-scores measured over time from 6 months to 3 years after dialysis initiation. Other factors associated with higher BP included black race, glomerular disease, younger age, hemodialysis (systolic BP only), and antihypertensive use. There were significant differences in BP control by dialysis modality and disease etiology, with patients on hemodialysis or those with glomerular diseases having the highest percentage of uncontrolled hypertension [10]. In another cross-sectional study that included 624 pediatric patients on chronic hemodialysis, 79% of patients had hypertension [11]. Hypertension was uncontrolled in 74% of treated patients, and untreated in 21% of hypertensive patients. Control of BP after kidney transplantation remains also sub-optimal; over 25% of patients remain hypertensive 5 years following the transplantation [12].

EVALUATION OF RENAL HYPERTENSION

The same definition of hypertension is used for children with renal disease as for healthy ones [13]. Currently, using casual BP measurements and according to the criteria of

the Fourth Report on the Diagnosis, Evaluation, and Treatment of High Blood Pressure in Children and Adolescents, hypertension is defined as average systolic and diastolic BP >95th percentile for age, gender, and height measured on at least three separate occasions [14]. Defining hypertension in the neonate is based on published norms for gestational and post-natal age [15, 16].

Casual BP should be measured when the patient is calm using validated, periodically checked and calibrated BP devices with the appropriately sized cuff [17]. In hemodialysis patients the cuff should be applied to the non-fistula arm. Casual BP recordings obtained by oscillometric devices have to be regularly checked by auscultatory methods (ideally with a mercury manometer) because, compared with auscultation, the oscillometric device significantly overestimates both systolic and diastolic BP, leading to frequent misclassification of BP status [18]. However, oscillometric method is preferred for non-invasive BP measurement in infants, as the Korotkoff sounds are often difficult to hear [19]. In addition, oscillometric method is preferred method for home BP monitoring. In children with the chronic renal failure, home BP monitoring was found to be superior to clinic BP measurement in predicting ambulatory BP (ABPM), but neither clinic nor home BP monitoring detected hypertension with enough sensitivity to replace ABPM [20].

ABPM has become the method of choice for diagnosis and therapeutic monitoring of arterial hypertension in pediatric and adult renal patients [21, 22]. It is without observer bias and “white coat” effect. ABPM provides more representative observation of BP throughout day and night in non-medical environment. It allows quantifying the circadian and ultradian BP variability [23]. ABPM is especially helpful in hemodialysis patients because it enables better recognition of intra- and post-dialytic (particular nocturnal) BP changes when continued over 24 or 48 h [24, 25]. Furthermore, ABPM is superior to casual BP concerning better correlation with target-organ damage such as the left ventricular hypertrophy and the ability to diagnose masked hypertension (i.e., normal casual BP but increased ambulatory daytime BP) in children with CKD stage 5 and after renal transplantation [26, 27]. Finally, the results of ABPM are more closely related to renal function in transplanted patients than the results of casual BP [28]. Therefore, ABPM should be performed regularly in all patients on RRT, at least every 6–12 months, regardless of casual BP values.

Together casual and ambulatory BP measurements provide more powerful means of diagnosing hypertension [17, 29]. True hypertension and true normotension are conditions in which casual and ABPM agree. Alternatively, white coat hypertension is a condition in which casual measurements are consistently elevated while ambulatory measurements are normal, and masked hypertension is the inverse condition in which casual measurements are normal but ambulatory measurements are elevated [27]. BP load is defined as the percentage of valid ambulatory BP measures above the set threshold value, such as the 95th percentile of BP for gender and height [30], while normal

nocturnal BP dipping is generally defined as nocturnal decline of mean systolic and diastolic ABPM level by at least 10%. In growth retarded CKD patients, normative data for casual BP should be taken for the 5th–95th height percentile and normative data for ABPM for the patient's height regardless of the patient's age.

CARDIOVASCULAR DISORDERS IN CHILDREN WITH RENAL HYPERTENSION

The cardiovascular disorder (CVD) is the main risk factor of morbidity and mortality in CKD patients, especially of those on RRT [31]. Despite decades of improvements in care for children with the end-stage renal disease, recent epidemiological studies have demonstrated highly increased risk of cardiovascular mortality as the patients survive to adulthood [32, 33, 34]. The risk is sufficiently high as to place children with CKD in the highest American Heart Association cardiovascular risk category, on par with type 1 diabetes and familial hypercholesterolemia [35].

Four main structural abnormalities of the heart have been described in CKD patients: (1) left ventricle (LV) hypertrophy (LVH); (2) expansion of the nonvascular cardiac interstitium leading to intracardial fibrosis; (3) changes of the vascular architecture (thickening of intramyocardial arterioles and reduction of capillary length density); and (4) myocardial calcification [36]. LVH is the most relevant cardiac abnormality in children with CKD5. Two forms of LVH may be distinguished [37]. Concentric (or symmetric) LVH, caused by the pressure overload, leads to disproportionate overgrowth of cardiomyocytes with thickening of both interventricular septum and left ventricular posterior wall. Eccentric (or asymmetric) LVH, caused mainly by volume overload, results primarily in dilatation of the LV chamber, and increased wall thickness sufficient to counterbalance the dilatation with predominant thickening of the interventricular septum. In CKD5, both forms of LVH may be present and have been described in dialyzed children in 70–80% of cases [38]. Concentric left ventricle remodeling may be also present in patients without LVH. Although LVH is an adaptive response to chronic pressure and volume overload (allowing maintenance of systolic function), its persistence may become detrimental because it impairs diastolic compliance and reduces coronary perfusion reserve. Reduced diastolic filling is closely associated with LVH and increased stiffness of the LV chamber owing to collagen accumulation.

In parallel with cardiac abnormalities, hypertension induces alterations in the structure and function of the arterial tree manifested as coronary calcifications and wall thickening of the carotid arteries. It can be in the form of Mönckeberg sclerosis that is a particular type of arterial medial calcification; in addition, patients with CKD can develop atherosclerotic vascular disease – a form of intimal calcification [39]. The key CVD-related risk factors include “traditional” ones (hypertension, dyslipidemia, insulin resistance, increased lipoprotein (a), obesity as well

as malnutrition) and uremia-related factors of which the most common in children are deregulation of the calcium, phosphorus-parathormone (Ca-P-PTH) and vitamin D axis [39]. Once vascular damage and calcification begin, they progress inexorably in uremic patients and may be only partially reversed after successful renal transplantation. Given the known prognostic significance of cardiovascular lesions and hypertensive end organ damage, early and regularly monitoring cardiac function and geometry (echocardiography) is required even in the absence of any clinical signs of CVD. Additional methods to identify increased intravascular volume include bioimpedance, sonography of the inferior vena cava diameter and determination of the ANP in plasma, as well as monitoring of hematocrit. Until data from longitudinal follow-up studies become available, serial carotid artery intima media thickness, pulse wave velocity and multi-slice CT for coronary artery calcification would be useful only for research purpose or in CKD patients at high risk for CVD.

TREATMENT OF RENAL HYPERTENSION

Therapeutic management of hypertension reduces mortality and sequels of life-threatening conditions. It reduces left ventricular hypertrophy and also the rate of progression to end-stage renal disease [40]. The results of ESCAPE trial showed that low normal BP (<75 percentile in CKD patients without proteinuria and <50 percentile in those with proteinuria) improved renal survival and contributed to regression of CVD [41].

If an identified treatable cause of hypertension was detected (such as renal artery stenosis, vasculitis, glomerulonephritis), the primary disease, leading to BP elevation, should be treated [42, 43]. Otherwise, adequate pharmacotherapy along with strict volume control and other lifestyle modifications should be helpful in BP normalization. RAS antagonists are considered the first choice pharmacological option in patients with hypertensive and/or proteinuric CKD. However, the use of more than one drug with different mechanism of action is often required for effective lowering of blood pressure. In an individualized approach, the initial antihypertensive drug is chosen on the basis of presumed mechanism and severity of hypertension; concomitant diseases and therapies; availability of appropriate formulations (e.g., suspension and dosage choices); and, when available, pediatric safety, pharmacokinetics, and efficacy data. The choice of additional antihypertensive drugs in children with CKD is largely arbitrary [41]. Dihydropyridine calcium channel blockers have no antiproteinuric effect and may actually promote proteinuria and more rapid CKD progression, while non-dihydropyridine calcium channel blockers (diltiazem and verapamil) are antiproteinuric and therefore potentially renoprotective, but have weaker effect on blood pressure. The use of β -receptor blockers seems rational in view of the sympathetic over-activation in CKD. Newer β -blockers, e.g., carvedilol, have significantly higher antiproteinuric effect than atenolol in comparable blood pressure reduction.

Once blood pressure is controlled for 6–12 months and target-organ damage has regressed or resolved, an attempt to decrease the dosage or number of antihypertensive medications should be considered.

Having in mind that hypervolemia is the main contributing risk factor of hypertension in uremic patients, an appropriate initial management of hypertension in a dialyzed child will be gradual fluid extraction to control BP and achieve an ideal “dry weight,” i.e., the weight at which most of the excess fluid has been extracted. Anti-hypertensive drugs should be used in dialyzed children only if BP remained elevated, despite seemingly adequate volume and sodium control. The target “dry weight” has to be periodically reassessed and adjusted according to the child’s growth and changes in muscle or fat mass. The dialysis prescription often has to be modified for better control of BP, e.g., switching to longer, more frequent (e.g., daily) or nocturnal hemodialysis sessions or by minimizing the sodium content in food and dialysate fluid. Nevertheless, long dialysis vintage has been implicated in all studies as a significant and independent risk factor of CVD

development. Therefore, every effort must be made to prepare a child for preemptive renal transplantation whenever feasible.

CONCLUSION

Hypertension is one of the most common cardiovascular risk factors in children with CKD, but it is also often underdiagnosed and undertreated. A careful measurement of blood pressure should result in early detection of hypertension in patients with CKD. The choice of antihypertensive treatment should be tailored to the main contributing risk factor of hypertension.

ACKNOWLEDGEMENT

This manuscript was supported by the Ministry of Education, Science and Environmental Protection of the Government of Serbia, grant 175079.

REFERENCES

1. Flynn JT, Alderman MH. Characteristics of children with primary hypertension seen at a referral center. *Pediatr Nephrol.* 2005; 20:961-6.
2. Mitsnefes M, Stablein D. Hypertension in pediatric patients on long term dialysis: a report of the North American Pediatric Renal Transplant Cooperative Study (NAPRTCS). *Am J Kidney Dis.* 2005; 45:309-15.
3. Litwin M, Wühl E, Jourdan C, Trelewicz J, Neimirska A, Fahr K, et al. Altered morphologic properties of large arteries in children with chronic renal failure and after transplantation. *J Am Soc Nephrol.* 2005; 16:1494-1500.
4. Wühl E, Schaefer F, Mehls O. Prevalence and current treatment policies of hypertension and proteinuria in children with chronic renal failure in Europe. In: Timio M, Wizemann V, Venanzi S, editors. *Cardionephrology*. Cosenza: Editoriale Bios; 1999. p.85-88.
5. Goonasekera CDA, Shan V, Wade AM, Barrat TM, Dillon MJ. 15-year follow-up of renin and blood pressure in reflux nephropathy. *Lancet.* 1996; 347:640-3.
6. Zhang Y, Bailey RR. A long term follow-up of adults with reflux nephropathy. *NZ Med J.* 1995; 108:142-4.
7. Tullus K, Brennan E, Hamilton G, Lord R, McLaren CA, Marks SD, et al. Renovascular hypertension in children. *Lancet.* 2008; 371:1453-63.
8. Tullus K. Renal artery stenosis: is angiography still the gold standard in 2011? *Pediatr Nephrol.* 2011; 26:833-7.
9. Kramer AM, van Stralen KJ, Jager KJ, Schaefer F, Verrina E, Seeman T, et al. Demographics of blood pressure and hypertension in children on renal replacement therapy in Europe. *Kidney Int.* 2011; 80:1092-8.
10. Halbach MH, Martz K, Mattoo T, Flynn J. Predictors of blood pressure and its control in pediatric patients receiving dialysis. *J Pediatr.* 2012; 160:621-5.
11. Chavers BM, Craig AS, Daniels FX, Chen SC, Collins AJ, Frankenfield L, et al. Hypertension in pediatric long-term hemodialysis patients in the United States. *Clin J Am Soc Nephrol.* 2009; 4:1363-9.
12. Sinha MD, Kerecuk L, Gilg J, Reid CJ, on behalf of the British Association for Paediatric Nephrology. Systemic arterial hypertension in children following renal transplantation: prevalence and risk factors. *Nephrol Dial Transplant.* 2012; 27(8):3359-68.
13. Lurbe E, Cifkova R, Cruickshank JK, Dillon MJ, Ferreira I, Invitti C, et al. Management of high blood pressure in children and adolescents: recommendations of the European Society of Hypertension. *J Hypertens.* 2009; 27:1719-42.
14. National High Blood Pressure Education Program Working Group on High Blood Pressure in Children and Adolescents. The Fourth Report on the diagnosis, evaluation, and treatment of high blood pressure in children and adolescents. *Pediatrics.* 2004; 114:555-76.
15. Zubrow AB, Hulman S, Kushner H, Falkner B. Determinants of blood pressure in infants admitted to neonatal intensive care units: a prospective multicenter study. *J Perinatol.* 1995; 15:470-9.
16. Flynn JT. Neonatal hypertension: diagnosis and management. *Pediatr Nephrol.* 2000; 14:332-41.
17. Pickering TG, Hall JE, Appel LJ, Falkner BE, Graves J, Hill MN, et al. Recommendations for blood pressure measurement in humans and experimental animals: part 1: blood pressure measurements in humans: a statement for professionals from the Subcommittee of Professional and Public Education of the American Heart Association Council on High Blood Pressure Research. *Circulation.* 2005; 111:697-716.
18. Flynn JT, Pierce CB, Miller ER 3d, Charleston J, Samuels JA, Kupferman J, et al. Reliability of resting blood pressure measurement and classification using an oscillometric device in children with chronic kidney disease. *J Pediatr.* 2012; 160:434-40.
19. Chiolerio A, Paradis G, Lambert M. Accuracy of oscillometric devices in children and adults. *Blood Press.* 2010; 19:254-9.
20. Wühl E, Hadtstein C, Mehls O, Shaefer F; ESCAPE Trial Group. Home, clinic, and ambulatory blood pressure monitoring in children with chronic renal failure. *Pediatr Res.* 2004; 55:492-7.
21. Peco-Antić A, Pejčić I, Stojanov V, Kostić M, Kruščić D, Jovanović O, et al. Continuous ambulatory measurement of blood pressure in children – personal experience. *Srp Arh Celok Lek.* 1997; 125:197-202.
22. Wühl E. Ambulatory blood pressure monitoring methodology and norms in children. In: Flynn JT, Ingelfinger JR, Portman RJ, editors. *Pediatric Hypertension*. 2nd ed. New York: Humana Press; 2011. p.161-178.
23. Wühl E, Hadtstein C, Mehls O, Schaefer F; ESCAPE Trial Group. Ultradian but not circadian blood pressure rhythms correlate with renal dysfunction in children with chronic renal failure. *J Am Soc Nephrol.* 2005; 16:746-54.
24. Conlon PJ, Walshe JJ, Heinle S. Predialysis systolic blood pressure correlates strongly with mean 24-hour systolic blood pressure and left ventricular mass in stable hemodialysis patients. *J Am Soc Nephrol.* 1996; 7:2658-63.
25. Agarwal R, Metiku T, Tegegne GC, Light RP, Bunaye Z, Bekele DM, et al. Diagnosis hypertension by intradialytic blood pressure recordings. *Clin J Am Soc Nephrol.* 2008; 3:1364-72.
26. Mitsnefes MM, Portman RJ. Ambulatory blood pressure monitoring in pediatric renal transplantation. *Pediatr Transplant.* 2003; 7:86-92.
27. Paripović D, Kostić M, Spasojević B, Krusić D, Peco-Antić A. Masked hypertension and hidden uncontrolled hypertension after renal transplantation. *Pediatr Nephrol.* 2010; 25:1719-24.

28. Jacobi J, Rockstroh J, John S, Schreiber M, Schlaich MP, Neumayer HH, et al. Prospective analysis of the value of 24-hour ambulatory blood pressure on renal function after kidney transplantation. *Transplantation*. 2000; 70:819-27.
29. Lurbe E, Sorof JM, Daniels SR. Clinical and research aspects of ambulatory blood pressure monitoring in children. *J Pediatr*. 2004; 144:7-16.
30. Soergel M, Kirschstein M, Busch C, Danne T, Gellermann J, Holl R, et al. Oscillometric twenty-four-hour ambulatory blood pressure values in healthy children and adolescents: a multicenter trial including 1141 subjects. *J Pediatr*. 1997; 130:178-84.
31. Wühl E, Witte K, Soergel M, Mehls O, Schaefer F, for the German Working Group on Pediatric Hypertension. Distribution of 24-h ambulatory blood pressure in children: normalized reference values and role of body dimensions. *J Hypertens*. 2002; 20:1995-2007.
32. Parekh RS, Carroll CE, Wolfe RA, Port EK. Cardiovascular mortality in children and young adults with end stage kidney disease. *J Pediatr*. 2002; 141:191-7.
33. Groothoff JW, Gruppen MP, Offringa M, Hutten J, Lilien MR, van de Kar NJ, et al. Mortality and causes of death of end-stage renal disease in children: a Dutch cohort study. *Kidney Int*. 2002; 61:621-9.
34. McDonald SP, Craig JC. Australian and New Zealand Paediatric Nephrology Association: Long-term survival of children with end stage renal disease. *N Engl J Med*. 2004; 350:2654-62.
35. Kavey RW, Allade V, Daniels SR, Hayman LL, McCrindle BW, Newburger JW, et al. Cardiovascular risk reduction in high-risk pediatric patients: A scientific statement from the American Heart Association Expert Panel on Population and Prevention Science: The Councils on Cardiovascular Disease in the Young, Epidemiology and Prevention, Nutrition, Physical Activity and Metabolism, High Blood Pressure Research, Cardiovascular Nursing, and the Kidney in Heart Disease; and the Interdisciplinary Working Group on Quality of Care and Outcomes Research: Endorsed by the American Academy of Pediatrics. *Circulation*. 2006; 114:2710-38.
36. Ritz E, Amann K, Törnig J, Schwartz U, Stein G. Some cardiac abnormalities in renal failure. *Adv Nephrol*. 1997; 27:85-103.
37. London GM. The concept of ventricular vascular coupling: functional and structural alterations of the heart and arterial vessels of the heart go in parallel. *Nephrol Dial Transplant*. 1998; 13:250-3.
38. Mitsnefes MM, Barletta GM, Dresner IG, Chand DH, Geary D, Lin JJ, et al. Severe cardiac hypertrophy and long-term dialysis: the Midwest Pediatric Nephrology Consortium study. *Pediatr Nephrol*. 2006; 21:1167-70.
39. Shroff R, Quinlan C, Mitsnefes M. Uraemic vasculopathy in children with chronic kidney disease: prevention or damage limitation? *Pediatr Nephrol*. 2011; 26:853-65.
40. Wühl E, Trivelli A, Picca S, Litwin M, Peco-Antic A, Zurowska A, et al. Strict blood pressure control and renal failure progression in children. *N Engl J Med*. 2009; 361:1639-50.
41. Schaefer F. Hypertension in chronic kidney disease. Ambulatory blood pressure monitoring methodology and norms in children. In: Flynn JT, Ingelfinger JR, Portman RJ, editors. *Pediatric Hypertension*. 2nd ed. New York: Humana Press; 2011. p.397-412.
42. Peco-Antic A, Djukic M, Sagic D, Krusic D, Krstic Z. Severe renovascular hypertension in an infant with congenital solitary pelvic kidney. *Pediatr Nephrol*. 2006; 21:437-40.
43. Djukic M, Peco-Antic A, Sagic D. Dilatation of the renal artery in an infant: 5 years later. *J Vasc Interv Radiol*. 2012; 23(7):925.

