Baština Akademije nauka i umjetnosti Bosne i Hercegovine

RADOVI XCI, knj. 30.

Rezaković, Džemal

2002

Akademija nauka i umjetnosti Bosne i Hercegovine

https://bastina.anubih.ba/items/bd15ed37-b36d-4fde-9b5a-2482564851dc

Preuzeto s Baštine Akademije nauka i umjetnosti Bosne i Hercegovine

https://bastina.anubih.ba/

ISSN 1512-8245

ANU BiH
АНУ БиХ

AKADEMIJA NAUKA I UMJETNOSTI BOSNE I HERCEGOVINE

RADOVI

KNJIGA XCI

Odjeljenje medicinskih nauka
Knjiga 30
Centar za medicinska istraživanja
Knjiga 1

SARAJEVO 2002

ISSN 1512-8245



AKADEMIJA NAUKA I UMJETNOSTI BOSNE I HERCEGOVINE

RADOVI

KNJIGA XCI

Odjeljenje medicinskih nauka

Knjiga 30

Centar za medicinska istraživanja

Knjiga 1

Redakcioni odbor

Jela Grujić-Vasić, Faruk Konjhodžić, Slobodan Loga

Urednik

Džemal Rezaković
redovni član Akademije nauka i umjetnosti
Bosne i Hercegovine

SARAJEVO 2002

ACADEMY OF SCIENCES AND ARTS OF BOSNIA AND HERZEGOVINA

WORKS

VOL. XCI

Department of Medical Sciences
Vol. 30
Centre of Medical Research
Vol. 1

Editorial Board

Jela Grujić-Vasić, Faruk Konjhodžić, Slobodan Loga

Editor

Džemal Rezaković
Member of the Academy of Sciences and Arts
of Bosnia and Herzegovina

SARAJEVO 2002

U sadašnjim životnim radnim uslovima bremenitim brojnim teškoćama, naročito materijalne prirode, kada se za realizaciju naučnoistraživačkih radova i objavljivanje naučnih publikacija apsurdno traže tržišni rezoni, izdavanje knjige Radova ANUBiH je hvale vrijedan poduhvat. Odjeljenje medicinskih nauka, odnosno Centar za medicinska istraživanja Akademije nauka i umjetnosti Bosne i Hercegovine uložili su veliki napor da obezbjede nadoknadu troškova izdavanja tridesete knjige Radova ANUBiH, a prethodno su ohrabrili svoje članove, saradnike i istaknute istraživače u oblasti medicinskih nauka da se oglase u naučnoj javnosti Bosne i Hercegovine i šire svojim radovima. Na taj način želi se pokazati svijetu da medicinska nauka ovdje i sada, i pored složenih uslova u kojoj se našla, ima svoj kontinuitet i nije zapala u letargiju. Naprotiv, Odjeljenje medicinskih nauka u svim svojim programima permanentno potiče, podržava i aktivno učestvuje u realizaciji ispitivanja pojedinih aspekata savremenih nepoznanica medicinske nauke u svijetu. Tako je nedavno, u organizaciji ANUBiH, održan Simpozijum o prionima (PrP-PrPgena), teme koja je danas aktuelna svugdje, i radovi sa tog naučnog skupa su publikovani u ovoj knjizi. Pored toga, u knjizi se nalazi i jedanaest radova članova i saradnika ANUBiH, kao i dvanaest idejnih naučnoistraživačkih projekata brižljivo verifikovanih u Centru za medicinska istraživanja ANUBiH. Njihovim objavljivanjem željela se postići svojevrsna javna promocija tih istraživanja, koja su historijski posmatrano svjedoci interesa i mogućnosti istraživača ovog prostora i vremena.

Sarajevo, januar 2002. *Redakcioni odbor*

Ova knjiga je publikovana zahvaljujući pomoći donatora.

Posebno smo zahvalni:
MINISTARSTVU ZDRAVLJA FBiH I
TVORNICI "BOSNALIJEK" SARAJEVO

Takođe dugujemo zahvalnost:
VETERINARSKOM FAKULTETU UNIVERZITETA U SARAJEVU,
"ELI LILLI" SARAJEVO,
"AVENTIS" SARAJEVO I
"APOTEKE" SARAJEVO

ANU BiH АНУ БиХ

Recenzenti:
Akademik SEID HUKOVIĆ
Akademik ALEKSANDAR NIKULIN
Akademik LADISLAV OŽEGOVIĆ
Akademik DŽEMAL REZAKOVIĆ
Dopisni član SLOBODAN LOGA

Na osnovu mišljenja Federalnog ministarstva obrazovanja, nauke, kulture i sporta broj 04-15-1579/02 od 18. 03. 2002. godine ova knjiga je oslobođena plaćanja poreza na promet proizvoda i usluga.

SADRŽAJ

Radovi
Članova Odjeljenja medicinskih nauka i Centra za medicinska istraživanja Odjeljenja medicinskih nauka ANUBiH

Jela Grujić-Vasić, Sulejman Redžić, Darko Jakšić i Azijada Ibrulj
Farmakognoško ispitivanje vrsta *Ruta graveolens* L. I *Ruta divaricata* Ten. (Rutaceae) 9
Ladislav Ožegović, Mirela Ćemalović-Babić, Nermina Ovčina-Kurtović
Epidemiologija dermatofita u Bosni i Hercegovini u periodu 1.XI 1997 - 1.V 2000. .. 17
Faruk Konjhodžić, Sabahudin Ekinović, Tatjana Jeremić
Učestalost tumora mozga prije i poslije agresije na Bosnu i Hercegovinu 25
Slobodan Loga
Suicide during the war in Sarajevo 31
Faruk Dalagija, Šerif Bešlić
MRI i CT timusa kod miastenije gravis 37
Sabira Hadžović, Irfan Zulić, Abdulah Nakaš, Begler Begović
Retrospektivno-prospektivna analiza primjene antimikrobika na hirurškom odjelu kroz analizu cijene i djelotvornosti (CEA)45 antimikrobika 45
Husref Tahirović, Alma Toromanović
Neonatalni TSH skrining na kongenitalni hipotireoidizam kao indikator jodnog deficita i njegove kontrole 55
Amira Pekuša-Redžić
Mjesto i značaj amniocenteze u skriningu visoko rizičnih trudnoća sa prethodno ponavljanim ranim spontanim pobačajima 65
Đemo Subašić, Irma Salimović, Rijad Konjhodžić, Amira Pekuša-Redžić i Mensura Šeremet
Incidence of HIV, HBV and HCV infections detected by PCR method in BiH 73
Fatima Numanović, Mirsada Hukić, Mahmud Nurkić, Zineta Delibegović
Kvasnice iz roda Candida u miješanim vaginalnim infekcijama žena reproduktivne dobi 87
Svjetlana Radović, Ivan Selak, Mirsad Babić, Aleksandar Nikulin i Ismet Bratović
Endokrine stanice u upalno-regenerativnim i displastičnim epitelnim lezijama sluznice kolona 95

Referati izlagani na simpozijumu: *Prioni kao uzročnici sponginozne encefalopatije (kravljeg ludila) ljudi i životinja: stanje i perspektive u Bosni i Hercegovini*

Ljubomir Berberović
Molekularna biologija u medicinskim temama 109
Đemo Subašić
Istraživanje humanih prion bolesti i mogućnosti rane dijagnostike nove varijante Creutzfeldt-Jakobove bolesti (nv CJB) 111

Slobodan Loga
Neuropsihijatrijski poremećaji izazvani prion-proteinima 117
Jovan Dimitrijević
Humani oblici spongiformnih encefalopatija 123
Hajrudin Beširović, Senad Prašović, Edin Šatrović
Transmisibilne spongiformne encefalopatije (TSE) životinja uzrokovane prionima ... 137
Tarik Bajrović, Behija Dukić
Imunotolerancija kod prionskih bolesti 143
Faruk Čaklovica, Davor Alagić, Muhamed Smajlović, Ante Milanović, Nihad Fejzić, Jasmin Ferizbegović
Kako izbjeći rizik od prionske bolesti 145

Idejni projekti *izlagani na plenumu Centra za medicinska istraživanja ANUBiH koji su nakon opsežne diskusije dobili saglasnost za izradu izvedbenih projekata*

Jela Grujić-Vasić, Sulejman Redžić
Fitofarmaka za 21. stoljeće -teorijski i praktični aspekti 157
Aleksandar Nikulin, Svjetlana Radović, Ivan Selak
Imunohistohemijska studija epitelne displazije u ravnoj upalno promijenjenoj sluznici debelog crijeva 161
Ladislav Ožegović, Mirela Babić i Đemo Subašić
Fenotipska i genotipska istraživanja epidemiologije, faktora rizika i terapije bolničkih pacijenata kod sistemne kandidijaze i aspergiloze 167
Sabira Hadžović
Retrospektivno-prospektivna pilot studija praćenja rezistentnih sojeva mikroorganizama kao uzročnika intrahospitalnih infekcija u bolničkim odjeljenjima 171
Mirsada Hukić
Hantavirus u Bosni i Hercegovini – mikrobiološki, epidemiološki i klinički aspekti .. 175
Ivan Selak, Mirsad Dorić
Djelovanje zearalenona na timus štakora: svjetlosno-mikroskopske i imunohistohemijske promjene 183
Ivan Selak, Svjetlana Radović
Korelacija između nivoa prognostičkih markera B stadija (po Dukesovoj klasifikaciji) karcinoma kolona i pojave mikrometastaza u perikoličnim limfnim čvorovima 187
Arif Smajkić
Istraživanje i edukacija o upravljanju (Menangment) zdravstvenim sistemom u katastrofama 191
Amira Pekuša-Redžić
Istraživanje genetičkog rizika u porodicama studenata Univerziteta u Sarajevu 195
Đemo Subašić, Faruk Konjhodžić, Džemal Rezaković, Kemal Šerić, Irma Salimović, Rijad Konjhodžić i Faris Gavrankapetanović
Istraživanje humanog prion proteina (PrP) i PrP gena 199
Đemo Subašić, Faruk Konjhodžić, Džemal Rezaković, Kemal Šerić, Faris Gavrankapetanović, Rijad Konjhodžić, Irma Salimović, Mensura Šeremet
Istraživanje akutnog gastroenteritisa, encefalitisa i meningitisa virusne etiologije ... 207
Nurija Bilalović, Ivan Selak
Značaj imunohistohemije i kliničkih podataka u dijagnostici malignih limfoma klasificiranih po R.E.A.L. 211

R A D O V I

Članova Odjeljenja medicinskih nauka
i
Centra za medicinska istraživanja OMN ANUBiH

ANU BiH
АНУ БиХ

ANU
BiH
АНУ
БиХ

FARMAKOGNOŠKO ISPITIVANJE VRSTA[0)]
Ruta graveolens L. I *Ruta divaricata* Ten. *(Rutaceae)*

Jela Grujić-Vasić[1)], Sulejman Redžić[2)],
Darko Jakšić[3)] i Azijada Ibrulj[3)]

Sažetak. Vrsta *Ruta graveolens* je biljka koja raste u Južnoj Evropi, dobro je proučena; sadrži etersko ulje, rutin, kvercetin, šećere, alkaloide. Visok nivo fitohemijske istraženosti uvjetovao je i široki spektar primjene ove vrste u savremenoj fitoterapiji. Nasuprot tome, vrsta *Ruta divaricata* je vrlo slabo proučena.