Ренална хипертензија и кардиоваскуларна болест код деце с хроничним обољењем бубрега

Амира Пецо-Антић^{1,2}, Душан Париповић²

¹Медицински факултет, Универзитет у Београду, Београд, Србија;

²Нефролошко одељење, Универзитетска деčја клиника, Београд, Србија

КРАТАК САДРЖАЈ

Ренална хипертензија је једна од најранијих и најчешћих компликација хроничне болести бубрега (ХББ) код деце, али често остаје препозната и нелечена. За класично, интермитентно мерење крвног притиска најбоља је аускулаторна метода, док се за амбулаторно мерење најчешће примењује осцилометријска метода. Заједничка примена обе ове методе побољшава дијагностиковање и класификацију хипертензије код деце са ХББ. Маскирана хипертензија је стање повишеног амбулаторног и нормалног класично измереног крвног притиска. Ризик од кардиоваскуларног морбидитета и mortalитета је већи код маскиране хипертензије него код нормотензивне деце. Деца и адолесценти са ХББ су у високом ризику за кардиоваскуларне болести, које су главни узрок смрти у терминалном стадијуму ХББ. Хипертрофија левог срца је најбоље доказано хипертен-

зивно органско оштећење код деце и адолесцената са ХББ. На основу јасних доказа за корелацију хипертензије с кардиоваскуларним морбидитетом, mortalитетом и функцијом бубрега, реналну хипертензију треба лечити агресивним методама. Циљни крвни притисак код деце са ХББ је на нивоу ниских нормалних вредности: <75 перцентила код деце без протеинурије, односно <50 перцентила код болесника с протеинуријом. Код оболелих од ХББ стадијума 2–4 лек избора за хипертензију су антагонисти система ренин-ангиотензин, а код болесника у терминалном стадијуму главна терапијска мера је отклањање хиперволемије. Успешна трансплантација бубрега отклања или побољшава уремичне факторе ризика за кардиоваскуларна обољења, чиме се побољшава преживљавање болесника.

Кључне речи: инсуфицијенција бубрега; кардиоваскуларне болести; хипертрофија левог срца; деца

Примљен • Received: 17/07/2012

Ревизија • Revision: 02/06/2013

Прихваћен • Accepted: 29/11/2013

Миоми утеруса у трудноћи, током порођаја и у пуерперијуму

Радмила Спарич

Клиника за гинекологију и акушерство, Клинички центар Србије, Београд, Србија

КРАТАК САДРЖАЈ

Миоми су најчешћи бенигни тумори гениталних органа жена у репродуктивном периоду. Остваривање репродуктивне функције у каснијем животном добу, уз све чешћу примену асистираних репродуктивних технологија, доводи до све већег броја трудноћа компликованих миомима. Њихова величина се може мењати током трудноће, а промене су најчешће индивидуалне. Већина миома престаје да расте или се смањује током пуерперијума. Ефекат миома на трудноћу зависи од њиховог броја, локализације и величине. Механизми којима миоми доводе до настанка перинаталних компликација нису потпуно јасни. Миоми у трудноћи могу бити узрок настанка бројних перинаталних компликација, као што су крварење у трудноћи, спонтани побачаји, бол услед црвене дегенерације, коси и попречни положај плода, превремени порођај, превремена руптура плодних овојака, превремено одлубљивање постељице и ненапредовање порођаја, а повезују се и с већом учесталошћу царских резова, операционих вагиналних порођаја, атоније утеруса и постпарталних крварења. Постпарталне хистеректомије код ових жена су такође чешће него у општој популацији. Постпарталне инфекције су чешће код жена с миомима материце, а миоми могу бити и узрок резидуе плаценте после порођаја. Најчешћи узрок морбидитета новорођенчади мајки с миомима је прематуритет с обзиром на то да се трудноће жена с миомима завршавају у млађој гестационој старости. Праћење трудноће компликоване миомима у основи се не разликује од праћења нормалне трудноће. Лечење се своди на мировање и клиничко праћење, примену симптоматске терапије уколико се појави бол и интензиван надзор стања фетуса, док се у акутним стањима прибегава хируршкој интервенцији.

Кључне речи: миом; трудноћа; порођај; пуерперијум; фетус

УВОД

Миоми су најчешћи бенигни тумори гениталних органа жена у репродуктивном периоду [1]. Преваленција миома у трудноћи је између 0,1% и 3,9% [2]. Број трудница с миомима је од 2,7% у општој популацији, преко 12,6% у популацији подвргнутој поступку асистираних репродукција, до 25% међу женама старије животне доби које се подвргавају поступку фертилизације *in vitro* с јајним ћелијама даваоца [3]. Студије засноване на ултразвучном прегледу трудница показују већу преваленцију миома од раније изведених истраживања, првенствено заснованих на клиничким налазима и визуелизацији миома током царског реза, те се у студијама новијег датума наводи преваленција и од 10% до 20% [4].

Постављање дијагнозе миома у трудноћи није једноставно. Клиничким прегледом се може дијагностиковати 42% миома пречника већег од 50 mm и само 12,5% пречника 30–50 mm [5]. Ултразвук игра главну улогу у постављању дијагнозе миома у трудноћи (Слика 1) [6]. Применом колор доплера или понављањем ултразвучног прегледа након 30 минута могу се диференцирати миоми у односу на контракције материце [7].

Подаци из литературе о утицају трудноће на величину миома су опречни, а промене су најчешће индивидуалне [8, 9]. Ли (Lee)

и сарадници [5] су у студији објављеној 2010. године показали да 60–78% миома не расте значајно током трудноће. Миоми који промене величину током трудноће углавном расту у првом триместру, нарочито у првих десет недеља гестације [5]. Такође се сматра да мали миоми расту током првог и другог триместра, а да се смањују током трећег, док димензије великих миома остају непромењене или се чак смањују у трудноћи [5]. Већина миома не мења своју величину значајно током пуерперијума, мада се код 7,8% жена она смањује до 10% [5]. Миоми који инволуирају након порођаја углавном достижу величину коју су имали пре трудноће до трећег постпарталног месеца [10].

МИОМИ У ТРУДНОЋИ И НА ПОРОЂАЈУ

У већини случајева миоми не изазивају компликације током трудноће [8]. Сматра се да 10–30% жена с миомима има компликације у трудноћи [5]. Подаци из литературе показују да се миоми у трудноћи повезују с настанком бројних перинаталних компликација, као што су крварење у трудноћи, спонтани побачаји, бол услед црвене дегенерације, коси и попречни положај плода, превремени порођај, превремена руптура плодних овојака, превремено одлубљивање постељице и застој порођаја, те с већом учесталошћу

Correspondence to:

Radmila SPARIĆ
Klinika za ginekologiju i
akušerstvo
Klinički centar Srbije
Višegradska 26, 11000 Beograd
Srbija
radmila@rcub.bg.ac.rs



Слика 1. Ултразвучна слика миома задњег зида утеруса у трудноћи
Figure 1. Ultrasonogram of the posterior wall myoma in pregnancy

царских резова, операционих вагиналних порођаја, атоније материце и постпарталног крварења [11, 12, 13]. Проблем студија које се баве утицајем миома на трудноћу је пристрасност при одабиру испитаница (енгл. *selection bias*), недовољна величина узорка, разлике у критеријумима за укључивање у студију, непостојање контролне групе, реткост појаве компликација и постојање бројних реметилачких (тзв. конфаундинг) фактора [5, 8]. Као последица свега наведеног, подаци студија које су испитивале корелацију миома и појаве перинаталних компликација су недоследни [5, 12].

Утицај миома на трудноћу зависи од њиховог броја, локализације и величине [14, 15, 16]. Студије које су истраживале утицај величине, броја и локализације миома на перинатални исход указују на општи утицај миома на материцу и плаценту, односно на појаву перинаталних компликација [12]. Локализација миома у односу на локализацију постељице има значајан ефекат на исход трудноће [17]. Миоми на петљци и супсерозни миоми с више од 50% укупног волумена миома ван миометријума ретко узрокују компликације у трудноћи [3]. Механизми којима миоми доводе до настанка перинаталних компликација нису потпуно јасни [18]. Сматра се да већина компликација потиче од њиховог механичког дејства на gravidну материцу [18]. Миоми утичу на растезање материце, доводе до промена у структури ендометријума, утичу и на ефикасност контракција материце, а могу представљати препреку током порођаја [6, 12]. Миоми такође могу ограничити покрете плода током трудноће [19].

Подаци из литературе указују на то да је стопа спонтаних побачаја у другом и трећем триместру већа код трудница с миомима и да миоми могу бити узрок и понављаних спонтаних побачаја [5, 8]. Студија Бенсона (*Benson*) и сарадника [20] из 2001. године указала је на готово двоструко већу стопу побачаја у групи од 143 пацијенткиње са ултразвучно дијагностикованим миомима у првом триместру, у поређењу са женама истог животног доба без миома (14,0% према 7,6%). Стопа спонтаних побачаја је виша код жена с мултиплим миомима у односу на оне с изолованим миомима (23,6% према 8,0%), док величина миома нема утицаја

[5, 18]. Миоми се бележе код 14–18% жена с понављаним побачајима, а у 50% ових случајева није пронађен ниједан други узрок побачаја [21].

Локализација миома је важан фактор ризика за настанак побачаја. Побачаји су чешћи код жена с миомима у пределу тела материце него код оних код којих су миоми у пределу доњег сегмента [5]. Такође су чешћи у случајевима имплантације на месту субмукозних миома [22]. У случајевима интрамуралних и субмукозних миома стопа побачаја је 40% у првом и 17% у другом триместру [18, 22]. Тачан механизам којим миоми доводе до спонтаних побачаја није јасан. Као могући узроци наводе се повећана контрактилност утеруса, механичка компресија од стране миома и поремећај снабдевања крвљу постељице и плода [5]. Бројне студије су показале да су крварења у првом триместру и спонтани побачаји чешћи када су миоми у близини постељице [3, 18, 22]. Близина миома постељици је значајнија него величина миома [5, 22].

Иако многе студије наводе смањење стопе спонтаних побачаја код жена с миомима након миомектомије, она је и даље значајно виша у односу на стопу у општој популацији. Могући узрок ове појаве је животна доб трудница [20]. Различити типови миома на различите начине утичу на исход трудноће, те су и ефекти њиховог хируршког лечења на исход трудноће различити [22]. У литератури нема довољно података о утицају миомектомије на перинатални исход [23]. Најчешће цитирана студија о утицају миома на плодност је анализа студија објављених од 1957. до 1980. године, којом је показано смањење стопе спонтаних побачаја са 41% на 19% у групи симптоматских жена након миомектомије [24]. Поједини аутори наводе да нема доказа за повећан ризик спонтаних побачаја у трудноћама након миомектомије [23]. Интрамурални и супсерозни миоми пречника мањег од 30 *mm* не сматрају се клинички значајним за настанак спонтаних побачаја [22]. Кампо (*Campo*) и сарадници [25] су показали да миомектомија смањује инциденцију спонтаних побачаја чак и код постојања супсерозних и интрамуралних миома. Испитујући учесталост спонтаних побачаја пре и после хируршког захвата код 128 жена млађих од 42 године, ови истраживачи су запазили да се учесталост од 61,5% пре операције смањила на 13,8% после миомектомије [25]. Такође су показали да, иако на стопу трудноћа након миомектомије утиче старост труднице, и величина миома представља битан прогностички фактор с обзиром на то да је стопа спонтано насталих трудноћа након операције у овој студији била виша код жена којима су одстрањени већи миоми [25]. Миомектомија пре трудноће се не саветује женама које су имале некомпиковану трудноћу при постојању миома, али се саветује онима које су имале компликације у трудноћи изазване миомима [11]. При доношењу одлуке о миомектомији пре планиране трудноће треба имати у виду и могуће хируршке и анестезиолошке компликације, повишен ризик од хируршког порођаја и руптуре материце у каснијим трудноћама, као и трошкове лечења [12].

Укљештење гравидне материце је ретка компликација трудноће која се јавља почетком другог триместра. Осим код ретроверзије материце, обично је идиопатска, али у литератури постоје прикази болесница у којима се као узрок наводе и миоми материце [26].

Инвазивни дијагностички поступци у трудноћи, као што су биопсија хорионских чупица, амниоцентеза и кордоцентеза, а нарочито интраутерина трансфузија, технички су значајно отежани када постоје миоми, те је код трудница с миомима чешћа појава неуспеха њиховог извођења [7].

Најчешћа компликација миома у трудноћи јесте појава бола у абдомену, што је последица црвене дегенерације, чија је учесталост око 5% [8, 27]. Узроци који доводе до њеног настанка још нису познати, а о томе постоје три теорије. Прва је да, због наглог раста миома, васкуларизација миома постаје недовољна, што доводи до ткивне аноксије, некрозе и инфаркције. Према другој теорији, раст материце изазива промене архитектонику крвних судова, доводећи до исхемије и некрозе миома чак и кад миоми не расту нагло. Трећа теорија указује на значајну улогу простагландина који се ослобађају из хелија миома у механизму настанка бола, чему у прилог говори дејство нестероидних антиреуматика у купирању болова [5]. Раније се сматрало да појава бола не зависи од апсолутне величине миома, мада новије студије показују да се он чешће јавља код трудница с миомима пречника већег од 50 mm [3, 5]. Клинички, синдром болног миома, који је повезан са црвеном дегенерацијом, описује се као бол у пределу миома или општа болна осетљивост после палпације, с повишеном телесном температуром, леукоцитозом, муклом и повраћањем. Уколико су заступљени јаки болови, ултразвуком се чешће уочавају анехогена и цистична поља у миомима, мада се сличне ултразвучне слике могу видети и код асимптоматских миома [3]. Терапијски приступ овом синдрому је конзервативан: дужи боравак у постељи и примена аналгетика [5]. Бол некада може бити таквог интензитета да захтева хоспитализацију, примену наркотичких аналгетика и епидуралне аналгезије [3]. Експлоративна лапаротомија у трудноћи је индикована једино код погоршања општег стања пацијенткиње, с повишеном температуром, генерализованом перитонеалном иритацијом, израженом леукоцитозом и крварењем. Остали узроци бола у абдомену трудница с миомима су увртање миома на петелци и, што је ређе, укљештење миома и увртање материце у целини [15, 28].

Код трудница с миомима већи је ризик од превременог порођаја у односу на оне које немају миоме (16,0% према 10,8%) [5]. Мултипли и миоми локализовани у близини постељице додатно повећавају овај ризик [5]. Кидваји (Qidwai) и сарадници [29] су забележили стопу превремених порођаја код трудница с миомима од 19,2%. У студији Стоута (Stout) и сарадника [12] доказани су статистички значајно мања гестациона старост и телесна маса новорођенчета код жена с миомима у односу на контролну групу испитаница без миома. Ови аутори су установили повећану инци-

денцију превременог порођаја у трудноћама компликованим миомима, као и претерминске превремене руптуре плодових овојака, у поређењу с трудноћама које нису компликоване миомима [12]. Мишљења у вези с улогом миома у настанку претерминске превремене руптуре плодових овојака и даље су опречна с обзиром на то да постоје и истраживања у којима није доказан већи ризик од њеног настанка код трудница с миомима [29].

Малпрезентација плода се бележи у 13% трудноћа компликованих миомима [5, 6]. Чешће се јавља у случају великих, мултиплих и миома локализованих у пределу доњег сегмента материце [5, 6]. Кидваји и сарадници [29] наводе учесталост феталне малпрезентације од чак 24,1%. Малпрезентација плода у њиховом истраживању била је значајно чешћа код трудница с миомима већим од 100 mm у поређењу с оним чији су миоми били пречника мањег од 100 mm (23,1% према 10,4%) [29]. Према подацима Коронадове (Coronado) и сарадника [19], карлична презентација плода се јавља четири пута чешће код трудница с миомима.

Порођај код трудноћа компликованих миомима продужен је због слабих контракција и/или инерције утеруса. Коронадова и сарадници [19] су у студији објављеној 2000. године дошли до више инциденције дисточије код жена с миомима. Опструкција порођаја је ретка компликација код великих предњачећих миома (Слика 2).

Висок проценат царских резова код жена с миомима утврђен је још током прве половине двадесетог века. Царски рез је чешћи код жена с миомима него код трудница без миома (23% према 12%) [11]. До сличних података дошли су и други истраживачи [12]. Кидваји и сарадници [29] су показали да је ултразвучно откривање миома у трудноћи, независно од величине миома, повезано са значајно вишим ризиком од порођаја царским резом. Стопа царских резова у овој студији била је 49,1%. Вергани (Vergani) и сарадници [30] такође наводе да је стопа царских резова значајно виша код жена с миомима и да се ризик повећава за 26% за сваких 10 mm повећања пречника миома у групи трудница с миомима од 50 mm или више коју су испитивали. Предиспонирајући фактори за порођај царским резом су: коси



Слика 2. Ултразвучна слика миома превија
Figure 2. Ultrasound image of myoma previum



Слика 3. Миом превија на предњем зиду утеруса током царског реза

Figure 3. Anterior myoma previum during cesarean section

и попречни положај плода, велики миоми, мултипли миоми, субмукозни миоми, миоми у пределу доњег сегмента материце и дисточија [3, 5, 6, 30]. Већина аутора је сагласна да се постојање миома не сматра контраиндикацијом за вагинални порођај [5, 12]. Апсолутна индикација за хируршко завршавање порођаја су само миоми који опструирају порођајни пут (Слика 3).

Постпартално крварење је још једна компликација трудноћа с миомима, те су и постпарталне хистеректомије код ових жена чешће него у општој популацији [5, 13, 31]. Постпартална крварења се јављају код 8,3% трудноћа компликованих миомима [29]. Узроци ових крварења су предњачећа постељица, превремено одлбљивање постељице, атонија утеруса и појава адхерентне постељице.

Код трудница с миомима постојање предњачеће постељице је два пута чешће него у општој популацији [5]. Испитивањем односа између величине миома и локализације плаценте, Стоут и сарадници [12] су указали на чешћу појаву предњачеће постељице код трудница с миомима пречника већег од 50 mm у односу на оне с миомима чији је пречник мањи од 50 mm.

Превремено одлбљивање постељице је ретка, али потенцијално фатална компликација трудноће, а подаци о њеној повезаности с постојањем миома објављени у литератури су неусаглашени [3, 29]. Кидваји и сарадници [29] нису доказали њену повећану учесталост код трудница с миомима. С друге стране, Коронадова и сарадници [19] су установили четири пута чешћу појаву превременог одлбљивања постељице код трудница с миомима. Студије које указују на већи ризик документовале су чешћу појаву при постојању субмукозних и ретроплацентних миома, као и миома запремине веће од 200 cm³ [3, 5]. Могући узрок настанка превременог одлбљивања постељице у овим случајевима могао би бити настанак парцијалне исхемије и некрозе децидуе ретроплацентних миома [5].

Атонија утеруса је узрокована смањеном контрактилношћу утеруса услед постојања миома [3]. Појава адхерентне постељице је чешћа код жена с миомима, независно од локализације миома [5].

Ретка компликација миома у трудноћи је хернијација миома кроз фасцијалне дефекте предњег трбушног зида, у пределу умбиликуса или ингвинума. Ово

стање се може даље компликовати укљештењем и захтевати хируршко лечење [32].

Веома је значајно и питање ризика руптуре материце на ожиљку од миомектомије током трудноће и порођаја код жена којима је претходно урађена миомектомија. У већини студија о овом проблему наводе се недовољни подаци на основу којих би се могла прецизно дефинисати инциденција руптуре [8]. Руптура материце у трудноћи и на порођају на ожиљку од претходне миомектомије описана је како код жена оперисаних лапаротомијом, тако и код лапароскопски оперисаних жена, мада су подаци о конкретном степеном ризика објављени у литератури опречни [23]. Не постоји сагласност око тога да ли лапароскопски приступ повећава ризик од руптуре материце. Питање интегритета ожиљка након лапароскопске миомектомије је посебно предмет расправа. Поједини аутори постављају питање да ли је зид материце након лапароскопског ушивања подједнако интактан као и после ушивања у више слојева при отвореној миомектомији [33]. Насупрот томе, постоје мишљења да након лапароскопских операција миома ова компликација настаје чешће као последица неодговарајуће реконструкције миометријума приликом лапароскопске миомектомије, јер техника класичне отворене миомектомије подразумева шивење материце у неколико слојева, уз потпуно затварање насталог оштећења на материци, што теоретски смањује ризик од руптуре материце у каснијим трудноћама [34]. Лапароскопска реконструкција зида материце шавовима је технички значајно тежа [35]. Други фактор за који се сматра да угрожава интегритет ожиљка након лапароскопске интервенције јесте коагулација ткива, која настаје као последица честе примене електрохирургије при лапароскопској дисекцији миома [35]. У литератури се наводи да је ризик од руптуре материце након лапароскопске миомектомије 0,5–1%, а након класичне 0,24–5,3% [5, 25]. Независно од хируршког приступа који је коришћен, ризик од руптуре материце је фактор који доводи до високе стопе царских резова код трудница које су претходно подвргнуте миомектомији [6].