U ovom radu ispitane su navedene vrste ruta na sadržaj tanina kao i na prisustvo i osobine sluzi. Također su vršena i mikroskopska istraživanja građe vegetativnih organa. Sadržaj tanina određen je spektrofotometrijskom metodom i kod vrste *R. graveolens* ima vrijednost 1,33 %, a kod vrste *R. divaricata* 1,28 %. Prisustvo tanina ispitano je hromatografijom na tankom sloju. Pri ispitivanju sluzi određen je broj i faktor bubrenja.

Upotrebljena metoda hromatografije na tankom sloju uz uslove koje smo koristili može uspješno poslužiti za identifikaciju ispitivanog biljnog materijala. Vrijednosti za broj i faktor bubrenja za obadvije ispitivane vrste imaju vrlo slične vrijednosti. Komparativnom analizom mikroskopske građe vegetativnih organa kod vrsta *R. graveolens* i *R. divaricata* nisu uočene signifikantne razlike na ovom nivou istraživanja.

Ključne riječi: *Ruta graveolens L*, Ruta divaricata Ten., tanini, sluzi, hromatografija na tankom sloju (TLC), mikroskopija.

Uvod

U modernoj farmaciji biljne sirovine imaju sve veći značaj. Imajući tu činjenicu u vidu, u ovom radu vršena su farmakognoška istraživanja biljnih vrsta *Ruta graveolens L.* i *Ruta divericata Ten.*.

Rod *Ruta* L. *(Rutaceae)* predstavljen je sa preko 50 vrsta, uglavnom rasprostranjenih u sjevernoj hemisferi (1). U flori BiH zastupljena je sa dvije vrste: *R. graveolens* L. i *R. divaricata* Ten. (2). Prema Flora Europea (3),

[0)] Ovaj rad je dijelom finansiran iz sredstava projekta "Fitofarmaka za 21. stoljeće - teorijski i praktični aspekt", ugovor broj 04-39-6171/51/01.

[1)] Centar za medicinska istraživanja Akademije nauka i umjetnosti Bosne i Hercegovine

[2)] Prirodno matematički fakultet Univerziteta u Sarajevu

[3)] Zavod za kontrolu lijekova Federacije Bosne i Hercegovine

vrsta *R. divaricata* je podvedena pod nešto šire rasprostranjenu vrstu *R. graveolens*. Ime Ruta potiče od grčke riječi *rhyesfhai* = spriječiti, jer se biljka od davnina smatra ljekovitom.

Obje vrste su rasprostranjene na Balkanskom poluotoku i Krimu i još ponegdje u Mediteranskom području. Često su kultivisane u vrtovima južne i centralne Evrope.

Ruta graveolens je višegodišnja zeljasta biljka sa drvenastim korjenom, visine 20-50 cm (90cm). Listovi su režnjevito neparno perasto dijeljeni, tamnozelene boje, uglavnom goli, sa jasnim centralnim nervom samo sa ventralne strane. Kod nekih oblika listovi su više-manje mesnati, plavozelene boje, presvučeni tankim slojem kutikule. Cvjetovi su skupljeni u korimb-cvasti. Biljka ima optimum u submediteranskim kamenjarama reda *Scorzonero-Chrysopogonetalia*, te na degradiranim staništima termofilnih niskih šuma i šikara reda *Ostyo-Carpinetalia orientalis*.

Dobro je istražena kao ljekovita biljka koja se pominje u mnogim farmakopejama (4,5,6) i od davnina je smatraju ljekovitom. Dobro je poznata i u Bosni i Hercegovini. Nasuprot tome, *Ruta divaricala* je endemična vrsta i malo proučavana. To je višegodišnja zeljasta biljka sa odrvenjelim stablom, do 60cm. Po svojoj morfologiji dosta sliči na prethodnu vrstu.

U ovome je radu ispitivan nadzemni dio navedenih biljaka. Vršena su i mikroskopska ispitivanja preparata obje vrste. U cilju boljih upoznavanja razlika izmedu ove dvije vrste, a u nastavku ranijih istraživanja vršeno je ispitivanje vrste i sadrzaj tanina kao i prisustvo sluzi i njihovih osobina. Kod obje biljke ispitivana je i njihova antimikrobna efikasnost.

U radu su korištene metode koje se primjenjuju u savremenoj farmaceutskoj nauci. Osnovni cilj rada je da se izvrši komparativna analiza dominantnih aktivnih principa i mikroskopije ove dvije vrste uz upotrebu odgovarajućih instrumentalnih tehnika i da se da prilog boljem poznavanju ovih biljnih materijala.

Materijali i metode

Karakteristike biljnog materijala

Materijal za mikroskopsku analizu vegetativnih organa vrsta roda *Ruta* skupljen je u submediteranskom pojasu, nizvodno od D. Jablanice, na nadmorskoj visini oko 300 m, zapadnoj ekspoziciji, nagibu terena do 25 stepeni, krečnjačkoj geološkoj podlozi i plitki i rendzinama, u zajednici kamenjara (za *R. divaricata*) a za vrstu *R. graveolens* u privatnom vrtu u Sarajevu u kojem se ova kultura gaji u posljednjih 30 godina. Od svake vrste uzeti su uzorci od 5-10 individua, fiksirani u standardnim fiksativima. Preparati su posmatrani na svjetlosnom mikroskopu, marke Reichardt.

Materijal za fitohemijska istraživanja od vrste *R. divaricata* sakupljen je na padinama planine Biokovo, na nadmorskoj visini od oko 250 m, južnoj ekspoziciji terena, krečnjačkoj geološkoj podlozi i plitkim zemljištima tipa rendzine. Materijal vrste *R. graveolens* potiče sa istog lokaliteta kao i za mikroskopska istraživanja. Za fitohemijska ispitivanja korišten je nadzemni dio biljke, osušen u tankom sloju na sobnoj temperaturi i pulveriziran neposredno prije ispitivanja.

Fitohemijska ispitivanja

Ispitivanje sadržaja tanina. Istraživanja sadržaja tanina izvršena su prema Ph. Jug. III. Mjerenja su bila više puta ponavljana a dobiveni rezultati su bili dobro reproducirajući. Sadržaj tanina za obje ispitivane vrste imao je bliske vrijednosti (tab. 1). Identifikacija tanina vršena je metodom hromatografije na tankom sloju po Stahl-u. Uslovi za razvijanje hromatograma: hromatografske ploče (stacionarna faza) F-254 Merck, a za pojačanje fluorescence kao reagens za prskanje hromatograma služio je 10%-tni rastvor AlCb u 90 % etanolu. Kao mobilna faza korištena je smjesa etil acetat - aceton-N-butanol-amonijak (10%), u omjeru 37,5 : 30 : 22,5 : 7,5. Čistoća korištenih rastvarača u navedenoj smjesi bila je p.a. Merck. Detekcija: UV 254 nm ("Desagua"). Kao standardni rastvor služila je Ac. tanicum ("Kemika") 10 mg/1. Mrlje tanina imale su Rf vrijednost 0,90.

Ispitivanje sluzi. Identifikacija sluzi vršena je histohemijskim reakcijama (Ph. Jug III), a određen je i broj bubrenja (Ph Jug III) i faktor bubrenja (7). Rezultati su dati u tabeli 1.

Ispitivanje antimikrobne djelatnosti. U radu je ispitivana i antimikrobna eflkasnost navedenih uzoraka metodom difuzije na agaru. Ispitivano je njihovo antimikrobno djelovanje na gram-pozitivne i gram-negativne bakterije (*Streptococcus* i *Meningococcus*). Rezultati ovih ispitivanja ukazuju na antimikrobnu eflkasnost ovih biljnih materijala.

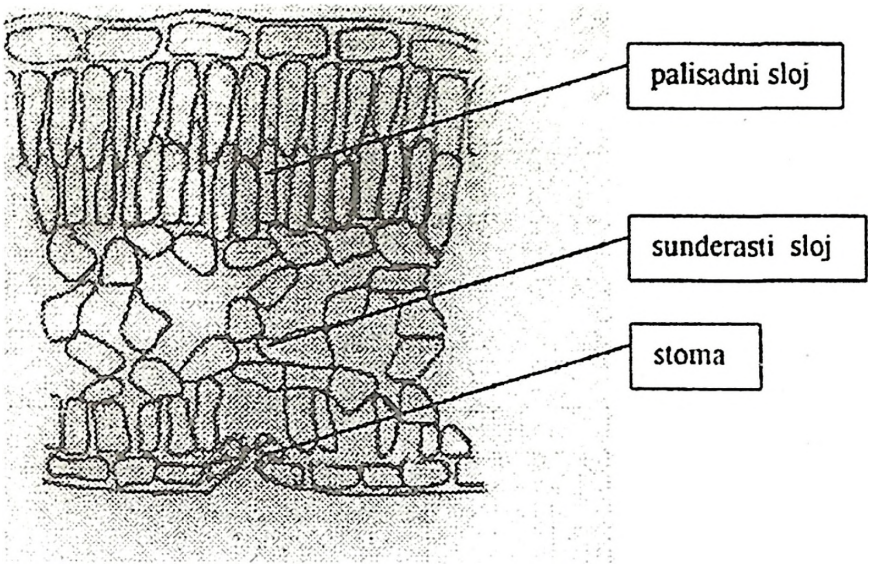
Rezultati i diskusija

Mikroskopija istraživanih vrsta

Kod vrste *R. graveolens* stablo je sa primarnom građom, u donjim dijelovima prelazi u sekundarnu građu. Na poprečnom presjeku stabla jasno se vidi formiran kambijalni prsten koji prema vani produkuje elemente sekundarnog floema sa pravilnim parenhimskim stanicama, iznad kojih je sloj primarne kore. Veoma je jasan sloj skrobne sare.

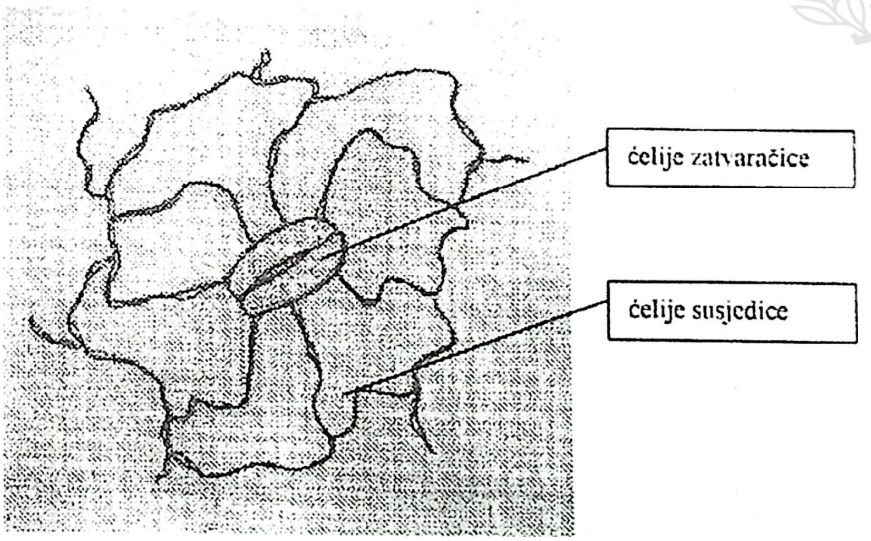
Na samoj periferiji kod mladih izdanaka se nalazi epiderma, koja često alternira sa peridermom na starijim dijelovima stabla.

Prema unutra kambijalni prsten produkuje elemente sekundarnog ksilema, a u središtu se nalazi centralna šupljina.