МИОМЕКТОМИЈА ТОКОМ ЦАРСКОГ РЕЗА

Миомектомија током царског реза се годинама сматрала интервенцијом која може бити удружена с високим ризиком за развој интраоперационих и непосредних постоперационих компликација. У литератури старијег датума миомектомија током царског реза се саветује само онда када је то неопходно ради безбедне екстракције плода и ушивања реза на материци [17, 36]. У новије време све је више студија које показују да извођење миомектомије током царског реза не мора бити удружено с повећаним ризиком од појаве компликација [36, 37]. Разлог за преиспитивање ставова о безбедности миомектомије током царског реза су ретке, али веома тешке компликације миома у пуерперијуму, које често захтевају хируршко лечење, а неретко

и постпарталну хистеректомију [38, 39]. Већина аутора је сагласна да су уз миоме на петељци супсерозни миоми они које је могуће безбедно одстранити током царског реза, док се одстрањивање интрамуралних и мултиплих миома не препоручује [36, 37]. Такође, ову операцију треба избегавати у случају миома фундуса и рога материце [36]. Миомектомија током царског реза омогућава извођење две операције у оквиру једне, као и очување материце, при чему се избегавају ризици поновне лапаротомije и анестезије. Одлучујући фактори за доношење одлуке о миомектомији током царског реза су поред анатомске локализације, броја и величине миома, хируршко искуство акушера и сумња на секундарну дегенерацију самог миома [36, 37]. Апсолутна контраиндикација за миомектомију током царског реза је хипотонија материце [36].

МИОМИ У ПУЕРПЕРИЈУМУ

Егзакустосова (*Exacoustos*) и сарадници [17] указали су на чешћу појаву постпарталних инфекција код жена с миомима утеруса. Сматра се да миомии могу бити узрок резидуе плаценте после порођаја и пуерпералне сепсе [8, 13]. У пуерперијуму васкуларизација материце се значајно смањује, што може довести до исхемијске некрозе миома материце. Ово ствара идеалну подлогу за анаеробну инфекцију, што може довести до ендометритиса. Насупрот томе, Кидваји и сарадници [29] нису доказали повишену инциденцију постпарталног ендометритиса код трудница с миомима. Продужено фебрилно стање у постпарталном периоду код пацијенткиња с миомима некада може бити проузроковано контаминацијом некротичних субмукозних миома. Ретко у пуерперијуму може доћи до спонтане експулзије миома у вагину [18]. Појава пиомиома је ретка компликација и настаје обично после порођаја или побачаја услед инфаркције и инфекције миома. Инфекција се обично шири *per continuitatem* из материчне дупље, али може настати и лимфогеним и хематогеним путем. Пиомиоми се манифестују болно осетљивом масом у малој карлици, некада и клиничком сликом акутног абдомена, као



Слика 4. Ултразвучна слика миома утеруса у пуерперијуму
Figure 4. Ultrasound image of the uterine myoma in puerperium

последица руптуре, а ретко могу бити и узрок сепсе [38]. Веома ретко пиомиоми се могу јавити у трудноћи [38]. Лече се хируршки уз примену антибиотика широког спектра дејства [39].

Већина миома утеруса престаје да расте или се смањује током пуерперијума, мада су у литератури описани и случајеви раста миома у пуерперијуму с последичним настанком дегенеративних промена, што може довести до значајних дилема у вези са диференцијалном дијагнозом (Слика 4) [39].

УТИЦАЈ МИОМА НА ФЕТУС

Неонатални исходи трудноћа компликованих миомима се не разликују значајно од трудноћа некомпличованих овим туморима [3, 6]. Постоје студије у којима није показана повезаност миома с настанком интраутериног застоја у расту плода, као и студије које указују на чешћу појаву интраутериног застоја у расту плода, али само при постојању ретроплацентних субмукозних миома [7]. Новија истраживања су показала да миомии не утичу на раст фетуса, док је инциденција рађања деце мале телесне масе за гестацијску старост слична као и у општој популацији [5, 6]. Најчешћи узрок морбидитета новорођенчади мајки с миомима је прематуритет, с обзиром на то да се трудноће жена с миомима завршавају у млађој гестационој старости [3, 12]. Подаци из литературе о утицају миома на интраутерини застој у расту плода су опречни [7]. У истраживању Коронадове и сарадника [19] указано је на повећан ризик нижих Агар скорова у петом минуту живота и мале телесне масе на рођењу деце мајки с миомима. Према резултатима Стоута и сарадника [12], интраутерина смрт плода је два пута чешћа у трудноћама компликованим миомима и на њу не утичу евентуална појава малформација плода или други фактори ризика за интраутерину смрт плода. У више од 50% случајева у испитиваном узорку интраутерина смрт плода је настала након 32. недеље гестације. У групи трудница с миомима код чијих фетуса није дијагностикован интраутерини застој у расту плода у наведеној студији није уочен повећан ризик од интраутерине смрти плода.

Малформације фетуса узроковане механичком компресијом миома веома су ретке. У периоду 1980–2005. године у литератури су објављени један случај аномалија главе плода с интраутериним застојем у расту плода, један случај постуралног деформитета плода, један случај редукционог дефекта екстремитета и један случај деформитета главе плода са тортиколисом [27]. Потенцијалне тератогене ефекте смањења простора микроокружења ембриона узрокованог миомима истраживали су Мацунага (*Matsunaga*) и Шиота (*Shiota*) [40] на ембрионима добијеним након намерног прекида трудноће. Ови аутори су утврдили учесталост од 6,2% конгениталних малформација код жена с миомима, насупрот учесталости од 3,3% код испитаница које нису имале миомии.

ЛЕЧЕЊЕ МИОМА У ТРУДНОЋИ И ПУЕРПЕРИЈУМУ

Праћење трудноће компликоване миомима у основи се не разликује од праћења нормалне трудноће. Терапија се своди на мировање и надгледање, симптоматску терапију уколико се појаве болови и интензиван надзор стања фетуса, док се у акутним стањима прибегава хируршкој интервенцији [7]. Операција у трудноћи неопходна је само код 2% трудница [14]. Индикације за миомектомију у трудноћи су: болови који не пролазе упркос примени конзервативне терапије, нарочито ако су код жене дијагностиковани супсерозни и педункуларни миоми, и убрзан раст миома [5, 7]. У свим случајевима настанка акутног абдомена индикована је експлоративна лапаротомија [10]. Иако је миоме на петељци величине до 5 cm могуће отклонити мањим хируршким захватом, приликом екстирпације некротичних миома субмукозне локализације обично долази до крварења и спонтаног побачаја. Миомектомија у трудноћи значајно повећава инциденцију побачаја и превременог порођаја, а порођај се, због ризика од руптуре материце, углавном врши царским резом [5]. Најчешћа компликација миомектомије у трудноћи је обилно крварење, стање које захтева трансфузију крви [10]. Према подацима из литературе, након миомектомије 93,7% трудноћа се завршава царским резом,

а инциденција хистеректомије након царског реза код ових жена је 4,5% [7].

Имајући у виду чињеницу да само 1% миома дијагностикованих у трудноћи представљају цервикалне миоме, препоруке за њихово лечење објављене у литератури су различите [41]. Уколико нема компликација, саветује се конзервативни терапијски приступ [41]. Ако се примети убрзани раст миома или се сумња на карцином грлића материце, препоручује се биопсија у трудноћи [41]. Индикације за интервенцију у овим случајевима укључују крварење, бол, опструкцију порођајног пута, инфекцију и стазу мокраће [6].

ЗАКЉУЧАК

Имајући у виду технолошки напредак у резолуцији ултразвучних апарата, као и тренд одлагања рађања, може се очекивати повећање преваленције миома у трудноћи у односу на податке раније објављених студија. Ово је значајан изазов за гинекологе и акушере, чија је дужност да помогну побољшање репродуктивног потенцијала жена и спрече евентуалне компликације у трудноћи, на порођају и у пуерперијуму које миоми могу изазвати.

ЛИТЕРАТУРА

1. Sparić R, Hudelist G, Berisavac M, Gudović A, Buzadžić S. Hysterectomy throughout history. *Acta Chir Iugosl.* 2011; 58(4):9-14.
2. De Vivo A, Mancuso A, Giacobbe A, Savasta LM, De Dominicis R, Dugo N, et al. Uterine myomas during pregnancy: a longitudinal sonographic study. *Ultrasound Obstet Gynecol.* 2011; 37(3):361-5.
3. Klatky PC, Tran ND, Caughey AB, Fujimoto VY. Fibroids and reproductive outcomes: a systematic literature review from conception to delivery. *Am J Obstet Gynecol.* 2008; 198(4):357-66.
4. Laughlin SK, Baird DD, Savitz DA, Herring AH, Hartmann KE. Prevalence of uterine leiomyomas in the first trimester of pregnancy. *Obstet Gynecol.* 2009; 113(3):630-5.
5. Lee HJ, Norwitz ER, Shaw J. Contemporary management of fibroids in pregnancy. *Rev Obstet Gynecol.* 2010; 3(1):20-7.
6. Vitale SG, Tropea A, Rossetti D, Carnelli M, Cianci A. Management of uterine leiomyomas in pregnancy: review of the literature. *Updates Surg.* 2013; 65(3):179-82.
7. Cooper NP, Okolo S. Fibroids in pregnancy—common but poorly understood. *Obstet Gynecol Surv.* 2005; 60(2):132-8.
8. Cramer SF, Patel A. The frequency of uterine leiomyomas. *Am J Clin Pathol.* 1990; 94(4):435-8.
9. Fleischer R, Weston GC, Vollenhoven BJ, Rogers PA. Pathophysiology of fibroid disease: angiogenesis and regulation of smooth muscle proliferation. *Best Pract Res Obstet Gynaecol.* 2008; 22(4):603-14.
10. Suwandinata FS, Gruessner SE, Omwandho CO, Tinneberg HR. Pregnancy-preserving myomectomy: preliminary report on a new surgical technique. *Eur J Contracept Reprod Health Care.* 2008; 13(3):323-6.
11. Divakar H. Asymptomatic uterine fibroids. *Best Pract Res Obstet Gynaecol.* 2008; 22(4):643-54.
12. Stout MJ, Odibo AO, Graseck AS, Macones GA, Crane JP, Cahill AG. Leiomyomata at routine second-trimester ultrasound examination and adverse obstetric outcomes. *Obstet Gynecol.* 2010; 116(5):1056-63.
13. Sparić R, Dokić M, Argirović R, Kadija S, Bogdanović Z, Milenković V. Incidence of postpartum post-caesarean hysterectomy at the Institute for Gynecology and Obstetrics, Clinical Center of Serbia, Belgrade. *Srp Arh Celok Lek.* 2007; 135(3-4):160-2.
14. Bhatla N, Dash BB, Kriplani A, Agrawal N. Myomectomy during pregnancy: a feasible option. *J Obstet Gynaecol Res.* 2009; 35(1):173-5.
15. Sparić R, Lazović B. Inevitable cesarean myomectomy following delivery through posterior hysterotomy in a case of uterine torsion. *Med Arh.* 2013; 67(1):75-6.
16. Sparić R, Berisavac M, Buzadžić S, Mirković Lj. Complications during cesarean delivery in a patient with two previous myomectomies. *Acta Chir Iugosl.* 2013; 60(1):99-100.
17. Exacoustos C, Rosati P. Ultrasound diagnosis of uterine myomas and complications in pregnancy. *Obstet Gynecol.* 1993; 82(1):97-101.
18. Khaund A, Lumsden MA. Impact of fibroids on reproductive function. *Best Pract Res Obstet Gynaecol.* 2008; 22(4):749-60.
19. Coronado GD, Marshall LM, Schwartz SM. Complications in pregnancy, labor and delivery with uterine leiomyomas: a population based study. *Obstet Gynecol.* 2000; 95(5):764-9.
20. Benson CB, Chow JS, Chang-Lee W, Hill JA 3rd, Doubilet PM. Outcome of pregnancies in women with uterine leiomyomas identified by sonography in the first trimester. *J Clin Ultrasound.* 2001; 29(5):261-4.
21. Mykhopadhaya N, Asante GP, Manyonda IT. Uterine fibroids: impact on fertility and pregnancy loss. *Obstetrics Gynaecology and Reproductive Medicine.* 2007; 17(11):311-7.
22. Bajekal N, Li TC. Fibroids, infertility and pregnancy wastage. *Hum Reprod Update.* 2000; 6(6):614-20.
23. Somigliana E, Vercellini P, Daguati R, Pasin R, De Giorgi O, Crosignani PG. Fibroids and female reproduction: a critical analysis of the evidence. *Hum Reprod Update.* 2007; 13(5):465-76.
24. Buttram VC Jr, Reiter RC. Uterine leiomyomata: etiology, symptomatology and management. *Fertil Steril.* 1981; 36(4):433-5.
25. Campo S, Campo V, Gambadauro P. Reproductive outcome before and after laparoscopic or abdominal myomectomy for subserous or intramural myomas. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.* 2003; 110(2):215-9.
26. Rose CH, Brost BC, Watson WJ, Davies NP, Knudsen JM. Expectant management of uterine incarceration from an anterior uterine myoma. *J Reprod Med.* 2008; 53(1):65-6.
27. Parker WH. Etiology, symptomatology and diagnosis of uterine myomas. *Fertil Steril.* 2007; 87(4):725-36.

28. Sparić R, Pervulov M, Stefanović A, Tadić J, Gojnić M, Milićević S, et al. Uterine torsion in term pregnancy. *Srp Arh Celok Lek.* 2007; 135(9-10):572-5.
29. Qidwai GI, Caughey AB, Jacoby AF. Obstetric outcomes in women with sonographically identified uterine leiomyomata. *Obstet Gynecol.* 2006; 107(2):376-82.
30. Vergani P, Locatelli A, Ghidini A, Andreani M, Sala F, Pezzulo JC. Large uterine leiomyomata and risk of cesarean delivery. *Obstet Gynecol.* 2007; 109(2):410-4.
31. Sparić R, Kadija S, Hudelist G, Glišić A, Buzadžić S. History of cesarean hysterectomy. *Acta Chir Jugosl.* 2011; 58(1):9-12.
32. Seims AD, Lube MW. Incarceration of a sessile uterine fibroid in an umbilical hernia during pregnancy. *Hernia.* 2009; 13(3):309-11.
33. Stewart EA. Uterine fibroids. *Lancet.* 2001; 357(9252):293-8.
34. Sinclair D, Gaither K, Mason T. Fertility outcomes following myomectomy in an urban hospital setting. *J Natl Med Assoc.* 2005; 97(10):1346-8.
35. Al-Mahrizi S, Tulandi T. Treatment of uterine fibroids for abnormal uterine bleeding: myomectomy and uterine artery embolization. *Best Pract Res Clin Obstet Gynecol.* 2007; 21(6):995-1005.
36. Hassiakos D, Christopoulos P, Vitoratos N, Xarchoulakou E, Vaggos G, Papadimas K. Myomectomy during cesarean section: a safe procedure? *Ann N Y Acad Sci.* 2006; 1092:408-13.
37. Adesiyun AG, Ameh AC, Ojabo A. Myomectomy at caesarean section: descriptive study of clinical outcome in a tropical setting. *J Ayub Med Coll Abbottabad.* 2009; 21(4):7-9.
38. Mason TC, Adair J, Lee YC. Postpartum pyomyoma. *J Natl Med Assoc.* 2005; 97(6):826-8.
39. Price N, Nakade K, Kehoe ST. A rapidly growing uterine fibroid postpartum. *BJOG.* 2004; 111(5):503-5.
40. Matsunaga E, Shiota K. Ectopic pregnancy and myoma uteri: teratogenic effects and maternal characteristics. *Teratology.* 1980; 21(1):61-9.
41. Straub HL, Chohan L, Kilpatrick CC. Cervical and prolapsed submucosal leiomyomas complicating pregnancy. *Obstet Gynecol Surv.* 2010; 65(9):583-90.

Uterine Myomas in Pregnancy, Childbirth and Puerperium

Radmila Sparić

Clinic of Gynecology and Obstetrics, Clinical Center of Serbia, Belgrade, Serbia

SUMMARY

Fibroids are the most common benign tumors of the genital organs of women in reproductive age. Achieving reproductive function later in life, with more frequent use of assisted reproductive technologies, leads to an increased number of pregnancies complicated with fibroids. Their size may change during pregnancy, but the changes are mostly individual. Most fibroids stop growing or decline during the puerperium. The effect of fibroids on pregnancy depends on their number, size and location. The mechanisms bringing about perinatal complications are not fully understood. Fibroids during pregnancy can cause many perinatal complications, such as bleeding in pregnancy, miscarriage, pain due to red degeneration, malpresentation, preterm labor, premature rupture of membranes,

placental abruption and obstruction of delivery and are associated with higher incidence of cesarean section, operative vaginal delivery, uterine atony and postpartum hemorrhage. Postpartum hysterectomy in these women is also more likely than in general population. Postpartum infections are more common in patients with fibroids, and myomas may also cause retained placenta. The most common cause of neonatal morbidity is prematurity, due to pregnancy ending in an earlier gestational age. Monitoring of pregnancies complicated with fibroids is essentially indistinguishable from monitoring normal pregnancies. Therapy includes only bed rest and observation, symptomatic therapy in case of pain and intensive fetal surveillance, and surgery in the acute situations.

Keywords: fibroids; pregnancy; delivery; puerperium; fetus

Примљен • Received: 06/09/2013

Прихваћен • Accepted: 14/11/2013

Nutrition in Pregnancy: Basic Principles and Recommendations

Draga Plećaš¹, Snežana Plešinac^{2,3}, Olivera Kontić Vučinić^{2,3}

¹Institute of Hygiene and Medical Ecology, Faculty of Medicine, University of Belgrade, Belgrade, Serbia;

²Faculty of Medicine, University of Belgrade, Belgrade, Serbia;

³Clinic of Obstetrics and Gynecology, Clinical Center of Serbia, Belgrade, Serbia

SUMMARY

Healthy diet in pregnancy should guarantee proper fetal growth and development, maintain (and promote) maternal health and enable lactation. Nutritional counseling and interventions need to be an integral part of antenatal care and continue during pregnancy in order to reduce the risk of maternal, fetal and neonatal complications, as well as the short- and long-term adverse outcomes. Adverse pregnancy outcomes are more common in women who begin the gestation as undernourished or obese in comparison to pregnant women whose weight is within normal ranges. Increased nutritional and energy needs in pregnancy are met through numerous metabolic adaptations; pregnancy is successfully achieved within wide range of variations in energy supply and weight gain. However, if nutrient restriction exceeds the limits of adaptive responses, evidence indicates that fetus will develop the alternative metabolic competence that might emerge as a disease (type 2 diabetes, hypertension, coronary heart disease and stroke) in adult life.

Keywords: pregnancy; nutrition; fetal growth

INTRODUCTION

Well balanced diet has an important role in health throughout the lifecycle and affects the functioning of all body systems. Increased nutritional and energy needs in pregnancy are due to the physiologic changes of mother and metabolic demands of fetus. These are met through numerous physiologic adaptations including changes in nutrient metabolism orchestrated by placental hormones. Still, if the nutritional and energy needs are not met (especially under severe deprivation), evidence indicates that this will result in unfavorable changes of infant weight, size and body composition, and even in an apparently healthy infant, in alteration of metabolic competence that might emerge as a disease in later life [1, 2, 3].

Healthy diet in pregnancy should ensure proper fetal growth, good maternal health and lactation. Good fetal supply is also achieved through increased intestinal absorption or reduced excretion via the kidney or gastrointestinal tract. Nutritional counselling and interventions need to be an integral part of antenatal and pregnancy care.

ANTENATAL CARE – HEALTHY START

A routine healthcare during a woman's reproductive years should include medical care and counselling on healthy behaviors. To optimize pregnancy outcome, nutritional assessment and advice need to be considered before conception including all relevant information regarding nutritional allergies and/or intoler-

ances, weight changes, diet habits and Body Mass Index (BMI; weight in kg/height in m²). Appropriate weight gain, diet and exercise need to be discussed at the initial visit and periodically throughout the pregnancy. Nutrition counselling should focus on a well-balanced, varied diet plan coherent with food preferences of the pregnant women (Table 1).

Adverse pregnancy outcomes are more common in women who begin the gestation as undernourished or as obese in comparison to pregnant women whose weight is within normal ranges (BMI=18.5-24.9 kg/m²) [1, 3]. In addition, ovulation is rare in women with total fat below 22% [4]. Even in women who are normally nourished, but are exposed to acute malnutrition or starvation, absence of ovulation occurs very quickly. Anovulatory infertility is attributed to malnourishment, but is also often diagnosed in overweight or obese women.