Slika 1. Poprečni presjek lista vrste Ruta graveolens

ANU BiH АНУ БиХ



Slika 2. Plošni presjek lista vrste *Ruta graveolens*

Na poprečnom presjeku lista mezofil se jasno diferencira na palisadni dvoredni sloj i sunđerasti dio prema naličju lista (Sl. 1). Stome su uglavnom postavljene na naličju, po obliku ćelija zatvaračica i susjedica pripada Helleborus tipu (Sl. 2)

Kod vrste *R. divaricata* stablo je u pravilu sa primarnom građom, koje kod starijih stabljika poprima sekundarnu građu. Na poprečnom presjeku jasno se diferencira ambijum koji prema vani producira sekundarnu koru, koja se dalje nadovezuje na primarnu koru. Prema centralnom dijelu kambij produkuje sekundarni ksilem, a u centru je centralna supljina. Listovi su neparno perasto razdjeljeni, liske duguljasto linearne, žuckastozeleni, često sa slabim mirisom. Međutim, postoje i oblici sa intenzivnim prilično opijajućim mirisom. Na poprečnom presjeku mezofil se diferencira na palisadno i sunđerasto tkivo. Palisadne ćelije su zbijene, poredane u dva niza, a ćelije transpiracijskog tkiva su izodijametričnog oblika. Stome su uglavnom na ventralnoj strani, koje odgovaraju Helleborus tipu građe.

Komparativnom analizom mikroskopske građe vegetativnih organa kod *R. graveolens* i *R. divaricata* nisu uočene signifikantne razlike na ovom nivou spoznaje. Postoje razlike u debljini kutikule, broju stoma, te organizaciji mezofila lista. U pravilu kod termofilnije vrste '*R. divaricata*, listovi su sa izraženijom kutikulom, naglašenijom vanjskom stijenkom epidermskih stanica, te nešto zbijenijim palisadnim ćelijama.

Fitohemijska istraživanja

Dobiveni rezultati fitohemijskih istraživanja ukazuju da Ruta graveolens i Ruta divaricata sadrže tanine a njihov sadržaj ne pokazuje znatne razlike kod ispitivanih uzoraka (tab.l). Prisustvo tanina u nadzemnim dijelovima ovih biljnih materijala moglo se odrediti metodom hromatografije na tankom sloju po Stahl-u, koristeći uslove koji su dati u eksperimentalnom dijelu. Navedeni biljni materijali sadrže sluzi koje imaju približno istu vrijednost za broj bubrenja i faktor bubrenja.

Tabela 1. *Vrijednosti za sadržaj tanina, broj i faktor bubrenja*

Uzorci	Broj bubrenja	Faktor bubrenja	Sadržaj tanina (%)
Ruta graveolens	4,75	2,375	1,33
Ruta divaricata	4,60	2,30	1,28

Preliminarna ispitivanja efikasnosti djelovanja na gram pozitivne i gram negativne bakterije (*Streptococcus i Meningococcus*) pokazuju da ovi biljni materijali imaju izražena antimikrobna djelovanja na navedene bakterije.

Ispitivanja vršena u ovom radu potvrđuju izraženu sličnost, u više aspekata, *R. graveolens* i endemične vrste *R. divaricata.*

Zaključci

Komparativnom analizom mikroskopske građe vegetativnih organa *Ruta graveoleus L.* i *Ruta divaricata Ten* na ovom nivou spoznaje nisu uočene signifikantne razlike.

U radu provedena fitohemijska istraživanja evidentno pokazuju da ispitivani uzorci *Ruta graveoleus L.* i *Ruta divaricata Ten* imaju vrlo bliske vrijednosti za sadržaj tanina, broj i faktor bubrenja.

Hromatogrami na tankom sloju, dobiveni u uslovima predstavljeni u ovom radu, mogli su korisno poslužiti za određivanje prisustva tanina u ispitivanim *Ruta* vrstama.

Preliminarna ispitivanja efikasnosti djelovanja na gram pozitivne i gram negativne bakterije (Streptococcus i Meningococcus) pokazuju da ispitivani biljni materijali imaju izražena antimikrobna djelovanja na navedene bakterije.

Summary

This paper present results of investigation of kind and quantity of tannins and charachteristics of mucilage in *Ruta graveolens* and *Ruta divericata*. First grows naturaly in South Europe It has been well investigated and is often mentioned in pharmaceutical literature. Includes etherical oils, rutin, quercetin and sugars. *Ruta divericata Ten.* isn't so well investigated. It grows in Mediterranean region. It is characterized with very distinctive smell. Also, micro-morphological features of vegetative organs were observed. Dried plant material, pulverized before, was used in this investigation.

Presence of tannins was detected by thin layer-chromatography (TLC). Quantity of tannins was measured with spectrophotometric method. Content of tannins was 1,33 % for *Ruta graveolens* and 1,28 % for *Ruta divaricata*. Also, determination of swelling number and swelling factor was done. Comparative analyse of microscopic features of vegetative organs of *Ruta graveolens L* and *Ruta divericata Ten.* shows no-significant differences on this level.

Key words: *Ruta graveolens L.*, *Ruta divericata Ten.*, tanins, mucilage, thin-layer chromatography (TLC), microscopy.

Literatura

1. **Diklić N.:** *Familija Rutaceae. In Flora SR Srbije,* Josifovic M. Beograd.1973: Vol. V, 62-66.
2. **Domac R.:** *Ruta L. In Mala flora Hrvatske i susjednih područja,* Školska Knjiga Zagreb. 1973:174.

3. **Townsend C.C.:** *Ruta. In Flora Europaea,* Tutin T.G. et al. University Press, Cambridge 1968: Vol. II, 227-228.
4. *British herbal Pharmacopeeia,* 1983:183-184.
5. **Penso G.:** *Index Plantarum Medicinalium Totius Mundi Eorumque Synonymorum,* O.E.M.F. Milano. 838.
6. *Savez farmaceutskih društava Jugoslavije,* Priručnik o lekovitim biljkama za farmaceute i lekare. Beograd. 1989: 161-162.
7. **Jakšić D., Grujić-Vasić J., Ibrulj A., Redžić S.:** *Comparative Research of Tannins and Mucilage of Ruta graveolens and Ruta divaricata,* Abstracts- International Congress and 48th Meefing of the Society for Medicinal Plant Research. Zurich. 2000: P4A/11.

ANU BiH АНУ БиХ

ANU
BiH
АНУ
БиХ

Epidemiologija dermatofita u Bosni i Hercegovini u periodu 1.XI 1997 - 1.V 2000.

Ladislav Ožegović,[1)] Mirela Ćemalović-Babić,[1)] Nermina Ovčina-Kurtović[1)]

Uvod

Bosna i Hercegovina je predstavljala zapadnu granicu velikog područja endemskih dermatofitija, koje se pružalo od granica Bugarske, preko Makedonije, Srbije, Kosova i Bosne i Hercegovine do Hrvatske (1, 2). Dominantni endemski dermatofiti u BiH bili su: T.violaceum, T.schoenleini i T.tonsurans, sa rijetko importiranim M.ferrugineum i M. audouini (3, 4).

U Bosni i Hercegovini je od 1956. g. do zaključno 1976. g. vršena sistematska akcija suzbijanja endemskih dermatofitija, najprije rendgenskim zračenjem i lokalnom terapijom, a od 1970. g. grizeofulvinom. Epidemiologija, klinička slika, rezultati liječenja prikazani su nizom publikacija objedinjenih u izdanju ANUBIH (5).

Sistematska istraživanja dermatofita u Bosni i Hercegovini prekinuta su prestankom rada Instituta za dermatovenerologiju "Dr. S. Milošević", a ratna zbivanja, odliv kadrova i uništavanje opreme dovelo je do potpunog prekida rada iz Medicinske mikologije. Uvažavajući značenje medicinske mikologije, na poticaj OMN ANUBiH, Univerzitetski klinički centar je u okviru Instituta za mikrobiologiju, parazitologiju i imunologiju osnovao 1997. Mikološki laboratorij[2)]. Ovdje se iznose rezultati izolacije i determinacije dermatofita do 1.I 2001. godine sa svrhom da se stručna javnost upozna sa stanjem i epidemiologijom dermatofita u tom periodu.

[1)] Mikološki laboratorij Instituta za mikrobiologiju, parazitologiju i imunologiju KCU Sarajevo

[2)] Ovim se srdačno zahvaljujemo svima koji su nam pomogli kod formiranja laboratorija, posebno i pomoći L. Ajello (Atlanta, USA), prof. Drouhet (Institute Pasteur, Paris), prof. Nolard (Brusselles), Dermatološkim klinikama u Zagrebu i Ljubljani.

Materijal i metode

Ljuske, dlake, strugotine nokata, uglavnom su potjecali od uzoraka pacijenata Dermatovenerološke klinike Kliničkog centra u Sarajevu, Dispanzera za dermatovenerologiju u Sarajevu i pojedinačnih uzoraka od pacijenata upućenih od liječnika opće prakse ili specijalističkih ambulanti iz Zenice, Travnika, Goražda i Sarajeva. Svi uzorci su pregledani nativno, zatim inokulirani na Sabouraud glukoza agar, ostavljeni na sobnoj temperaturi i rezultati očitavani nakon perioda od 15-30 dana (6).

Rezultati i diskusuja

Izolirani dermatofiti su prikazani na Tabeli 1, kako slijedi:

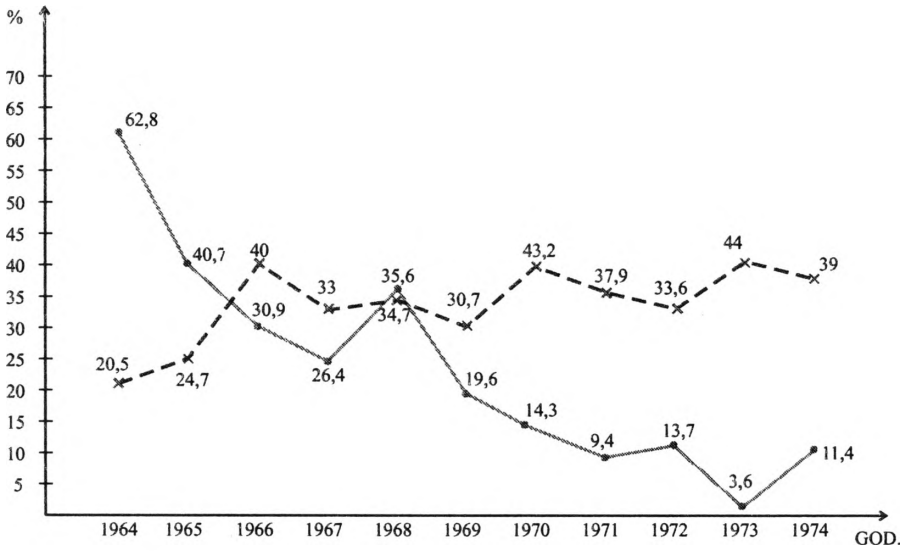
Tabela 1.