Maternal malnutrition increases the risks of low birth weight (<2,500 g), premature birth, fetal growth retardation, small-for-gestational-age (SGA) infants and is associated with perinatal morbidity and mortality; insufficient intake of certain nutrients is related to some fetal congenital anomalies and birth defects. Gestational underweight has also been linked to infant inclination to certain chronic illnesses (diabetes mellitus type 2, hypertension, coronary disease, and stroke) in adulthood (hypothesis of fetal origin of adult disease) [1, 3].

Besides the availability of nutrients, an adequate blood supply, i.e. well developed uterine circulation is also essential for intrauterine fetal growth. Angiogenesis is stimulated by the

Correspondence to:

Draga PLEČAŠ
Cara Uroša 36, 11000 Belgrade
Serbia
draga.plecas@gmail.com

Table 1. Factors affecting nutrition during pregnancy

Factors affecting nutrition	Preconception undernourishment or overweight/obesity
	Insufficient or excessive weight gain
	Maternal age (adolescents/especially first 2 years after menarche, age > 35)
	Psychological, social, cultural and religious factors that influence nutrition
	History of obstetric complications
	Chronic diseases
	Multiple pregnancy
	Substance abuse
	Nutritional disorders (anorexia, bulimia)
	Nutritional allergies and intolerances
	Sedentary life style/reduced physical activity

increased needs of fetus and occurs through vasodilatation and development of new blood vessels. The endometrium, decidua and placenta are good sources of angiogenic growth factors [5].

Concentration of water-soluble nutrients in maternal plasma is lower in pregnancy than in the non-pregnant state, while the situation is reverse for the liposoluble nutrients. Glucose crosses placenta by facilitated diffusion and provides 75% of energy needs to the fetus. Amino-acids are transferred against concentration gradients, and fatty acids by simple diffusion (fat synthesis occurs in fetal tissues). Ketone bodies produced by maternal lipolysis cross the placenta freely by diffusion.

ENERGY REQUIREMENTS AND RECOMMENDED WEIGHT GAIN IN PREGNANCY

Energy intake is monitored by weight gain during pregnancy. Recommendations are given in respect to BMI before conception. Generally accepted American Institute of Medicine (IOM) 2009 recommendations on weight gain [6] originate from the recommendations issued in 1990; the difference being that recent ones are based on the World Health Organization (WHO) BMI categories and include specific recommendations for gestational weight gain for overweight and obese pregnant women (Table 2). Premature labor, impaired intrauterine fetal development and failure to initiate lactation are more common in pregnant women with insufficient weight gain. On the other hand, pregnant women that gained more weight than recommended deliver macrosomic infants, have greater rate of hypertensive disorders of pregnancy, Cesarean sections and more difficulties in reducing the excessive weight gained during postpartum period [7, 8].

Table 2. Recommended weight gain during pregnancy

BMI before conception (kg/m ²)	Recommended weight gain (kg)	Average weight increase* in II and III trimester (average kg/week)
<18.5 (undernourished)	12.5–18.0	0.51 (0.44–0.58)
18.5–24.9 (normal)	11.5–16.0	0.42 (0.35–0.50)
25.0–29.9 (overweight)	7.0–11.5	0.28 (0.23–0.33)
≥30 (obese)	5.0–9.0	0.22 (0.17–0.27)

* Calculations assume 0.5–2 kg weight gain in the first trimester.

British National Institute for Health and Clinical Excellence advises that, instead of routine follow up on gestational weight gain, the focus should be on individual monitoring of fetal development and potential complications (for example, insufficient weight gain due to growth restriction or excessive gain due to fluid retention in preeclampsia. [3, 8]. Pregnancy outcome was also analyzed among women who began gestation as overweight (BMI=25.0–29.9 kg/m²) and increased their weight less (2.7–6.4 kg) than recommended [9]. It was concluded that, if growth and development of fetus was appropriate, there was no evidence that insisting on weight increase, as per the US Institute of Medicine 2009 recommendations, would produce additional benefit to mother or fetal health. Results of similar research of obese pregnant women provided contradictory results. Recommendations for obese pregnant women were given with the objective to eliminate not only the risks of having large-for-gestational-age infants and obstetric complications, but also small-for-gestational-age infants, preterm births and postpartum weight retention. It is assumed that relationship between the class of obesity of mother on one, and total weight gain during pregnancy on the other side, is very complex. In order to balance the risks of fetal and maternal adverse outcomes, a case to case clinical judgment is required in management of the overweight or obese woman who is gaining less weight than recommended.

Lastly, the assessment of weight gain should also be considered in relation to the extra tissue deposited in pregnancy. A woman that begins pregnancy with appropriate weight (BMI=18.5–24.9 kg/m²) will gain in average 12.5 kg (fetus 3,400 g; placenta 650 g; uterus 970 g; breasts 405 g; amniotic fluid 800 g; increase in blood volume 1,450 g; increase in fluids 1,480 g; and maternal fat deposits 3,345 g) [10].

Human gestation is characterized by numerous, complex adaptations in energy metabolism of incomparably wider range and potential than mechanisms involved in the non-pregnant state. This metabolic capacity of the species on one, and the fact that fetal growth is very slow process (characteristics of primate reproduction) on the other side, protects and secures fetal growth even under deprived maternal nutrition. Still, despite the effects of such adaptations, intrauterine growth retardation is often encountered in poor environments and can definitely be connected with poor nutrition. Moreover, data based on the birth weight index calculated as a percentage of total increase of mother's weight show that when the increase is small, birth weight accounts for proportionally much greater portion of total increase gained during pregnancy (birth weight represents ~ 25% of total weight gain of well-nourished mother and up to 60% of gestational weight gain in poor communities) [11]. Birth weight shown by this index could be a useful method for assessment of nutrition adequacy during pregnancy.

There is no precise data on total energy costs of normal pregnancy. In general, total costs consist of the energy deposited as new tissue, deposited as fat and as energy required to maintain new tissue. Results vary from 125,000 (additional consumption of energy among pregnant women in Sweden) to -7,000 (reduction of consumption among

Table 3. Recommendations for energy intake during pregnancy

Recommendations		In the non-pregnant state	During pregnancy (+kcal/day)
Europe		1950–2000	200**
USA		Up to 2200	300***
WHO		1940	285
UK	19–50 years of age	1940	200**
Canada*	19–30 years of age	1900	1 st trimester +0
			2 nd trimester +340
			3 rd trimester +452
	31–50 years of age	1800	1 st trimester +0
			2 nd trimester +340
			3 rd trimester +452

* based on 2006 IOM recommendations;

** only in the last trimester;

*** in the second and third trimester

pregnant women in Gambia) [12]. In well-nourished woman, the basal metabolic rate begins to rise soon after conception and continuously increases until delivery, while in contrast, an undernourished woman shows evident suppression of metabolism that persists to the third trimester of pregnancy [11]. Apparently, there are individual metabolic variations enabling the woman to carry her pregnancy to term under a wide range of nutritional conditions up to the adaptive limits, and consequences of any nutritional deprivation that exceeds these limits as well [1, 3, 8, 11]. Although total costs of pregnancy were strongly correlated with the woman's pre-pregnancy fatness and pregnancy weight gain, it seems that pre-pregnancy nutritional status may be the key factor in modifying the energy costs of gestation (possibly by introducing a system that supervise mother's pre-pregnancy energy status and by adopting economical metabolic mechanisms to fit the individual capacity of pregnant women). The role of leptin and other neuropeptides in achieving this goal remains to be fully understood [13].

In pregnant women with healthy pre-conception weight who gained around 12 kg during gestation, additional energy needs were found to be around 80,000 kcal (Table 3) [3, 11, 14].

Energy needs in multiple pregnancies are greater. Recommended gestational weight gain for the women with twin pregnancies which are well nourished, overweight and obese before conception is 16.8–24.5 kg, 14.1–22.7 kg and 11.3–19.1 kg, respectively [6, 9, 15].

MACRONUTRIENTS

Assuming that an average of 0.8 g/kg of protein/day is taken in the non-pregnant state, and preconception BMI is within normal range, recommended daily intake for protein varies from 51g, i.e. +6 g per day to 71 g per day [2, 16]. Preference is given to sources of animal origin that do not contain too much fat, such as lean meat and fish, milk and dairy products with lower fat content, eggs (egg whites), fresh and dried pulses, grain cereals and nuts. Protein-rich nutrients are at the same time good sources of iron, phosphorus, iodine and B vitamins [15, 17, 18].

Table 4. Recommendations for intake of carbohydrates and fats (% of total energy intake)

Recommendations		Total fats (%)	Total CH (%)	Non-starch polysaccharides (g/day)
WHO	Min.	15	55	16
	Max.	30	75	24
USA		<30	>50	/
Europe		20–30	55–65	Up to 30

Carbohydrates provide 55%–75% of energy needs. Good sources of carbohydrates are cereals and flour products, pulses, potatoes (starchy polysaccharides). Intake of simple sugars should be limited to 10% of energy needs. Fats should provide up to 30 % of daily energy needs (Table 4) [2, 3, 16].

MICRONUTRIENTS

Prominent folate deficiency is connected with the neural tube defects, iodine with the congenital hypothyroidism and neurocognitive deficiencies, iron deficiency causes sideropenic anaemia and increases the risk of low birth weight, premature labor, and perinatal (and maternal) mortality.

Liposoluble vitamins A and D pass freely to placenta by diffusion. If there is no good source of vitamin D in the diet and exposure to sun is minimal, it is advisable to supplement the intake in daily doses of 10 µg of vitamin D/day [3, 18]. Vitamin E and K transfer is very sparse and concentration in fetal tissues and a newborn are lower than in maternal tissues.

Vitamin C is transferred by facilitated diffusion. Concentration in fetal circulation is higher than in the maternal blood. Vitamin C is in competition with glucose for the same placental receptors, but even there is maternal hyperglycemia, there is no evidence of fetal vitamin C deficiency under the circumstances.

Folate (Vitamin B₉) deficiency is present in 5% of general population [3] and thus in early pregnancy. Folate is crucial for synthesis of purine and pyrimidine precursors of nucleic acids, in the metabolism of some amino acids and for initiation of protein synthesis in mitochondria. Fetal levels are 2 to 4 fold higher than in maternal circulation. Transport of folate across the placenta is a complex process that seems to involve several different transport systems. It may be compromised by diet (polyphenolic compounds present in alcoholic and nonalcoholic beverages, some methylxanthines found in coffee and black tea), therapeutic agents (xenobiotics), lifestyle factors (smoking, drug abuse and alcohol consumption) and markers of pathological conditions. Lower folate status has been associated with an impaired fetal growth and neuro-developmental adverse outcomes. Supplementation with 400 µg of folate before conception and during the first 12 weeks of gestation is advised as preventive measure of neural tube defects [2, 19, 20, 21].

Transfer of Vitamin B₁₂ is mediated through the vitamin specific receptors. B₆ is transported passively, and B₁ and B₂ by active transport (concentrations are higher in fetal tissues).

Concentrations of calcium are higher in fetal than in maternal tissues – calcium is actively transferred across the placenta, and the same applies for magnesium. Zinc is transported as bound to albumin and it is found in significantly higher concentrations in fetal tissues. Iron transport through the placenta is very intensive, especially in late pregnancy, when fetal needs are highest; placental transferrin receptors facilitate transfer of iron bound to transferrin.

Recommendations on daily intake of certain nutrients during pregnancy are based on standards and assessment of nutritional needs for general population that satisfies the needs of 97.5% of population of certain age (Recommended Daily Allowance – RDA) [18]. If sufficient evidence is not available to calculate the requirement, recommendation is given as an “adequate intake”/AI (Table 5). There are also recommendations which relate to upper limit, i.e. maximum allowed daily intakes which can be taken without risks to mother and/or fetus (with no teratogenic effects) [22].

The iron requirements are not equally distributed over the pregnancy: more of 80% of fetal needs relate to last trimester. Despite physiological changes which ensure increased resorption of iron (about 50% increases in second and up to four times the norm in third trimester), data published by WHO indicate that around 42% of pregnant women have sideropenic anaemia [23]. In addition, iron deficiency in pregnancy is also associated with higher risk of premature labor, low birth weight (<2,500 g), and lower cognitive tests scores [3, 24]. Iron status should be followed up from the very beginning of gestation in order to prevent

adverse effects to fetal growth and post-partum anemia in a timely manner, as well as to provide adequate reserves to newborn being breastfed for the first six months. Anemia in pregnancy is defined by hemoglobin (Hb) below 110 g/L, although it is known that during the II trimester the concentration is naturally lower by approximately 5 g/L. Supplementation is mostly indicated by physicians based on individual assessment of each pregnant woman. In the United States, iron supplementation is recommended in lower doses (30 mg/day). Therapeutic doses which can go up to 120 mg of elemental iron are prescribed in treatment of anemia. (WHO does not recommend a certain daily intake but universal supplementation since iron balance does not depend only on the properties of the diet but also and especially on the amounts of stored iron [2, 21]. Daily iron supplementation is associated with reduced risk of anemia, iron deficiency during pregnancy and low birth weight [25]. However, particularly at doses 60 mg of elemental iron or higher, it has been associated with side effects (constipation, nausea, vomiting and diarrhea) and an increased risk of high hemoglobin concentrations in mid and late pregnancy which may be harmful to both mother and infant (late pregnancy hypertension, pre-eclampsia and pregnancy complications). Thus, an intermittent oral iron supplementation (one, two or three times a week on non-consecutive days, alone or in combination with folic acid or other vitamins and minerals) has been proposed as an alternative to daily supplementation in pregnant women who are not anemic and receive adequate antenatal care [26].

Many factors affect the resorption of non-hem iron from supplements: improvement of resorption from vegetables and supplements is facilitated by vitamin C. Resorption is reduced in the presence of polyphenols from tea or coffee.

Additional supplementation containing iron, folate, calcium, magnesium and zinc are often advised in multiple pregnancies.

SPECIAL RECOMMENDATIONS AND DIETARY RESTRICTIONS IN PREGNANCY

Even though the basic principles are the same as for general population and nutrition is planned around 5 main food groups (bread, cereals and potatoes, fruit and vegetables, milk and dairy products, meat, fish and substitutes/pulses, egg, soya products, food or beverages with high fat and/or sugar content), pregnant women are also advised to [2, 3, 8, 27, 28]:

a) Exclude all food sources which may contain potential teratogens such as food and supplements with high concentrations of vitamin A, medications containing retinoids;

b) Exclude foods which may be bacteriologically unsafe and sources of infection such as listeriosis (immature soft cheeses, unpasteurized milk, pates), toxoplasmosis (undercooked meat, contaminated vegetables), salmonellosis (raw or soft cooked eggs, mayonnaise, undercooked meat, especially chicken);

Table 5. Dietary reference values of micronutrients in pregnancy

Micronutrient/day		Reference value		
		USA	WHO	Europe
Vitamins	Thiamin (mg)	1.4	1.4	1.0
	Riboflavin (mg)	1.4	1.4	1.6
	Niacin ¹	18	18	14
	Vitamin B ₆ (mg)	1.9	1.9	1.3
	Vitamin B ₁₂ (μg)	2.6	2.6	1.6
	Folic acid (μg)	600 ²	370–400 ³	400 ⁴
	Vitamin C (mg)	80	55	50
	Vitamin A ⁵	750	800	700
	Vitamin D ⁶ (μg)	15 ⁷	5	10 ⁸
	Vitamin E ⁹	15 mg	0.15–2 mg/kg	>3
Minerals	Calcium (mg)	1000–1300	1000–1200	700
	Phosphorus (mg)	700–1250	1200	550
	Magnesium (mg)	400	220	150–500
	Sodium (mg)	1500 ¹⁰	<2000	1600
	Potassium (mg)	4700 ¹⁰	3510	3500
	Iron (mg)	27	X ¹¹	17–21
	Zinc (mg)	12	7.3–13.3	7
	Copper (mg)	1	1	1.2
	Selenium (μg)	60	26–30	60
	Iodine (μg)	220	200	140

¹as niacin equivalents; ²as dietary folate equivalents; ³based on normative storage requirement; ⁴assuming bioavailability half of pure folic acid; ⁵as retinol equivalents; ⁶as cholecalciferol; ⁷assuming minimal sunlight; ⁸supplement required if exposure to sunlight is limited and BMI>30 kg/m²; ⁹as α-tocopherol; ¹⁰adequate intake; ¹¹no recommendations, supplementation recommended

- c) Use only iodized salt;
- d) Since the amount of folic acid required to minimize the risk of developing NTDs cannot be usually achieved through dietary measures alone, folic acid supplementation is recommended as 400 µg/day of folic acid supplement prior to conception and until the twelfth week of pregnancy to all women who may become pregnant;
- e) Limit caffeine intake, 200 mg/day (2 cups of coffee);
- f) Use lactose-free milk and dairy products if lactase deficiency is diagnosed;
- g) Choose foods that are good source of hem iron (meat, fish);
- h) Exclude consumption of alcohol, stop smoking and exposure to nicotine smoke (passive smoking);
- i) Due to the potential danger of contamination by methyl-mercury (and toxic threats from polychlorinated biphenyls and other lipophilic contaminants) which can cause fetal damage, pregnant and lactating women should avoid eating shark, swordfish, tilefish and king mackerel (big oily fish with potentially high content of methyl mercury). Intake of oily fish low in mercury such as sardines, herring and salmon, should be limited to two portions a week. Contrary to oily fish (contains up to 30 % fat in the tissues), white fish (cod, haddock and flatfish) contain far less fat (1-4%) and the fat is deposited exclusively in the liver;
- j) Deficiencies in vegetarian/vegan diet need to be corrected by choice of appropriate natural and/or enriched food and supplements:
 - Vitamin D in doses of 5 to 10 µg (200-400 IU) per day;
 - Iron in doses of 48.6 mg/day but it is advisable to define the dose after individual assessment;
 - Folic acid in doses of 400 to 800 µg;
 - Total intake of vitamin B₁₂ must be 2.6 µg/day, and is achieved by taking enriched food and/or supplements. Inadequate dietary intake of vitamin B₁₂ causes elevated homocysteine levels, which have been associated with adverse pregnancy outcomes including neural tube defects and stillbirth;
 - Calcium supplements in doses of 500 mg, if required;
 - Zinc supplementation for vegans in doses of 15 mg if the natural sources (legumes, nuts, and whole grains) are not present in diet.

MANAGEMENT OF OVERWEIGHT AND OBESE PREGNANT WOMEN

Obesity in pregnancy is a risk of numerous adverse outcomes and complications including miscarriage, fetal

congenital anomalies, thromboembolism, gestational diabetes, pre-eclampsia, dysfunctional labor, postpartum hemorrhage, wound infection, stillbirth, neonatal death. Detection of birth defects may be difficult due to sub-optimal view on ultrasound. Administering anesthesia in obese pregnant women is more challenging and need to be planned in advance [39]. Cesarean sections and hypertensive disorders are more prevalent, the breastfeeding rate is lower. Prevalence of overweight and obesity has increased significantly since 1990s all over the world, including Serbia, and the same pattern has been seen among women who get pregnant. [9, 29, 30]. An advice on healthy nutrition and physical activity in relation to the class of obesity (I, II or III) should be given as early as possible (ideally weight should be regulated before pregnancy). Glycoregulation should be tested in all pregnant women that have BMI ≥ 30 kg/m² [3, 31, 32, 33].

Nutritional advice for women who are overweight and obese is usually associated with concern regarding safety of calorie-restricted and other weight-losing diets and thus remain challenging until research provides further evidence. The reduction of calorific intake in the second half of the pregnancy with consequential lipolysis and relative ketonemia has been reported to be associated with an impaired mental function of the offspring [3]. The relative ketonemia could be prevented by nutrition plan dominated by intake of high carbohydrates low glycemic index diet (suppression of lipolysis being achieved by the increase of insulin sensitivity induced by such diet regimen). The same diet plan could also help in preventing the onset of gestational diabetes in obese or overweight pregnant women [3, 33]. However, since the consequences of gestational weight change in overweight or obese women are still not completely understood, a preventive approach has been adopted and weight loss during pregnancy is not advised [2, 9].

CONCLUSION

Human pregnancy is successfully achieved within wide range of variations in energy requirements and weight gain. The thresholds for nutrient intakes to support good pregnancy outcomes are not fixed values.

Although the concept of viewing the human fetus as a “perfect parasite” has been long abandoned and replaced with hypothesis of functional plasticity, the implicated metabolic adaptations have their limits (“thrifty metabolism”). The full significance of short- and long-term outcomes of these adaptations require improved study designs, sophisticated statistical models and studies with longer follow up.