Naziv izoliranog dermatofita	Broj izoliranih dermatofita (procenat)
MICROSPORUM CANIS	214 (73,79%)
MICROSPORUM GYPSEUM	3 (1,03%)
MICROSPORUM FERRUGINEUM	1 (0,34%)
TRICHOPHYTON MENTAGROPHYTES	38 (13,10%)
TRICHOPHYTON SCHOENLEINI	4 (1,37%)
TRICHOPHYTON TONSURANS	2 (0,68%)
TRICHOPHYTON VIOLACEUM	3 (1,03%)
EPIDERMOPHYTON FLOCCOSUM	18 (6,20%)
NEDETERMINIRANI DERMATOFITI	3 (1,03%)

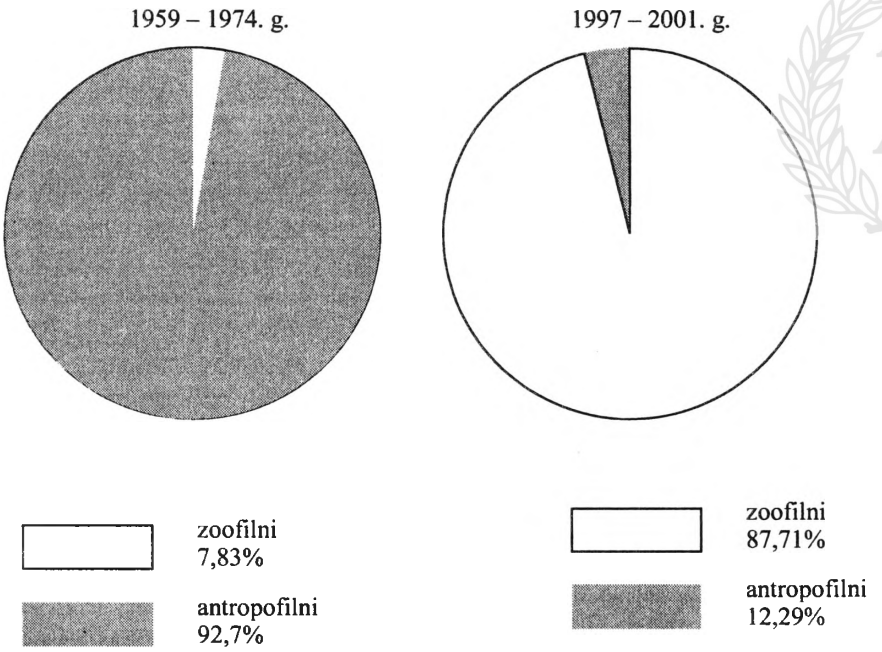
Već je u periodu 1964-1974. god. utvrđeno da se flora dermatofita mijenjala u toku tih deset godina, kada se stalno smanjivao broj izoliranih endemskih dermatofita (T.violaceum, T.schoenleini i T.tonsurans), te od početnih vrijednosti od više od 60% izoliranih dermatofita 1974. god. su endemski dermatofiti predstavljali nešto više od 10% izoliranih dermatofita (Crtež 1), a dermatofiti koji nisu bili uzročnici endemskih dermatofitija porasli su od početnih 20,5% na više od 40% od ukupno izoliranih dermatofita (ukupno 22.516 izolata).

Od zoofilnih dermatofita kod ljudi u tom periodu izolirali smo najčešće T.mentagrophytes (28,66%), zatim T.verrucosum (11,3%). U svim slučajevima kod izolacije ovih zoofilnih dermatofita dokazana je uzročna povezanost između oboljenja ljudi i infekcije goveda i miševa (7).

Takvi odnosi antropofilnih i zoofilnih dermatofita u Bosni i Hercegovini jako su se razlikovali od onih u ostalim republikama, kad su zoofilni dermatofiti u Sloveniji iznosili 75,4%, u Hrvatskoj 60,98%, u Srbiji 4,1%, u Makedoniji 0,2%, a u Bosni i Hercegovini 7,83% (8).



Crtež 1.



Slika 1. *Prikaz odnosa zoofilnih i antropofilnih dermatofita u Bosni i Hercegovini u periodu od 1959-1974. g. i 1997-2001. g.*

ANU BiH АНУ БиХ

Razumljivo, i učešće pojedinih zoofilnih i antropofilnih dermatofita bilo je različito prema pojedinim krajevima, ali je osim odsutnosti endemskih dermatofita u zapadnim republikama bivše zemlje uz T.mentagrophytes i T.verrucosum, M.canis bio značajno zastupljen. Sve do 1990. g. u Bosni i Hercegovini M.canis nije bio izoliran, ni sa ljudi ni od životinja: prvi put je utvrđen u oboljelih pokusnih kunića importiranih iz Italije (9).

Istražujući izvore visokog učešća M.canis u pacijenata od 1997-2001. godine utvrđeno je, da se infekcija krije na subkliničkim inficiranim nosiocima - mačkama, dok je istraživanje 104 psa koji su pretraženi metodom četkanja, bilo u svim slučajevima negativno (10). Zrnati oblik T.mentagrophytesa izoliran od pacijenata vjerovatno se nalazi na miševima, glodarima ili kojoj drugoj životinji (11). U našim prijašnjim istraživanjima frekvencija T.mentagrophytesa kod pacijenata sa tineom corporis i pedis iznosila je od 16,1-30,1%, E.floccosum od 3-10%, T.verrucosum od 1,4-11,3%, T.rubrum 0-3,3% (7). U novim istraživanjima (12), kod pripadnika Vojske federacije BiH, utvrđeni su na nogama T.mentagrophytes i E.floccosum (46,15%) i to samo kod profesionalnih vojnika sa dužim stažom, dok kod regruta nisu utvrđeni dermatofiti.Ti se rezultati dijelom slažu sa našim prijašnjim nalazima T.mentagrophytesa kod rudara (14,8%), sportaša (5%), pacijenata sa perifernim cirkulatornim smetnjama (38,2%), kod kojih je izoliran samo pahuljasti varijetet T.mentagrophytesa (13).

Zanimljivo je da je u proteklom periodu rijetko bio izoliran T.rubrum i T.verrucosum. Čini se, da je frekvencija T.rubruma u opadanju i u drugim zemljama Europe, a odsutnost T.verrucosum mogli bismo tumačiti drastično smanjenim fondom goveda (iako smo od goveda sa jedne farme izolirali T.verrucosum).