REFERENCES

1. Scientific Advisory Committee on Nutrition. Influence of maternal, fetal and child nutrition on the development of chronic disease in later life. London: The Stationery Office; 2011.
2. Plečas D. [Nutrition in pregnancy and lactation]. Beograd, UNICEF; 2001. Serbian
3. Royal College of Obstetricians and Gynecologists. Nutrition in pregnancy. Scientific Advisory Committee Opinion Paper 18. September 2010. Available from: <http://www.rcog.org.uk/>.
4. Frisch RE. The right weight: body fat, menarche and fertility. *Proc Nutr Soc.* 1994; 53:113-29.
5. Zygmunt M, Herr F, Munstedt K, Lang U, Liang OD. Angiogenesis and vasculogenesis in pregnancy. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.* 2003; 110:S10-8.
6. Institute of Medicine. Weight gain during pregnancy: reexamining the guidelines. Washington, DC: National Academies Press; 2009.
7. Plečas D. [Healthy diet in pregnancy and lactation]. In: Jorga J, editor. Higijena sa medicinskom ekologijom. Beograd: Medicinski fakultet; 2013 [in press].
8. National Institute for Health and Clinical Excellence. Antenatal Care: Routine Care for the Healthy Pregnant Woman. Clinical Guideline no. 62. London: NICE; 2008.
9. Weight gain during pregnancy. Committee Opinion No. 548. American College of Obstetricians and Gynecologists. *Obstet Gynecol.* 2013; 121:210-2.
10. Hytten FE. Weight gain in pregnancy. In: Hytten FE, Chamberlain G, editors. *Clinical Physiology in Obstetrics*. Oxford: Blackwell Scientific Publications; 1991. p.173-203.
11. Prentice AM, Goldberg GR. Energy adaptations in human pregnancy: limits and long-term consequences. *Am J Clin Nutr.* 2000; 71(5):1226s-32s.
12. Ceesay S, Prentice AM, Cole TJ, Foord F, Weaver LT, Poskitt EM, et al. Effects on birth weight and perinatal mortality of maternal dietary supplements in rural Gambia: 5 year randomized controlled trial. *BMJ* 1997; 315:786-90 (published erratum appears in *BMJ* 1997; 315:1141).
13. Augustine RA, Ladyman SR, Grattan DR. From feeding one to feeding many: hormone-induced changes in bodyweight homeostasis during pregnancy. *J Physiol.* 2008; 586:387-97.
14. Institute of Medicine. Dietary Reference Intakes, The Essential Guide to Nutrient Requirements. Washington DC: National Academies Press; 2006.
15. Goodnight W, Newman R. Society of Maternal-Fetal Medicine. Optimal nutrition for improved twin pregnancy outcome. *Obstet Gynecol.* 2009; 114:1121-34.
16. Ralph A. Appendix: Dietary reference values. In: Garrow JS, James WPT, Ralph A, editors. *Human Nutrition and Dietetics*. 10th ed. London: Churchill Livingstone; 2000. p.849-863.
17. Plečas D. [Nutrition of pregnant and lactating women]. In: Bozinovic-Prekajski N, editor. *Nutrition of the Newborn*. 2010. Proceedings of the 5th Institute of Neonatology Conference on nutrition of the newborn. 2010 Mar 17; Belgrade, Serbia. p 3-7. Serbian.
18. Institute of Medicine of National Academies. Food and Nutrition Board [Internet]. Dietary reference intakes tables and application. Updated: 9. 12. 2011. Available from www.nap.edu.
19. Hutson JR, Stade B, Lehotay DC, Collier CP, Kapur BM. Folic acid transport to the human fetus is decreased in pregnancies with chronic alcohol Exposure. *PLoS ONE.* 2012; 7(5):e38057.
20. Keating E, Goncalves P, Campos I, Costa F, Martel F. Folic acid uptake by the human syncytiotrophoblast: interference by pharmacotherapy, drugs of abuse and pathological conditions. *Reprod Toxicol.* 2009; 28(4):511-20.
21. Kontic-Vucinic O, Sulovic N, Radunovic N. Micronutrients in women's reproductive health: I. Vitamins. *Int J Fertil Womens Med.* 2006; 51:106-15.
22. World Health Organization, Food and Agricultural Organization of the United Nations. Vitamin and mineral requirements in human nutrition. 2nd ed. Geneva: World Health Organization; 2004.
23. World Health Organization/US Centers for Disease Control and Prevention. In: De Benoist B, McLean E, Egli I, Cogswell M, editors. *Worldwide Prevalence of Anaemia 1993-2005. Global Database on Anaemia*. Geneva: World Health Organization; 2008. p.1-40.
24. Lozoff B, Jimenez E, Smith JB. Double burden of iron deficiency in infancy and low socioeconomic status: a longitudinal analysis of cognitive test scores to age 19 years. *Arch Pediatr Adolesc Med.* 2006; 160(11):1108-13.
25. Kontic-Vucinic O, Sulovic N, Radunovic N. Micronutrients in women's reproductive health: II. Minerals and trace elements. *Int J Fertil Womens Med.* 2006; 51:116-24.
26. Peña-Rosas JP, De-Regil LM, Dowswell T, Viteri FE. Intermittent oral iron supplementation during pregnancy. *Cochrane Database of Systematic Reviews* 2012, Issue 7. Art. No.: CD009997. p.1-225.
27. Plečas D. [Nutritional deficits and related diseases]. In: Kocijančić R, editor. *Higijena. Zavod za udžbenike i nastavna sredstva Beograd*; 2009. p.429-37. Serbian.
28. U.S. Department of Agriculture and U.S. Department of Health and Human Services. *Dietary Guidelines for Americans*. 2010. 7th ed. Washington, DC: U.S. Government Printing Office; 2010.
29. Davies GA, Maxwell C, McLeod L, Gagnon R, Basso M, Bos H, et al. SOGC Clinical Practice Guidelines: Obesity in pregnancy. No. 239, February 2010. *Int J Gynaecol Obstet.* 2010; 110:167-73.
30. Plečas D, Jorga J. [Epidemiology, diagnostic procedures and basic therapeutic principles in managing obesity] *Arh Pharm.* 2011; 61:337-48. Serbian.
31. Vasiljević N, Vasiljević M, Plečas D. The role of nutritional factors in pre-eclampsia and eclampsia. *Srp Arh Celok Lek.* 1996; 124(5-6):156-9.
32. Kocijančić D, Plešinac S, Plečas D, Aksam S, Kocijančić A. Correlation of biochemical parameters and neonatal outcome in patients with gestational hypertension. *Clin Exp Hypertension.* 2013; 35(1):6-10.
33. Royal College of Obstetricians and Gynaecologists; CEMACE. *The Management of Women with Obesity in Pregnancy*. London: RCOG; 2010.

Исхрана у трудноћи: основни принципи и препоруке

Драга Плећаш¹, Снежана Плешинац^{2,3}, Оливера Контић Вучинић^{2,3}

¹Институт за хигијену и медицинску екологију, Медицински факултет, Универзитет у Београду, Београд, Србија;

²Медицински факултет, Универзитет у Београду, Београд, Србија;

³Клиника за гинекологију и акушерство, Клинички центар Србије, Београд, Србија

КРАТАК САДРЖАЈ

Правилна исхрана у трудноћи треба да обезбеди правилан раст и развој плода, очува и унапреди здравље мајке и омогући успостављање лактације. У поређењу с трудницама које имају нормалну тежину, неповољан исход трудноће је чешћи међу женама које започињу трудноћу као потхрањене или гојазне. Повећане енергетске и нутритивне потребе у трудноћи обезбеђују се низом физиолошких адаптација које омогућавају да се трудноћа успешно изнесе у оквиру ши-

роког опсега енергетског уноса и повећања тежине. Ипак, када се трудноћа одвија у условима који превазилазе физиолошке адаптивне капацитете мајке, има индикација да субоптимална исхрана може да доведе до развоја нарушеног метаболичког модела који се везује за повећану склоност јединке ка неким болестима у одраслом добу (дијабетес мелитус тип 2, хипертензија, коронарна болест, церебрални инсульт).

Кључне речи: трудноћа; исхрана; фетални раст

Оснивачи инвазивне кардиоваскуларне медицине – Чарлс Теодор Дотер и сарадници: кратак историјски преглед

Јелена Костић, Бранко Белеслин, Милан Недељковић, Миодраг Остојић

Клиника за кардиологију, Клинички центар Србије, Београд, Србија

КРАТАК САДРЖАЈ

У савременој медицини на почетку 21. века сведоци смо револуционарног развоја инвазивне дијагностике и терапије обољења кардиоваскуларног система. Открићем рендгенских зрака у другој половини 19. века Вилхелм Конрад Рендген (*Wilhelm Conrad Röntgen*) променио је токове у медицини, радиологији и кардиологији. Значај ових открића за савремену медицину може се поредити са доприносом открића антибиотика или хормона. Самим зачецима развоја ове области допринели су појединци или мале групе истраживача који су најчешће били без икакве подршке окружења. Зачетником ове области сматра се амерички лекар Чарлс Теодор Дотер (*Charles Theodore Dotter*), који је рођен 1920. године у Бостону. Главни циљ био је лечење катетером уместо скалпела. Још као дете био је веома радознао и врло заинтересован за механику. Прва перкутана транслуминална ангиопластика била је прекретница у начину лечења болести најпре само периферних крвних судова узрокованих атеросклерозом. Сматрао је да увек постоји бољи начин лечења. Његов лични допринос у клиничкој медицини, истраживачки рад и подучавање других спасили су екстремитете милионима оболелих људи широм света. Лекари у Европи који су били мање конзервативни практично одмах су прихватили перкутану транслуминалну ангиопластику као методу лечења. Без помоћи и подршке својих колега и истомисленика, Форсмана (*Forssmann*), Санса (*Sones*) и Гринцига (*Gruentzig*), пионери ове области, ништа не би било урађено. Сви они били су испред свога времена и отворили ново поглавље у медицини.

Кључне речи: историја; рендгенски зраци; перкутана транслуминална ангиопластика; Чарлс Дотер

УВОД

У савременој медицини на почетку 21. века сведоци смо револуционарног развоја инвазивне дијагностике и терапије обољења кардиоваскуларног система. Значај ових открића за савремену медицину може се поредити са доприносом открића антибиотика или хормона. Самим зачецима развоја ове области допринели су појединци или мале групе истраживача који су најчешће били без икакве подршке окружења.

РЕНДГЕНСКИ ЗРАЦИ, АНГИОГРАФИЈА, КАТЕТЕРИЗАЦИЈА СРЦА

Било би немогуће замислити овако динамичан развој ове области без Вилхелма Конрада Рендгена (*Wilhelm Conrad Röntgen*), који је изводећи експерименте с вакуумском цеви 8. новембра 1895. године произвео и открио дотада непознат вид зрачења, као и могућност његове примене [1]. Начинивши снимак костију шаке своје супруге, први пут је указао на могућност примене икс-зрака у медицини, чиме је отворио ново поглавље у дијагностици. На тај начин је изучавање анатомије крвних судова постало доступније. Као признање за откриће „изузетног“ зрачења, које је касније названо по њему (рендгенски зраци), Рендген је добио прву Нобелову награду за

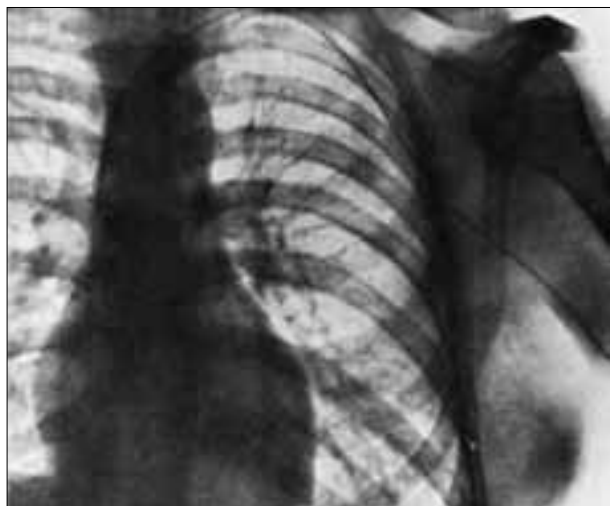
физику 1901. године. Врло брзо након објаве овога открића почиње развој инвазивних дијагностичких метода.

Схватајући изузетни потенцијал Рендгеновог открића, Хашек (*Haschek*) и Линдентал (*Lindenthal*) почињу експерименте с убризгавањем радиоопаких супстанци у артерије ампутираних екстремитета [2]. Први овакав ангиограм крвних судова ампутиране шаке инјекцијом Тајхманове (*Teichmann*) смесе, која се састоји од бизмута, олова и соли баријума, приказани су почетком 1896. године у Бечу [2].

Нажалост, непостојање контрастних средстава сигурних за употребу код људи, као и неопходно продужено време излагања рендгенским зрацима (око 60 минута) због техничке несавршености апарата, ограничили су овакве експерименте на кадавере и ампутиране делове тела. Било је потребно да прође још 27 година да би ангиографија, метода приказа крвних судова рендгенски видљивим контрастним средствима, добила клиничку примену. Прве ангиограме *in vivo* извели су Берберих (*Berberich*) и Хирш (*Hirsch*) [3], који су убризгали стронцијум и бромид у вене и на тај начин приказали венски систем (флебографија) 1923. године. Исте године Сикар (*Sicard*) и Форестје (*Forestier*) урадили су исто што и њихове немачке колеге само с липиодолом. Брукс (*Brooks*) [4] је 1924. године урадио прву кли-

Correspondence to:

Jelena KOSTIĆ
Klinika za kardiologiju
Klinički centar Srbije
Dr Koste Todorovića 8
11000 Beograd
Srbija
jesikakostic@yahoo.com



Слика 1. Прва документована радиографија катетеризације десног срца [6]

Figure 1. First documented radiograph of the right heart catheterization [6]

ничку ангиографију феморалне и пулмоналне артерије користећи натријум-јодид, али због његове токсичности, од оваквих ангиографија се одустало, све до проналаска контрастних средстава који нису били штетни по људско здравље. Мониз (*Moniz*) је 1928. године објавио приказ церебралне ангиографије, а 1929. Дос Сантос (*Dos Santos*) и сарадници [5] описали су транслумбалну аортографију.

Вернер Форсман (*Werner Forssmann*), млади специјализант хирургије у болници у Еберсвалду (*Eberswalde*) близу Берлина, 1929. године је, против воље свога шефа, професора Георга Клемперера (*Georg Klemperer*), тајно извео експеримент на себи. Једног поподнева, док је био сам, Форсман је узео неопходан стерилни материјал, анестезирао је своју лакатну регију и увео катетер дуг 65 cm кроз антекубиталну вену, те с катетером који му је висио из руке отишао до подрума, где се налазио рендгенски кабинет, како би направио снимак и потврдио да је заиста врхом катетера дошао до десне преткоморе (Слика 1) [6]. Због оваквог поступка и несхваћености надређених, изгубио је посао. Било је неопходно да прођу скоро три деценије, и тек је 1956. године Форсман добио Нобелову награду за медицину, због храбрости, смелости, иновативности и маштовитости. Форсманов експеримент на самом себи потврдио је његову интуицију да катетер може на овај начин да се пласира до срца и тако користи у терапијске сврхе, мање инвазивним приступом и сигурнијим у односу на пункцију срца кроз грудни кош [7]. Био је, као и многи иноватори, далеко испред свога времена. Ово је била прва катетеризација десног срца.

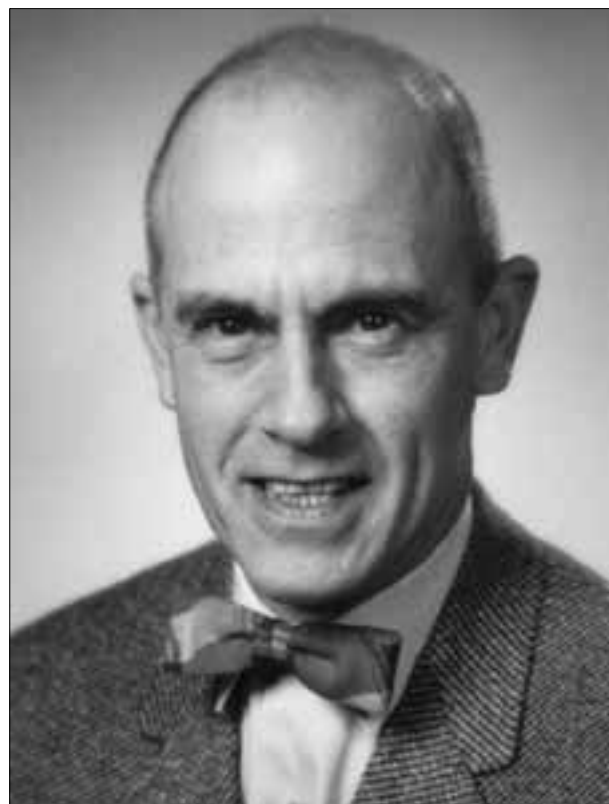
Први рендгенски контрастни приказ срчаних комора начинио је Амеј (*Ameuille*) 1936. године, а Кастељанос (*Castellanos*), Переира (*Pereiras*) и Гарсија (*Garcia*) су 1937. описали дијагностички значај катетеризације десног срца код урођених срчаних мана. Упркос свим напорима, до 1950. године ангиографија није имала своје место, када са усавршавањем техничких могућности апарата, проналажењем безбеднијих

контрастних средстава и усавршавањем саме технике извођења процедура ангиографија почиње да заузима своје право место у клиничком раду. Усавршавање ангиографије као дијагностичке методе отворило је пут ка настанку нове области медицине – интервентне радиологије.

ЧАРЛС ТЕОДОР ДОТЕР – БИОГРАФИЈА

Зачетником интервентне радиологије сматра се амерички лекар Чарлс Теодор Дотер (*Charles Theodore Dotter*), који је рођен 14. јуна 1920. године у Бостону (Слика 2) [8]. Још као дете Дотер је био веома радознао и врло заинтересован за механику [9]. Велико задовољство представљало му је играње са разноразним апаратима: расклапао би их и поново склапао и покушавао да им нађе додатне намене. У младости је осмислио сопствени концептуални знак у облику укрштене водоводне цеви и водоинсталатерских клешта из два разлога: зато што је волео механику и зато што је лого (Слика 3) [8] требало да укаже на следеће: „Ако водоинсталатери то могу да раде са цевима, онда и ми можемо то са крвним судовима“ [10].

Медицину је завршио на Универзитету Корнел (*Cornell University*), стаж у Америчкој поморској болници (*U. S. Naval Hospital*) у држави Њујорк, а специјализацију у њујоршкој болници [9]. Са само 30 година постао је стални члан Медицинског факултета на Корнелу (*Cornell Medical School*). Дотада је већ имао много објављених радова из области која га је највише



Слика 2. Чарлс Теодор Дотер (1920–1985) [8]

Figure 2. Charles Theodore Dotter (1920–1985) [8]



Слика 3. Дотеров „лого“ [8]
Figure 3. Dotters "logo" [8]

интересовала – ангиокардиографије. Две године касније постао је професор и шеф Катедре радиологије Универзитета у Орегону и био најмлађи именовани шеф катедре на великом универзитету [9]. На том положају остао је наредне 32 године. Током тог периода потпуно је развио основе интервентне радиологије. Објавио је више од 300 радова, од којих је у више од половине био први аутор, снимио је три едукативна филма и написао око 20 научних приказа [11, 12].

Када је постао шеф Катедре радиологије, прошло је 15 година од прве изведене катетеризације десног срца. У то време владало је велико интересовање за визуелизацију коронарних артерија у стварном времену, међутим, током четрдесетих година двадесетог века, ограничавајући фактор за такав приказ био је техничке природе. Рендгенски апарати могли су да праве само по једну експозицију [13], а рендгенски техничари су касете с филмовима мењали ручно за сваку нову, што, и поред њиховог огромног труда, није било довољно брзо да се прикаже контрастно средство у коронарним артеријама. Касета с једним филмом замењена је сериографом 1949. године, што је омогућило развој снимања на рол-филму [6]. Управо је Дотер 1950. изумео магацин за рол-филм с могућношћу снимања два фрејма у секунди [14]. Иако није био инжењер, овај изум је прошао тест времена и представља основу за рад данашњих апарата [11].

Катетери

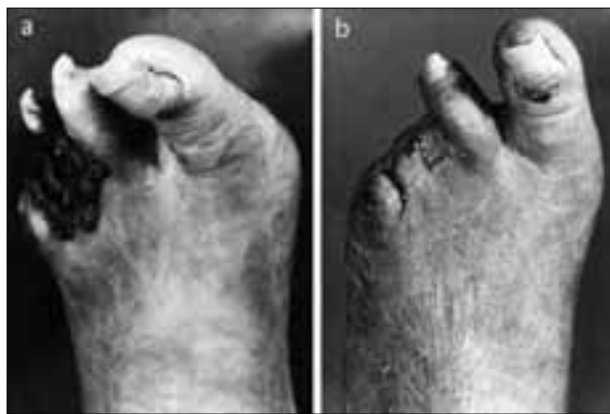
Један од највећих изазова у развоју интервентне радиологије било је дизајнирање катетера. Током своје каријере Дотер је сам креирао и правио катетере, као и све што му је било неопходно за интервенције, користећи често неуобичајене материјале, као што су жица од гитаре, кабл од брзиномера аутомобила, изолациони материјал од винила с кабла за интерфон и сл. [10]. Техничари у његовој лабораторији правили су катетере према његовим нацртима. Током састанка

Удружења радиолога Северне Америке у Чикагу 1963, Дотер је упознао пионира ангиопластике Била Кука (*Bill Cook*). Дотер је дотад са својим сарадницима већ правио водич-жице и тефлонске катетере, које је обликовао помоћу тзв. *blowtorch*, алатке којом је загревао тефлон и на тај начин обликовао катетере, али су његове потребе биле веће [12]. *Cook Incorporate* је била нова фирма, а Бил Кук оснивач и једини запослени. Кук је свој први сусрет са Дотером описао следећим речима: „Демонстрирао сам будућим потенцијалним купцима како се извлачи врх на тефлонским катетерима, када сам приметио да неко седи иза мене на кутији. Био је то низак човек мишићаве грађе, ћелав, продорног погледа. Нисам знао ко је, али ме је чинио нервозним. Окренуо сам се ка њему и упитао га могу ли му икако помоћи, на шта је он одрично одговорио, окренуо се и отишао. Пред крај радног дана вратио се до мене с питањем да ли може да позајми мало тефлонске цевчице и користи мој *blowtorch*. Рекао је да хоће да проба да направи катетере у својој хотелској соби. Размишљајући како испред себе имам будућег радника, рекао са му да може и упитао га за име. Следећег јутра ме је чекао са десет одлично направљених катетера и мојим *blowtorch*-ом. Касније тога дана продао сам ове катетере за десет долара по комаду и тако започео свој посао.“ [12] Последњег дана састанка Дотер је понудио Куку да крене с њим у Портланд и том приликом дао му нацрте за своја два телескопска катетера. На основу ових нацрта направљен је први сет за дилатацију, који је омогућио Дотеру да изведе своји први захват [12].

Ангиопластика

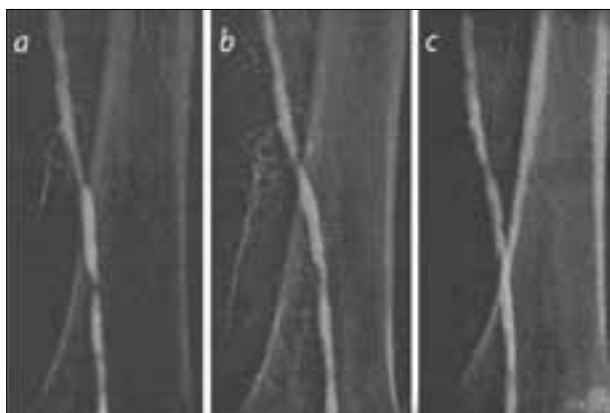
Пре тзв. терапије катетером све васкуларне процедуре су биле хируршке. Дотеров циљ је био лечење без скалпела с истим терапијским ефектом и снижењем морбидитета и морталитета болесника од кардиоваскуларних обољења. Било је потребно да прође много година рада да би хирурзи прихватили перкутану транслуминалну ангиопластику (ПТА) као алтернативну хируршку методу [11]. Назив „ангиопластика“ настала је од грчких речи *angeion*, што значи „крвни суд“, и *plastos*, што значи „обликован“.

Прва Дотерова интервенција није била планирана. Наиме, 1963. године случајно је реканалисао оклудирану десну илијачну артерију приликом увођења катетера ретроградно из феморалне артерије током дијагностичке процедуре, абдоминалне аортографије [6]. Приказ овог случај саопштен је на конгресу радиолога у тадашњој Чехословачкој јуна исте године [15]. Шеснаестог јануара 1964. Дотер је са својим учеником Мелвином Јудкинсом (*Melvin Judkins*) први пут урадио елективну дилатацију са посебно направљеним сетом за процедуру. Пацијент је била 82-годишња Лора Шо (*Laura Shaw*), која је примљена у болницу због болова, улцерација на левој нози које нису хтеле да зарасту и гангрене прстију. Хирурзи су јој предложили ампутацију леве ноге, коју је одбила. Тадашњи шеф хирур-



Слика 4. Лево стопало Лоре Шо недељу дана (a) и пет месеци (b) након интервенције [8]

Figure 4. Left foot of Laura Shaw one week (a) and five months (b) after the intervention [8]



Слика 5. Ангиограм AFS Лоре Шо пре интервенције (a), непосредно након процедуре (b) и три недеље касније (c) [8]

Figure 5. Angiograms of AFS of Laura Shaw before (a), immediately after (b) and three weeks after the intervention (c) [8]

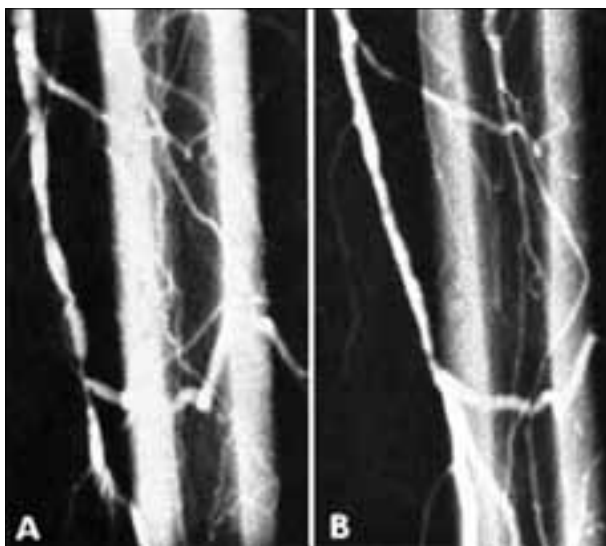
шког одељења Вилијем Крипене (*William Krippaehne*), блиски Дотеров сарадник, предложио му је да погледа болесницу. Након прегледа одлучио је да начини ангиографски снимак ноге, који је показао кратку значајну стенозу *a. femoralis superficialis* (AFS). Стеноза је била идеална за тестирање новог катетера за дилатацију. Интервенција је прошла одлично, нога болеснице постала је топла, она није имала више болове, а улцерације су зарасле (Слика 4) [8, 9]. Контролни ангиограми рађени су након три недеље и шест месеци, и показали су проходну AFS без знакова поновне стенозе (Слика 5) [8]. Оперисана жена је живела још три године без икаквих проблема с ногама, а умрла је од нелечене коронарне болести [16].

У то време односи између васкуларних хирурга и интервентних радиолога били су пуни неповерења. Једна од анегдота из тог периода била је када је хирург из болнице у којој је Дотер радио послао пацијента на дијагностичку ангиографију доњих екстремитета с подвученом назнаком на упуту: „Урадити ангиограм, али не покушавати интервенцију“ (Слика 6) [8]. Ангиограм је показао да AFS и *a. femoralis profunda* (AFP) леве ноге имају ангиографски значајне стенозе. Дотер је интервенцију на AFP урадио успешно, што је и доказао контролним ангиограмом (Слика 7) [8, 14].



Слика 6. Упут за ангиографију [8]

Figure 6. Angiography request form



Слика 7. Ангиограм AFP пре (A) и након интервенције (B) [8]

Figure 7. Angiograms of AFP obtained before (A) and after the intervention (B) [8]

Након овога, са задовољством је препричавао како је заобишао наређење хирурга. Хируршка интервенција на AFS код овог болесника била је неуспешна, али захваљујући интервентној процедури на AFP, његова нога је спасена [8].

Дотер и Гринциг

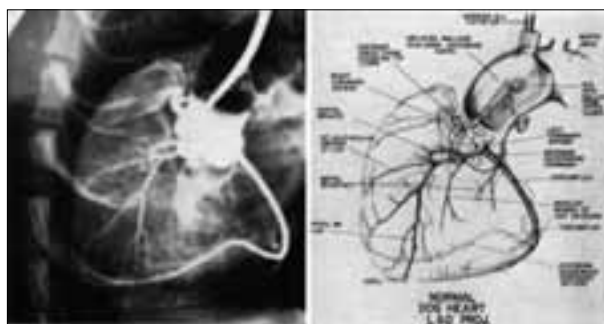
Дотер је своје пацијенте редовно подвргавао контролним прегледима, што му је омогућило да докаже да су његове процедуре успешне. Став Америчког удружења васкуларних хирурга према ПТА почео је да се мења у позитивном смислу од 1974. године, када је у Цириху кардиолог Андреас Гринциг (*Andreas Gruentzig*) модификовао Дотеров катетер за дилатацију периферних артерија. Развио је катетер са двоструким луменом, који је имао балон од поливинилхлорида. За овакав балон-катетер било је потребно мање место пункције, што је умањивало ризик од настанка хематома. Овај балон је при експандирању вршио циркуферентни притисак на атеросклеротски плак, за разлику од Дотеровог катетера, који је више деловао аксијално. На-

кон што је Гринциг у престижном часопису *The Lancet* 1978. године [17] објавио првих пет успешно урађених ПТА захвата, став хирурга постао је поверљивији према овој врсти интервенције [6, 18].

До 1981. године и Дотер је изјавио да су односи између хирурга и интервентних радиолога одлични [10]. Гринцигов допринос промени овога става у погледу примене ПТА био је огроман. Мелвин Јудкинс је о њима изјавио: „Др Дотер је често саопштавао своје идеје на неконзервативан начин. Гринциг је радио супротно – представљао се као крајње опрезан, а Чарли као агресиван. Мислим да су се обојица представљали мало другачијим него што су стварно били. Дотера бих описао као особу која је развила концепт интервентне радиологије, иновативну, која воли да рескира... Др Дотера су често називали ‘Људи Чарли’ јер нису разумели његове иновативне и неконвенционалне идеје.“ [10] Гринциг је, за разлику од Дотера, поштовао тадашње норме медицинског естаблишмента. Водио је рачуна да себе представи као опрезног и конзервативног у научном погледу. Као такав брзо је стекао славу за своја техничка достигнућа. Гринцигова слава и прихватање његовог рада довели су до тога да се признају заслуге Дотеру за ПТА, коју је он урадио 15 година раније [10]. У једном интервјуу Дотер је објаснио како је ситуација истовремено била и охрабрујућа и тескобна, те да је у раним данима развоја ПТА морао да истрпи многе непријатне коментаре типа: како је луд, не може му се веровати, ван контроле је, па и горе. ПТА коју је развио и приказао Дотер превазишла је сва очекивања. У време њеног зачета Дотер је био фрустриран због несхваћености и става околине да срља у нешто што не треба [13]. У најтежим тренуцима тешило га је то што је знао да су сва велика открића у медицини током историје наилазила на исту реакцију, али су временом била прихваћена онако како заслужују.

ЕКСПЕРИМЕНТАЛНИ РАД И САРАДНИЦИ

Још један од Дотерових пројеката био је развој новог, сигурног начина визуелизације коронарних крвних судова. Јула 1958. Дотер је са својим сарадником Фришом (*Frische*) објавио рад у часопису „Радиологија“ о техници оклузивне аортографије, у којем је описао своје експерименте на псима [19]. Метода се заснивала на меканом балон-катетеру са двоструким луменом (један на врху катетера и бочно, други око 2,5 *cm* испод првог). Први лумен служио је за убризгавање контрастног средства, а други за надувавање балона, који је био довољне ширине да оклудира аорту. Под краткотрајном општом анестезијом катетер је кроз радијалну артерију увођен у аорту и након позиционирања експандиран угљен-диоксидом, а кроз први лумен је убризгавана мала количина контрастног средства (4 *ml*) и прављене су експозиције током 6–8 секунди. Свих 78 паса укључених у експеримент је преживело [6, 19]. У студији је коришћен ацетилхолин ради изазивања пролазног срчаног застоја и добијања бољег



Слика 8. Оклузивна аортографија [21]

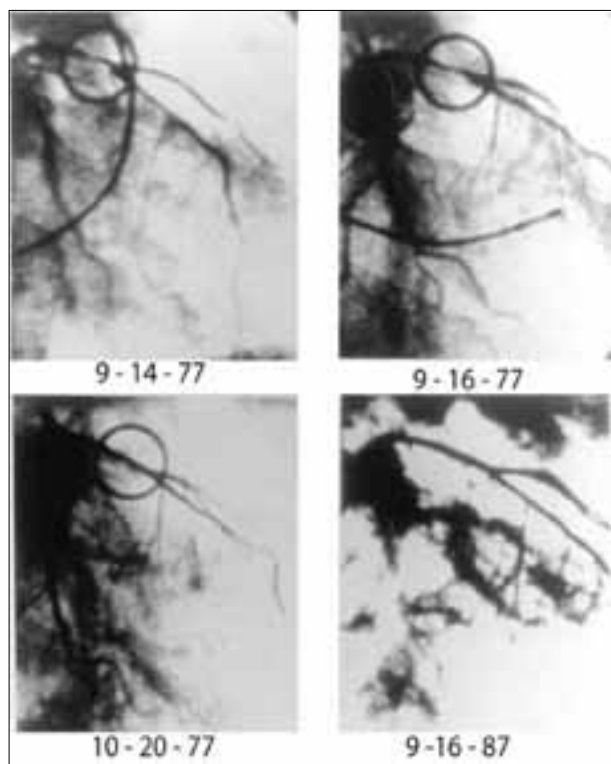
Figure 8. Occlusive aortography [21]

квалитета слике [20]. Због великог ризика од вентрикуларне фибрилације, ова метода није никад заживела (Слика 8) [21].

Тридесетог октобра 1958. године у Кливленду Ф. Мејсон Санс (*F. Mason Sones*) је приликом аортографије код 26-годишњег пацијента случајно канулирао остијум десне коронарне артерије и убризгао контрастно средство. Из овог искуства је схватио да мала количина овог средства интракоронарно може бити сигурна и поуздана метода приказа коронарних артерија [22]. Мелвин Јудкинс је тада упућен на едукацију код Санса да би овладао његовом техником. Учећи и усавршавајући се и код Дотера и код Санса, Јудкинс је развио и усавршио сет катетера за селективну канулацију коронарних ушћа трансфеморалним приступом уместо компликованије процедуре по методи Санса, који је хируршки препарисао брахијалну артерију. Јудкинсова техника селективне коронарографије примењује се и данас. Феморални приступ без хируршке препарације први је применио шведски радиолог Селдингер (*Seldinger*) и приказ објавио 1953. године [23].

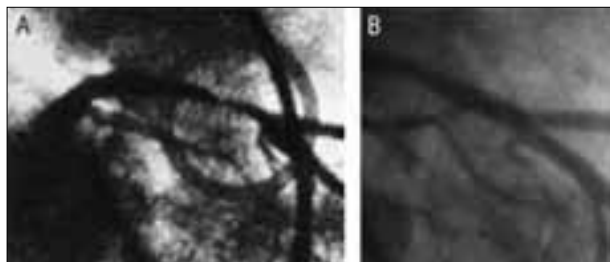
Дотерову пажњу од 1950. привлачила је катетеризација десног срца [24]. Експериментисао је с катетерима од разних материјала, али тек с катетером од силикона и пластике (енгл. *silastic*), који је био еластичан, мекан, инертан и мале тромбогености, добио је идеју да је код плућне тромбоемболије могуће селективно дати стрептокиназу [25]. Био је зачетник ове идеје [26, 27].

Захваљујући већ поменутом Гринцигу развија се и коронарна ангиопластика. Гринциг је 1976. године периферне балон-катетере умањео (све то је радио у својој кухињи). Пречник овог катетера био је 1,5–2 *mm* и имао је двоструки лумен. Овај прототип није имао водич-жицу. Кратка водич-жица, која је била прикачена на врх катетера, направљена је тек 1979. Године 1981. и 1982. Симпсон (*Simpson*) и сарадници направили су дугачку водич-жицу која је пролазила кроз централни лумен катетера. У почетку су рађени експерименти на псима и кадаверима. Прва перкутана транслуминална коронарна ангиопластика (PTCA) на пацијенту експериментално је урађена маја 1977. у Сан Франциску, током хируршке реваскуларизације миокарда. Овај експеримент је урађен да би се испитало да ли атеросклеротски плак може да се дилатира и шта ће бити са дисталним емболусима. После дефлације и извлачења балона, у артерију је пласирана



Слика 9. Прва *PTCA* пре интервенције и другог дана, месец дана и десет година после интервенције [18]

Figure 9. Angiograms of the first *PTCA* before intervention and on the second day, one month and ten years after the intervention [18]



Слика 10. Коронарограм прве *PTCA* пре интервенције (A) и 2000. године (B) [28]

Figure 10. Coronary angiogram of the first *PTCA* before coronary angioplasty (A) and the control angiogram in 2000 (B) [28]

канила, дилатирана коронарна артерија је пропрана, а њен садржај филтриран. Никакав дебрис није нађен [26]. Неколико месеци касније, 17. септембра 1977. у Цириху, Гринциг је извео прву *PTCA* на 38-годишњем болеснику са значајном стенозом проксималне леве предње нисходне артерије (*LAD*) дијагностиковане три дана раније [27]. Болеснику је пре операције објашњено да је ова метода алтернатива хируршкој реваскуларизацији и да се, уколико дође до компликација, подвргне хитној хируршкој реваскуларизацији, као и да је примењена на неколико стотина пацијената с периферном артеријском болешћу. *PTCA* је, међутим, успешно изведена (Слика 9) [6, 18, 27]. Болесник је тек у 61. години (2000. године) пријавио лекару да повремено осећа нелагодност и болове у грудима, али само у стању мировања, не и при напрезању. Поновна коронарографија урађена 10. априла 2000. показала је ангиографски занемарљиву рестенозу са безначајним

променама на другом месту (Слика 10) [28]. Никаква даља интервенција није рађена, а накнадно урађен тест оптерећења био је негативан за исхемију миокарда.

Марта 1977. у Нирнбергу одржан је први велики састанак интервентних радиолога и кардиолога из Европе и Северне Америке, а тачно 15 година касније у истом граду основано је Међународно друштво „Андреас Гринциг“.

Уз горепоменуће великане инвазивне радиологије и кардиологије свакако је потребно поменути и значајна имена људи који су дали свој допринос овој области селективном канулацијом висцералних грана аорте. Чајлд (*Child*) и Саливен (*Sullivan*) су 1951. године урадили прву спленопортографију канулирајући хепатичну вену с катетером у положају клина (енгл. *wedge*). Одман (*Ödman*) је катетерима са посебно закривљеним врхом селективно канулирао артерије панкреаса и заједно са Селдингером бубрежне артерије. Баум (*Baum*) и Рој (*Roy*) су 1965. године описали канулацију мезентеричне артерије, а годину дана након тога Мини (*Meany*) је описао канулацију надбубрежне артерије код патолошки измењене надбубрежне жлезде.

У историји кардиоваскуларне интервентне медицине 1985. је обележена као година великог губитка с обзиром на то да су те године преминули њени оснивачи: Дотер, Јудкинс, Санс и Гринциг.

ИНВАЗИВНА КАРДИОВАСКУЛАРНА МЕДИЦИНА КОД НАС

Релативно брзо, не заостајући много за иновацијама у области медицине, на нашим просторима се појављују пионири инвазивних процедура на крвним судовима. Почети су скромни, али захваљујући великој енергији, храбрости, вољи и истрајности наших истраживача, брзо је ухваћен корак са светом. Почетком педесетих година двадесетог века професори Милован Ђурчић и Миодраг Јашовић вршили су прве катетеризације десног срца, оксиметрију и мерење притисака уз хируршку препарацију вене. Крајем педесетих година почињу да раде и транслумбалну аортографију. Директну пункцију феморалне артерије по Селдингеру 1966. примењивао је проф. Синиша Каменица. Средином шездесетих година почињу да се раде ангиографије периферних крвних судова и висцералних органа с проф. Каменицом на челу. Почетком седамдесетих година, отприлике у исто време, прве селективне коронарографије раде проф. Каменица, проф. Срећко Недељковић и проф. Бранислав Голднер [29]. Непуних пет година након прве урађене *PTCA* у свету, 1982, односно 1983. године код нас је изводе проф. Каменица, проф. Недељковић и др Сретен Грујичић. Експанзија инвазивних дијагностичких и интервентних процедура на нашим просторима настаје током деведесетих година. Захваљујући огромном ентузијазму, снази и истрајности проф. Миодрага Остојића, на прелазу из 20. у 21. век стајемо у корак са светом у инвазивним процедурама на коронарним крвним судовима.

ЗАКЉУЧАК

Свако ново велико откриће у медицини, па и инвазивна дијагностичка и терапијска метода са својим

пионирима, који су у почетку исмејани зато што су били испред свога времена, отворили су потпуно ново поглавље у дијагностиковању и лечењу болести кардиоваскуларног система.

ЛИТЕРАТУРА

1. Sutton D. Textbook of Radiology and Imaging. 5th ed. Edinburgh: Elsevier Health Sciences; 1992.
2. Topol EJ. Textbook of Interventional Cardiology. 4th ed. Philadelphia: Elsevier Health Sciences; 2003.
3. Berberich J, Hirsch S. Die Röntgenographische Darstellung der Arterien und Venen am lebenden Menschen. Klinische Wochenschrift. 1923; 2(49):2226-8.
4. Brooks B. Intra-arterial injection of sodium iodide. JAMA. 1924; 82:1016-9.
5. Dos Santos R, Lamas AC, Caldas JP. Arteriographie des membres et de la aorte abdominale. Paris: Masson; 1931.
6. Mueller RL, Sanborn TA. The history of interventional cardiology: cardiac catheterization, angioplasty, and related interventions. Am Heart J. 1995; 129:146-72.
7. Forssmann W. Die sondierung des rechten Herzens. Klinische Wochenschrift. 1929; 8:2085-7.
8. Payne MM. Charles Theodore Dotter: the father of intervention. Tex Heart Inst J. 2001; 28:28-38.
9. Friedman SG. Charles Dotter: interventional radiology. Radiology. 1989; 172:921-4.
10. Anonymous. Portraits in radiology: Charles T. Dotter, MD. Appl Radiol. 1981; 10:28,116.
11. Keller FS, Rosch J. A personal memoir of Charles Dotter (foreword). In: The Father of Interventional Radiology. Charles Dotter: Highlights of His Life and Research. Tokyo: Excerpta Medica Publishers; 1994:7-9.
12. Rosh J, Abrams HL, Cook W. Memorials: Charles T Dotter, 1920-1985. Am J Roentgenol. 1985; 144:1321-3.
13. Geddes LA, Geddes LE. The Catheter Introducers. Chicago: Mobium Press; 1993.
14. Smith DC, Dotter CT. Automatic X-Ray Roll-Film Magazine for Angiocardiology: Technical Considerations. Read before convention of the ASXT at Columbus, Ohio, 1950.
15. Dotter CT. Cardiac catheterization and angiographic technics of the future. Background and current status of clinical catheter angiography. Cesk Radiol. 1965; 19:217-36.
16. Dotter CT. Percutaneous transluminal angioplasty (training video), ca. 1972.
17. Gruentzig A. Transluminal dilatation of coronary artery stenosis (letter). Lancet. 1978; 1:263.
18. King SB III. Angioplasty from bench to bedside to bench. Circulation. 1996; 93:1621-9.
19. Dotter CT, Frische LH. Visualization of the coronary circulation by occlusion aortography: a practical method. Radiology. 1958; 71:502-23.
20. Dotter CT, Frische LH, Hoskinson WS, Kawashima E, Philips RW. Coronary arteriography during induced cardiac arrest and aortic occlusion. Arch Int Med. 1959; 104:720-9.
21. Kinney TB. Radiologic history exhibit. Charles T. Dotter: a pioneering interventional radiologist. Radiographics. 1996; 16:697-707.
22. Hall RJ. In memoriam: F. Mason Sones, Jr., M.D. Tex Heart Inst J. 1985; 12(4):356-8.
23. Seldinger SI. Catheter replacement of the needle in percutaneous arteriography. Acta Radiol Diagn. 1953; 39:368-76.
24. Dotter CT, Straube KR. Flow guided cardiac catheterization. Am J Roentgenol. 1962; 88:27-30.
25. Brodmann M, Stark G, Pabst E, Lueger A, Pilger E. Pulmonary embolism and intracardiac thrombi-individual therapeutic procedures. Vasc Med. 2000; 5:27-31.
26. Lund O, Nielsen TT, Schifter S, Roenne K. Treatment of pulmonary embolism with full dose heparin, streptokinase or embolectomy – results and indications. Thorac Cardiovasc Surg. 1986; 34:240-6.
27. Gruentzig AR, Myler RK, Hanna EH, Turina MI. Coronary transluminal angioplasty. Circulation. 1977; 55-56(Suppl III):III-84.
28. Meier B. The first patient to undergo coronary angioplasty – 23-year follow-up. N Engl J Med. 2001; 344(2):144-5.
29. Goldner B. Unusual intra-arterial communication in the normal right coronary tree. Cathet Cardiovasc Diagn. 1986; 12:399-401.

Pioneers of Invasive Cardiovascular Medicine – Charles Theodore Dotter and Colleagues: Short Historical Review

Jelena Kostić, Branko Beleslin, Milan Nedeljković, Miodrag Ostojić
Clinic for Cardiology, Clinical Center of Serbia, Belgrade, Serbia

SUMMARY

Within modern medicine at the beginning of 21st century, we are witnessing a revolutionary development of the invasive diagnostics and therapy of cardiovascular system diseases. With the discovery of X-rays at the end of 19th century by Wilhelm Roentgen, it is appropriate to reflect on the gifted individuals whose efforts drastically altered radiology and cardiology. The early techniques used in peripheral percutaneous transluminal angioplasty form the basis for subsequent percutaneous intervention both in the peripheral and coronary arteries and are largely the contribution of Charles Dotter. The main goal of his work was the use of catheters for diagnosis and treatment in an attempt to replace the scalpel. He was 20 years ahead of his time, especially with percutaneous transluminal angioplasty. The

first percutaneous transluminal angioplasty marked a new era in the treatment of peripheral atherosclerotic lesions. This practical genius dedicated his considerable energy to the belief that there is always a better way to treat disease. His personal contributions to clinical medicine, research, and teaching have saved millions of limbs and lives all over the world. European physicians, who were more open to unproven techniques, almost immediately embraced percutaneous transluminal angioplasty. Without the contribution and help of his colleagues, Forssmann, Sones and Gruentzig, all of them pioneers, nothing would be done. They were all ahead of their time and opened completely new chapter in medicine.

Keywords: history; X-ray; angioplasty; Charles Dotter

Општа упутства. Текст рада куцати у програму за обраду текста *Word*, латиницом (*Serbian Latin* кодни распоред), са двоструким проредом, искључиво фонтом *Times New Roman* и величином слова 12 тачака (12 pt). Све маргине подесити на 25 mm, величину странице на формат А4, а текст куцати са левим поравнањем и увлачењем сваког пасуса за 10 mm, без дељења речи (хифенације). Не користити табулаторе и узастопне празне карактере (спејсове) ради поравнања текста, већ алатке за контролу поравнања на лењиру и *Toolbars*. После сваког знака интерпункције ставити само један празан карактер. Ако се у тексту користе специјални знаци (симболи), користити фонт *Symbol*. Подаци о коришћеној литератури у тексту означавају се арапским бројевима у угластим заградама – нпр. [1, 2], и то оним редоследом којим се појављују у тексту. Странице нумерисати редом у оквиру доње маргине, почев од насловне стране.

Користити кратке и јасне реченице. Превод појмова из стране литературе треба да буде у духу српског језика. Све стране речи или синтагме за које постоји одговарајуће име у нашем језику заменити тим називом. За називе лекова користити искључиво генеричка имена. Уређаји (апарати) се означавају фабричким називима, а име и место произвођача треба навести у облим заградама. Уколико се у тексту користе ознаке које су спој слова и бројева, прецизно написати број који се јавља као експонент или као индекс (нпр. ⁹⁹Tc, II-6, O₂, B₂, CD8).

Уколико је рад део магистарске тезе, односно докторске дисертације, или је урађен у оквиру научног пројекта, то треба посебно назначити у напомени на крају текста. Такође, уколико је рад претходно саопштен на неком стручном састанку, навести званичан назив скупа, место и време одржавања.

Рукопис рада доставити одштампан једнострано на белој хартији формата А4 у три примерка. С обзиром на то да се рад куца латиницом, а чланак у часопису штампа ћирилицом, важно је да се у једном примерку рукописа који се предаје за штампу црвеном оловком подвуку речи (фразе, називи, скраћенице итд.) које ће остати у латиници (нпр. јединице мера, називи лекова, хемијске формуле, скраћенице које потичу од страних израза и слично).

Клиничка истраживања. Клиничка истраживања се дефинишу као истраживања која се односе на испитанике обухваћене једном здравственом интервенцијом или више њих, ради испитивања утицаја на здравствени исход. Регистарски број истраживања треба да се наведе у последњем реду Кратког садржаја.

Етичка сагласност. Рукописи о хуманим медицинским истраживањима или историјама болести пацијената треба да садрже изјаву у виду писаног пристанка испитиваних особа у складу са Хелсиншким декларацијом, одобрење локалног етичког одбора да се истраживање може извести и да је оно у складу са правним стандардима. Експериментална истраживања на хуманом материјалу и испитивања вршена на животињама треба да садрже изјаву етичког одбора институције и треба да су у сагласности с локалним правним стандардима.

Изјава о сукобу интереса. Уз рукопис се прилаже изјава свих аутора којом се изјашњавају о сваком могућем интересу или изјаву да немају сукоб интереса. За додатне информације о различитим врстама сукоба интереса видети на интернет страници Светског удружења уредника медицинских часописа (*World Association of Medical Editors – WAME*; www.wame.org) под „Политика изјаве о сукобу интереса”.

Ауторство. Све особе које су наведене као аутори рада треба да се квалификују за ауторство. Сваки аутор треба да је учествовао довољно у раду на рукопису како би могао да преузме одговорност за целокупан текст и резултате изнесене у раду. Ауторство се заснива само на: битном доприносу концепцији рада, добијању резултата или анализи и тумачењу резултата; планирању рукописа или његовој критичкој ревизији од знатног интелектуалног значаја; у завршном дотеривању верзије рукописа који се припрема за штампање (http://www.icmje.org/ethical_1author.html).

Аутори треба да приложе опис доприноса у рукопису за сваког коаутора појединачно. Финансирање, сакупљање података или генерално надгледање истраживачке групе сами по себи не могу оправдати ауторство. Сви други који су допринели изради рада, а који нису аутори рукописа, требало би да буду наведени у захвалници с описом њиховог рада, наравно, уз писани пристанак.

Насловна страна. На посебној, првој страници рукописа треба навести следеће: наслов рада без скраћеница; пуна имена и презимена аутора (без титула) индексирана бројевима; званичан назив установа у којима аутори раде, место и државу (редоследом који одговара индексираним бројевима аутора); на дну странице навести име и презиме, адресу за контакт, број телефона, факса и *e-mail* адресу аутора задуженог за кореспонденцију.

Кратак садржај. Уз оригинални рад, саопштење, преглед литературе, приказ болесника, рад из историје медицине, рад за рубрику „Језик медицине” и рад за праксу, на посебној страници треба приложити кратак садржај рада обима 100-250 речи. За оригинале радове кратак садржај треба да има следећу структуру: Увод, Циљ рада, Методе рада, Резултати, Закључак; сваки од наведених сегмената писати као посебан пасус који почиње болдованом речи. Навести најважније резултате (нумеричке вредности) статистичке анализе и ниво значајности. За приказе болесника кратак садржај треба да има следеће: Увод, Приказ болесника, Закључак; сегменте такође писати као посебан пасус који почиње болдованом речи. За остале типове радова кратак садржај нема посебну структуру.

Кључне речи. У Кључним речима не треба да се понављају речи из наслова, а треба да буду релевантне или описне. Испод кратког садржаја навести кључне речи (од три до шест). У избору кључних речи користити *Medical Subject Headings – MeSH* (<http://www.nlm.nih.gov/mesh>).

Превод на енглески језик. На посебној страници приложити наслов рада на енглеском језику, пуна имена и презимена аутора (без титула) индексирана бројевима, званичан назив установа на енглеском језику, место и државу. На следећој посебној страници приложити сажетак на енглеском језику (*Summary*) са кључним речима (*Keywords*), и то за радове у којима је обавезан кратак садржај на српском језику, који треба да има 100-250 речи. За оригиналне радове (*Original articles*) сажетак на енглеском треба да има следећу структуру: *Introduction, Objective, Methods, Results, Conclusion*; сваки од наведених сегмената писати као посебан пасус који почиње болдованом речи. За приказе болесника (*Case reports*) сажетак на енглеском треба да садржи следеће: *Introduction, Case outline, Conclusion*; сегменте такође писати као посебан пасус који почиње болдованом речи. Превести називе табела, графикана, слика, схема, целокупни српски текст у њима и легенду.

Треба се придржавати језичког стандарда *American English*. Радови који се у целини доставе на енглеском језику имају приоритет у објављивању.

Структура рада. Сви поднаслови се пишу великим словима и болдовано. Оригинални рад треба да има следеће поднаслов: Увод, Циљ рада, Методе рада, Резултати, Дискусија, Закључак, Литература. Преглед литературе чине: Увод, одговарајући поднаслови, Закључак и Литература. Аутор прегледног рада мора да наведе бар пет аутоцитата (референце у којима је био први аутор или коаутор рада) радова публикованих у часописима с рецензијом. Коаутори, уколико их има, морају да наведу бар један аутоцитат радова такође публикованих у часописима с рецензијом. Приказ болесника чине: Увод, Приказ болесника, Дискусија, Литература. Не треба користити имена болесника или иницијале, бројеве историје болести, нарочито у илустрацијама. Прикази болесника не смеју имати више од седам аутора.

Скраћенице. Користити само када је неопходно, и то за веома дугачке називе хемијских једињења, односно називе који су као скраћенице већ препознатљиви (стандардне скраћенице, као нпр. ДНК, сида, ХИВ, АТП). За сваку скраћеницу пун термин треба навести при првом навођењу у тексту, сем ако није стандардна јединица мере. Не користити скраћенице у наслову. Избежавати коришћење скраћеница у кратком садржају, али ако су неопходне, сваку скраћеницу поново објаснити при првом навођењу у тексту.

Децимални бројеви. У тексту рада на српском децималне бројеве писати са зарезом, а у тексту на енглеском, у табелама, на графиконима и другим прилозима, будући да се и у њима наводи и превод на енглеском језику, децималне бројеве писати са тачком (нпр. у тексту ће бити 12,5±3,8, а у табели 12.5±3.8). Кад год је то могуће, број заокружити на једну децималу.

Јединице мера. Дужину, висину, тежину и запремину изражавати у метричким јединицама (метар – *m*, килограм – *kg*, литар – *l*) или њиховим деловима. Температуру изражавати у степенима Целзијуса ($^{\circ}\text{C}$), количину супстанце у молима (*mol*), а притисак крви у милиметрима живиног стуба (*mm Hg*). Све резултате хематолошких, клиничких и биохемијских мерења наводити у метричком систему према Међународном систему јединица (*SI*).

Обим рукописа. Целокупни рукопис рада – који чине насловна страна, кратак садржај, текст рада, списак литературе, сви прилози, односно потписи за њих и легенда (табеле, слике, графикони, схеме, цртежи), насловна страна и сажетак на енглеском језику – мора износити за оригинални рад, саопштење, рад из историје медицине и преглед литературе до 5.000 речи, а за приказ болесника, рад за праксу, едукативни чланак и рад за „Језик медицине” до 3.000 речи; радови за остале рубрике морају имати до 1.500 речи.

Провера броја речи у документу може се извршити у програму *Word* кроз подмени *Tools–Word Count* или *File–Properties–Statistics*.

Табеле. Свака табела треба да буде сама по себи јасно разумљива. Наслов треба откуцати изнад табеле, а објашњења испод ње. Табеле се означавају арапским бројевима по редоследу навођења у тексту, са називом на српском и енглеском језику (*Table*). Табеле радити искључиво у програму *Word*, кроз мени *Table–Insert–Table*, уз дефинисање тачног броја колона и редова који ће чинити мрежу табеле. Десним кликом на мишу – помоћу опција *Merge Cells* и *Split Cells* – спајати, односно делити ћелије. У једну табелу, у оквиру исте ћелије, унети и текст на српском и текст на енглеском језику – никако не правити две табеле са два језика! Куцати фонтом *Times New Roman*, величином слова 12 *pt*, са једноструким проредом и без увлачења текста. Коришћене скраћенице у табели треба објаснити у легенди испод табеле на српском и енглеском језику. Сваку табелу одштампати на посебном листу папира и доставити по један примерак уз сваку копију рада (укупно три примерка табеле за рад који се предаје).

Слике. Слике се означавају арапским бројевима по редоследу навођења у тексту, са називом на српском и енглеском језику (*Figure*). За сваку слику доставити три примерка или три сета у одвојеним ковертама. Примају се искључиво оригиналне фотографије (црно-беле или у боји), на сјајном (глатком, а не мат) папиру, по могућству формата 9×13 *cm* или 10×15 *cm*. На полеђини сваке слике ставити налепницу са редним бројем слике и стрелицом која означава горњи део слике. Водити рачуна да се фотографије не оштете на било који начин. Сlike снимљене дигиталним фотоапаратом доставити на *CD* и одштампане на папиру, водећи рачуна о квалитету (оштрини) и величини дигиталног записа. Резолуција треба да буде 300 *dpi*, формат слике 10×15 *cm*, а формат записа *JPG* или *.TIFF*. Уколико аутори нису у могућности да доставе оригиналне фотографије, треба их скенирати као *Grayscale* у резолуцији 300 *dpi* и у оригиналној величини и снимити на *CD*.

Слике се могу објавити у боји, али додатне трошкове штампе сноси аутор.

Графикони. Графикони треба да буду урађени и достављени у програму *Excel*, да би се виделе пратеће вредности распоређене по ћелијама. Исте графиконе линковати и у *Word*-ов документ, где се графикони означавају арапским бројевима по редоследу навођења у тексту, са називом на српском и енглеском језику (*Graph*). Сви подаци на графикону куцају се у фонту *Times New Roman*, на српском и енглеском језику. Коришћене скраћенице на графикону треба објаснити у легенди испод графикона на српском и енглеском језику. Сваки графикон одштампати на посебном листу папира и доставити по један примерак уз сваку копију рада (укупно три примерка за рад који се предаје).

Схеме (цртежи). Схеме радити у програму *Corel Draw* или *Adobe Illustrator* (програми за рад са векторима, кривама). Сви подаци на схеми куцају се у фонту *Times New Roman*, на српском и енглеском језику (*Scheme, Drawing*), величина слова 10 *pt*. Коришћене скраћенице на схеми треба објаснити у легенди испод схеме на српском и енглеском језику. Сваку схему одштампати на посебном листу папира и доставити по један примерак уз сваку копију рада (укупно три примерка за рад који се предаје).

Захвалница. Навести све оне који су допринели стварању рада а не испуњавају мерила за ауторство, као што су особе које обезбеђују

техничку помоћ, помоћ у писању рада или руководе одељењем које обезбеђује општу подршку. Финансијска и материјална помоћ, у облику спонзорства, стипендија, поклона, опреме, лекова и друго, треба такође да буде наведена.

Литература. Списак референци је одговорност аутора. Цитирани чланци треба да буду лако приступачни читаоцима часописа. Референце нумерисати редним арапским бројевима према редоследу навођења у тексту. Број референци не би требало да буде већи од 30, осим у прегледу литературе, у којем је дозвољено да их буде до 50. Број цитираних оригиналних радова мора бити најмање 80% од укупног броја референци, односно број цитираних књига, поглавља у књигама и прегледних чланака мањи од 20%. Уколико се домаће монографске публикације и чланци могу уврстити у референце, аутори су дужни да их цитирају. Већина цитираних научних чланака не треба да буде старија од пет година. Избегавати коришћење апстракта као референце, а апстракте старије од две године не цитирати. Референце чланака који су прихваћени за штампу треба означити као „у штампи” (*in press*) и приложити доказ о прихватању рада.

Референце се цитирају према Ванкуверском стилу (униформисаним захтевима за рукописе који се предају биомедицинским часописима), који је успоставио Међународни комитет уредника медицинских часописа (<http://www.icmje.org>), чији формат користе *U.S. National Library of Medicine* и базе научних публикација. Примере навођења публикација (чланака, књига и других монографија, електронског, необјављеног и другог објављеног материјала) можете пронаћи на интернет-страници http://www.nlm.nih.gov/bsd/uniform_requirements.html. Приликом навођења литературе веома је важно придржавати се поменутог стандарда, јер је то један од три најбитнија фактора за индексирање приликом класификације научних часописа. Правилним навођењем литературе Српски архив би добио на квалитету и боље би се котирао на листи светских научних часописа.

Пропратно писмо. Уз рукопис обавезно приложити писмо које су потписали сви аутори, а које треба да садржи: изјаву да рад претходно није публикован и да није истовремено поднет за објављивање у неком другом часопису, те изјаву да су рукопис прочитали и одобрили сви аутори који испуњавају мерила ауторства. Такође је потребно доставити копије свих дозвола за: репродуковање претходно објављеног материјала, употребу илустрација и објављивање информација о познатим људима или именовање људи који су допринели изради рада.

Чланарина и претплата. Да би рад био објављен у часопису *Српски архив за целокупно лекарство*, сви аутори лекари морају бити чланови Српског лекарског друштва, а први аутор и претплатник на часопис за годину у којој се рад предаје Уредништву. Уз рукопис рада треба доставити копије уплатница за чланарину и претплату као доказ о уплататама. Иностране аутори нису дужни да буду чланови СЛД, нити претплатници на часопис. Додатне информације о чланарини и претплати могу се добити на телефоне 011/3245-149 и 011/3346-963, односно на интернет-страници *Српског архива* (www.srp-arh.rs).

Слање рукописа. Рукопис рада и сви прилози уз рад могу се доставити препорученом поштом, имејлом (srp-arhiv@bvcom.net), електронски преко система за пријављивање на сајту *Српског архива* (www.srp-arh.rs) или лично, доласком у Уредништво. Уколико се рад шаље поштом или доноси у Уредништво, текст се доставља одштампан у три примерка и нарезан на *CD* (снимљени материјал треба да је идентичан оном на папиру).

Напомена. Рад који не испуњава услове овог упутства не може бити упућен на рецензију и биће враћен ауторима да га допуне и исправе. Придржавањем упутства за писање рада за *Српски архив* знатно ће се скратити време целокупног процеса до објављивања рада у часопису, што ће позитивно утицати на квалитет и редовност излажења свежака.

Адреса:

Српско лекарско друштво
Уредништво часописа „Српски архив за целокупно лекарство”
ул. Џорџа Вашингтона 19
11000 Београд, Србија

E-mail: srp-arhiv@bvcom.net

Интернет-адреса: www.srp-arh.rs

General instructions. The text of the manuscript should be typed in *Word* format, Roman alphabet (*Serbian Latin*), with double spacing, using exclusively the *Times New Roman* font, and font size 12 pt. The text should be prepared with margins set to 25 mm and onto A4 paper size, aligned left and the initial lines of all paragraphs indented 10 mm, without hyphenation. Tabs and successive blank spaces are not to be used for text alignment; instead, ruler alignment control tool and toolbars are suggested. Only one space follows after any punctuation mark. If special signs (symbols) are used in the text, use the *Symbol* font. References cited in the text are numbered with Arabic numerals in the parenthesis (for example: [1, 2]), in order of appearance in the text. Pages are numbered consecutively within the bottom margin, beginning from the title page.

Write short and clear sentences. The terms taken from foreign literature should be translated into comprehensible English. All foreign words or syntagms that have a corresponding term in English should be replaced by that term. Generic names should be exclusively used for the names of drugs. Devices (apparatuses, instruments) are termed by trade names, while their name and place of production should be indicated in the brackets. If a letter-number combination is used, the number should be precisely designated in superscript or subscript (i.e., ^{99}Tc , IL-6, O_2 , B_{12} , CD8).

If the paper is a part of the master's or doctoral thesis, or a research project, that should be designated in a separate note at the end of the text. Also, if the article was previously presented at any scientific meeting, write the name, venue and time of the meeting.

The manuscript should be printed on one side of the white A4 sheet of paper, and submitted in three (3) copies.

Clinical trials. Clinical trial is defined as any research related to human subjects involving one or more health related interventions in order to evaluate the effects on health outcomes. The trial registration number should be included as the last line of the abstract.

Ethical approval. Manuscripts with human medical research, or patients case histories should contain a statement that the subjects written consent was obtained, according to the Declaration of Helsinki, the study has been approved by local ethics committee and conforms to the legal standards. Experimental studies with human material and animal studies should contain statement of the institutional ethics committee and meet local legal standards.

Conflict of interest statement. A disclosure statement from all authors declaring any potential interest or stating that the authors have no conflict of interest. For additional information on different types conflict of interest, see World Association of Medical Editors (WAME, www.wame.org) policy statement on conflict of interest.

Authorship. All individuals listed as authors should be qualified for authorship. Every author should have participated sufficiently in writing the article in order to take responsibility for the whole article and results presented in the text. Authorship is based only on: crucial contribution to the article conception, obtaining of results or analysis and interpretation of results; design of manuscript or its critical review of significant intellectual value; final revision of the manuscript being prepared for publication (http://www.icmje.org/ethical_1author.html).

The authors shall enclose the description of contribution to the manuscript of any co-author individually. Funding, collection of data or general supervision of the research group alone cannot justify authorship. All other individuals having contributed to the preparation of the article shall be mentioned in the *Acknowledgment* section, with description of their activities, and their written consent.

Title page. The separate, cover sheet, of the manuscript should include the following: title of the article without any abbreviations; each author's full names and family names (no titles), indexed by numbers; name and institutional address of the author(s), in order corresponding to the indexed numbers of the authors; name and family name, corresponding address, phone and fax number, and e-mail address of one of the authors should be typed at the bottom of the page.

Summary. Along with the original article, communication, review article, case report, article on history of medicine, article for "Language of medicine" and article for practitioners, the abstract not exceeding 100-250 words should be typed on a separate sheet of paper. In the original article, the summary shall have the following structure: Introduction, Objective, Methods,

Results and Conclusion. Each segment shall be typed in a separate paragraph using boldface. The most significant results (numerical values), statistical analysis and level of significance are to be included. In case reports, the summary shall consist of the following: Introduction, Case outline and Conclusion. Each segment shall be typed in a separate paragraph using boldface. In other types of articles, the summary has no special outline.

Keywords. The keywords need not repeat words in the title and should be relevant or descriptive. Keywords shall be typed below the abstract (3 to 6 words). *Medical Subject Headings – MeSH* (<http://www.nlm.nih.gov/mesh>) are to be used for selection of the keywords.

Structure of the article. All section headings should be in capital letters using boldface. Original articles shall have the following section headings: Introduction, Objective, Methods, Results, Discussion, Conclusion and References. The review article includes: Introduction, corresponding section headings, Conclusion, and References. The author of a review article should cite at least five auto-citations (references of which he was the author or co-author of the paper) of papers published in peer-reviewed journals. Co-authors, if any, should cite at least one auto-citation of papers also published in peer-reviewed journals. The case report should consist of: Introduction, Case outline, Discussion and References. No names of patients, initials or numbers of medical records, particularly in illustrations, should be mentioned. Case Reports should not have more than seven authors.

Abbreviations. To be used only if appropriate, for very long names of chemical compounds, or as well-known abbreviations (standard abbreviations such as DNA, AIDS, HIV, ATP etc.). Full meaning of each abbreviation should be indicated when it is first mentioned in the text unless it is a standard unit of measure. No abbreviations are allowed in the title. Abbreviations in the abstract should be avoided, but if they have to be used, each of them should be explained when first mentioned in the text.

Units of measure. Length, height, weight and volume should be expressed in metric units (metre – *m*, kilogram – *kg*, litre – *l*) or subunits. Temperature should be in Celsius degrees ($^{\circ}\text{C}$), quantity of substance in moles (*mol*), and blood pressure in millimetres of mercury column (*mm Hg*). All results of haematological, clinical and biochemical measurements should be expressed in the metric system according to the International System of Units (SI units).

Length of the manuscript. The entire text of the manuscript – title page, summary, the whole text, list of references, all enclosures including captions and legends (tables, photos, graphs, schemes, sketches) – must have maximum 5,000 words for original articles, communications, review articles and articles on history of medicine, and 3,000 words for case reports, articles for practitioners, educational articles and articles for "Language of medicine"; for any other section maximum is 1,500 words.

To check the required number of words in your manuscript, you may use the menu *Tools–Word Count*, or *File–Properties–Statistics*.

Tables. Each table, with its legend, should be self-explanatory. The title should be typed above the table and any explanatory information under the table. Tables should be numbered in Arabic numerals in order of citation in the text. Use *Word* format, the menu *Table–Insert–Table*, inserting the adequate number of rows and columns. By the right click of the mouse, use the options *Merge Cells* and *Split Cells*. Use *Times New Roman*, font size 12 pt, with single spacing and no indent to draw the tables. Abbreviations used in tables should be explained in the legend below the respective table. Each table should be printed on a separate sheet of paper and submitted in one copy for each copy of the manuscript (i.e., three copies of tables for each manuscript submitted).

Photographs. Photographs are numbered in Arabic numerals in order of citation in the text. Each photograph is submitted in three copies or three sets in separate envelopes. Only original photographs (black and white or colour), on smooth (shiny, and not matt) paper are acceptable, in $9 \times 13 \text{ cm}$ or $10 \times 15 \text{ cm}$ in size, if possible. Each photograph should be labelled on the back. The label should contain the ordinal number of the photo and an arrow designating the top of the photograph. Take care not to damage the photographs in any way. Photographs taken by digital camera should be written on CD and printed on paper, as well, and submitted as such, taking care of the quality (sharpness) and size of digital recording. Resolution of

300 *dpi*, photograph format of 10×15 *cm* and format of the picture *.JPG* or *.TIF* are advisable. If authors are not able to provide original photographs, then the photos should be scanned as *Grayscale* with resolution of 300 *dpi*, in original size and written on CD.

Photographs may be printed and published in colour, but the expenses shall be covered by the author.

Graphs. Graphs should be plotted in *Excel* in order to see the respective values distributed in the cells. The same graphs should be linked to *Word* document, numbered in Arabic numerals by order of citation in the text. Abbreviations used in graphs should be explained in the legend below the respective graph. Each graph should be printed on a separate sheet of paper and submitted in one copy for each copy of the manuscript (i.e., three copies of tables for each manuscript submitted).

Schemes (sketches). Schemes should be drawn in *Corel Draw* or *Adobe Illustrator* (programmes for drawing vectors, curves, etc.). The text in the schemes is to be typed in *Times New Roman*, font size 10 *pt*. Each scheme should be printed on a separate sheet of paper and submitted in one copy for each copy of the manuscript (i.e., three copies of schemes for each manuscript submitted). The abbreviations used in the scheme should be explained in the legend below it.

Acknowledgment. List all those individuals having contributed to preparation of the article but having not met the criteria of authorship, such as individuals providing technical assistance, assistance in writing the paper or running the department securing general support. Financial and all other support in the form of sponsorship, grants, donations of equipment and medications, etc., should be mentioned, too.

References. The reference list is the responsibility of the authors. Cited articles should be readily accessible to the journals readership. References should be numbered in Arabic numerals in order of citation in the text. The overall number of references should not exceed 30, except in literature reviews, where maximum 50 is acceptable. The number of citations of original articles must be at least 50% of the total number of references, and the number of citations of books, chapters and literature reviews less than 20%. The majority of the cited articles should not be older than five years. Abstracts should be avoided as references, and those older than two years should not be included in citations. The references of articles accepted for publication should be designated as "*in press*" with the enclosed proof of approval for publication.

The references are cited according to the Vancouver style (*Uniform Requirements for Manuscripts Submitted to Biomedical Journals*), rules and formats established by the International Committee of Medical Journal Editors (<http://www.icmje.org>), used by the U.S. National Library of Medicine and scientific publications data bases. Examples of citing publications (journal

articles, books and other monographs, electronic, unpublished and other published material) could be found on the web site http://www.nlm.nih.gov/bsd/uniform_requirements.html. In citation of references the defined standards should be strictly followed because it is the essential factor of indexing for classification of scientific journals. Proper citation of references would render *Serbian Archives of Medicine* a journal of higher quality and rating in the list of world scientific journals.

Cover letter. The cover letter should be enclosed with the manuscript, which is signed by all authors and includes the following: statement that the paper has never been published and concurrently submitted for publication to any other journal; and statement that the manuscript has been read and approved by all authors who have met the criteria of authorship. In addition, the authors shall submit the following copies of all permits for: reproduction of formerly published material, use of illustrations and publication of information on known people or disclosure of the names of people having contributed to the work.

Membership fee and subscription rates. Foreign authors are under no obligation to be members of the Serbian Medical Society or to be subscribed to the *Serbian Archives of Medicine* in order to have their article published in the journal. However, if it is their wish to do so, all the relevant information may be obtained at the email address of the Editorial Board: srparhiv@bvcom.net.

Submission of papers. Papers and all enclosures may be sent by registered mail (in three printed copies and on CD, with the version identical to that on paper), by email (srparhiv@bvcom.net) or electronically via the Serbian Archives site (www.srp-arh.rs).

Note. The papers not complying with these instructions shall not be reviewed and shall be returned to the authors for revision. Observing the instructions for preparation of papers in *Serbian Archives of Medicine* will shorten the time of the entire process of publication and will have a positive effect on the quality and timely release of the journal.

For further information, please contact us at the following address:

Address:

Srpsko lekarsko društvo
Uredništvo časopisa "Srpski arhiv za celokupno lekarstvo"
ul. Džordža Vašingtona 19
11000 Beograd
Serbia

E-mail: srparhiv@bvcom.net

Web site: www.srp-arh.rs

ОПШТА УПУТСТВА

- ☐ *Word*
- ☐ *latinica*
- ☐ *Times New Roman*
- ☐ 12 pt
- ☐ све маргине 2,5 cm
- ☐ страница A4
- ☐ лево поравнање
- ☐ увлачење пасуса 10 mm
- ☐ литература у тексту у заградама [...]

ПРВА СТРАНИЦА

- ☐ Наслов рада без скраћеница
- ☐ Пуна имена и презимена аутора
- ☐ Званичан назив установа, место, држава
- ☐ Контакт-адреса, телефон, e-mail

ПОСЕБНА СТРАНИЦА

Кратак садржај (100-250 речи)

Оригиналан рад:

- ☐ Увод
- ☐ Циљ рада
- ☐ Методе рада
- ☐ Резултати
- ☐ Закључак
- ☐ Кључне речи (3-6)

Приказ болесника:

- ☐ Увод
- ☐ Приказ болесника
- ☐ Закључак
- ☐ Кључне речи (3-6)

Остали типови радова:

- ☐ нема сегмената

ТЕКСТ РАДА

Оригиналан рад (до 5.000 речи):

- ☐ Увод
- ☐ Циљ рада
- ☐ Методе рада
- ☐ Резултати
- ☐ Дискусија
- ☐ Закључак
- ☐ (Захвалница)
- ☐ Литература (Ванкуверски стил)

Приказ болесника (до 3.000 речи):

- ☐ Увод
- ☐ Приказ болесника
- ☐ Дискусија
- ☐ (Захвалница)
- ☐ Литература (Ванкуверски стил)

Преглед литературе, саопштење,

рад из историје медицине,

рад за „Језик медицине” (до 5.000 речи):

- ☐ Увод
- ☐ Одговарајући поднаслови
- ☐ Закључак
- ☐ (Захвалница)
- ☐ Литература (Ванкуверски стил, пет аутоцитата првог аутора, један аутоцитат коаутора)

ПОСЕБНА СТРАНИЦА

- ☐ Наслов рада на енглеском
- ☐ Пуна имена и презимена аутора
- ☐ Званичан назив установа на енглеском, место, држава

ПОСЕБНА СТРАНИЦА**Summary (100-250 words)**

Original article:

- ☐ Introduction
- ☐ Objective
- ☐ Methods
- ☐ Results
- ☐ Conclusion
- ☐ Keywords (3-6)

Case report:

- ☐ Introduction
- ☐ Case outline
- ☐ Conclusion
- ☐ Keywords (3-6)

Articles for other columns:

- ☐ нема сегмената

ПРИЛОЗИ

Табеле (Word):

- ☐ Табела 1. (српски)
- ☐ Table 1. (English)

Графикони (Excel, линк у Word):

- ☐ Графикон 1. (српски)
- ☐ Graph 1. (English)

Слике (оригинал, скенирано)

- ☐ Слика 1. (српски)
- ☐ Figure 1. (English)

Схеме (CorelDraw или Adobe Illustrator)

- ☐ Схема 1. (српски)
- ☐ Scheme 1. (English)

ОСТАЛО

- ☐ скраћенице на латиници подвући
- ☐ децимални бројеви у српском тексту са зарезом, у енглеском и прилозима са тачком
- ☐ јединице SI

СЛАЊЕ РАДА

- ☐ поштом или лично доласком три идентична примерка одштампана и снимљена на CD; email; преко сајта „Српског архива”
- ☐ изјаве с потписима свих аутора
- ☐ опис доприноса у раду свих аутора
- ☐ пропратно писмо
- ☐ потврде о плаћеној чланарини за СЛД за све ауторе и претплати на часопис првог аутора за текућу годину

GENERAL INSTRUCTIONS

- ☐ Word format
- ☐ Roman alphabet
- ☐ Times New Roman
- ☐ 12 pt
- ☐ All margins set to 2.5 cm
- ☐ A4 paper size
- ☐ Left adjustment
- ☐ Initial lines of paragraph indented 10 mm
- ☐ References in text placed in parenthesis

TITLE PAGE

- ☐ Title of paper excluding abbreviations
- ☐ Full names and surnames of author(s)
- ☐ Name of the institution(s), address
- ☐ Corresponding address, phone number, e-mail

SEPARATE SHEET**Summary (100-250 words)**

Original article:

- ☐ Introduction
- ☐ Objective
- ☐ Methods
- ☐ Results
- ☐ Conclusion
- ☐ Keywords (3-6)

Case report:

- ☐ Introduction
- ☐ Case outline
- ☐ Conclusion
- ☐ Keywords (3-6)

Articles for other columns:

- ☐ No sections

TEXT OF MANUSCRIPT

Original article (maximum 5,000 words):

- ☐ Introduction
- ☐ Objective
- ☐ Methods
- ☐ Results
- ☐ Discussion
- ☐ Conclusion
- ☐ (Acknowledgment)
- ☐ References (Vancouver style)

Case report (maximum 3,000 words):

- ☐ Introduction
- ☐ Case report
- ☐ Discussion
- ☐ (Acknowledgment)
- ☐ References (Vancouver style)

Review articles, Communications, History of Medicine, Language of Medicine (maximum 5,000 words):

- ☐ Introduction
- ☐ Main body of the text
- ☐ Conclusion
- ☐ (Acknowledgment)
- ☐ References (Vancouver style, five auto-citations of the first author, one auto-citation of co-authors)

ENCLOSURES

- ☐ Tables (Word)
- ☐ Graphs (Excel, link to Word)
- ☐ Figures (original, scanned)
- ☐ Schemes (CorelDraw or Adobe Illustrator)

OTHER

- ☐ SI units

SUBMISSION OF PAPERS

- ☐ registered mail (three identical printed copies and CD); email; via Serbian Archives site
- ☐ Statement signed by all authors
- ☐ Description of authors' contribution to work
- ☐ Cover letter

Корисни линкови

www.srp-arh.rs
www.sld.org.rs
www.doiserbia.nb.rs
scindeks.ceon.rs
www.nlm.nih.gov
www.nlm.nih.gov/bsd/uniform_requirements.html
www.icmje.org
www.wame.org
publicationethics.org
thomsonreuters.com
www.whonamedit.com
www.mpn.gov.rs
www.zdravlje.gov.rs
www.nb.rs
mfub.edu.rs
www.medical.uns.ac.rs
www.medf.kg.ac.rs
www.medfak.ni.ac.rs
www.med.pr.ac.rs
www.stomf.bg.ac.rs
www.stomatoloskifakultet.rs
locatorplus.gov
www.wma.net

CIP - Каталогизација у публикацији
Народна библиотека Србије, Београд

61(497.1)861

СРПСКИ архив за целокупно лекарство =
Serbian Archives of Medicine / главни и
одговорни уредник Павле Миленковић. - Год. 1,
бр. 1 (1874)- . - Београд (Цорџа
Вашингтона 19) : Српско лекарско друштво,
1872- (Београд : Службени гласник). - 29 cm

Доступно и на :

<http://www.srp-arh.rs>. - Двомесечно
ISSN 0370-8179 = Српски архив за целокупно лекарство
COBISS.SR-ID 3378434