Iako su ratna zbivanja u Bosni i Hercegovini dovela do velikih migracija sa većine područja na kojima je bila raširena flora endemskih dermatofita, te je veliki dio ruralnog stanovništva doselio i u Sarajevo, ipak je broj izoliranih endemskih dermatofita malen. Uz sve negativne posljedice rata nije došlo do širenja endemskih dermatofita u Sarajevu, što može ukazivati na uspješno provedenu eradikaciju. Zanimljiva su opažanja o izolatima dermatofita u Europi izoliranih sa tineae capitis (14), za period od 1987-1997. g.: vidi se da je M.canis bio najfrekventniji izolirani dermatofit, ali je porastao u populaciji na selu.Visoko je učešće T.violaceuma u obje populacije, dok je učešće T.mentagrophytesa smanjeno.T.rubrum je bio nisko zastupljen, iako je sporna uloga T.rubruma u tineae capitis.T.tonsurans, T.violaceum i T.soudanese u evropske države unešeni su imigrantima iz Afrike, a vjerovatno i istočnih zemalja Europe, pa i iz Bosne i Hercegovine, posebno T.violaceum (14).Zanimljiva je pojava veće frekvencije M.aoudouini, za kojeg se držalo da je definitivno nestao iz Evrope.T.tonsurans i M.aoudouini su najčešće izolirani kao uzročnici tineae capitis u Engleskoj i Francuskoj, dok je M.canis najviše bio izoliran u zemljama južne Europe, Grčkoj, Italiji i Španjolskoj.Teško

je protumačiti porast, istina nizak, T.verrucosuma u gradskoj populaciji: uprkos razvijenih metoda suzbijanja trihofitije goveda fungicidima i vakcinacijom, ovakvi slučajevi se teško mogu protumačiti u gradskoj populaciji. Česta je pojava trihofitije goveda uzrokovana T.verrucosum kod importiranih goveda u BiH nakon rata, te je na preostalom malom broju farmi predstavljala zdravstveni problem za osoblje kroz dugačak period sve do danas. Mi smo u jednom slučaju izolirali T.verrucosum sa goveda, ali nismo uspjeli izolirati ni od jednog od pacijenata koji su se inficirali sa te farme od bolesnih goveda.

Tabela 2. *Epidemiološka situacija uzročnika T.capitis u Europi (izražena u postocima, prema 14)*

	1987 g.		1997 g.	
	ukupno	u gradovima	ukupno	u gradovima
M .CANIS	55,4	3,9	37,88	13,02
M. AOUDOUINI	8,48	16,8	10,82	15,53
T. TONSURANS	2,72	1,2	23,09	34,79
T. VIOLACEUM	10,00	17,3	9,62	14,30
T.SOUDANENSE	1,0	1,0	10,3	18,2
T. GOURWILLII	0,2	0	0,13	0,25
T. SCHOENLEINI	0,5	0,42	0,07	0,05
T.VERRUCOSUM	0,8	0,1	0,89	0,4
T.MENTAGROPHYTES	9,19	1,8	5,52	1,0
T.RUBRUM	0,6	0,3	0,21	1,0
UKUPNO	1.980	942	3.780	1.989

I u našoj neposrednoj okolini, u Hrvatskoj, Sloveniji i Makedoniji došlo je do značajnih promjena. Tako je u Hrvatskoj zabilježen enorman porast M.canis u 1999. godini u poređenju sa malim brojem u 1978. g. Broj izolata M.canis je u 1999. g. porastao na više od četiri stotine.T.rubrum je bio veoma rijetko izoliran, a T.schoenleini je iščezao (15). U Slavonskom Brodu u periodu od 1999-2000.g. prevalirao je T.mentagrophytes (oba varijeteta), dok je T.rubrum bio zastupljen sa 9,99% od izolata, a T.violaceum samo s jednim izolatom (16). Slične rezultate iznose i u periodu od 1984-2000. g. u Ljubljani: M.canis je bio uzročnik t.capitis u 92% slučajeva, t.corporis u 69%, uz porast T.mentagrophytesa (zrnasti varijetet), dok je čest bio i T.rubrum uz pahuljasti T.mentagrophytes koji su u stalnom rastu. Čak je T.rubrum bio 3-4 puta češće izoliran sa tineae pedis i onychomikoza od T.mentagrophytesa.T.violaceum, T.schoenleini i T.tonsurans su tek sporadično izolirani, što ne iznenađuje, ali i E.floccosum je bio tek sporadično izoliran (17). I u Makedoniji je M.canis bio izoliran sa tineae capitis u 61% slučajeva, ali nema podataka o ostalim uzročnicima tineae capitis (18).

ANU BiH АНУ БиХ

Osim velikog porasta M.canis u svim zemljama, rijetkih izolata uzročnika endemskih dermatofitija T.violaceum, T.schoenleini i T.tonsurans u našoj neposrednoj okolini, ipak se postavlja pitanje odakle i ti pojedinačni izolati endemskih dermatofitija u Hrvatskoj, Sloveniji i veoma visoko učešće tih istih endemskih T.violaceum i T.schoenleini u Europi: možda jedan dio tih pacijenata sa T.violaceum i T.schoenleini potječe od milijunskog broja izbjeglica iz Bosne i Hercegovine, jer se radi o gradskom i ruralnom stanovništvu, u evropskim izvještajima (14).

Tako su i izolati predstavljeni na Tabeli 2, sa velikim učešćem M.canis, zatim T.mentagrophytes i E.floccosum, koji dominiraju izolatima u proteklom periodu, uveliko slični rezultatima u susjednim zemljama, te se sada i odnos zoofilnih dermatofita prema antropofilnim u našim rezultatima znatno izmijenio u korist zoofilnih dermatofita, prvenstveno M.canis, a zatim T.mentagrophytesa. Iako bi za definitivno saznanje o stanju endemskih dermatofita trebala terenska istraživanja, ipak se možemo osloniti na kontrolne preglede nakon terapije grizeofulvinom, koja su pokazala da se nakon takve terapije endemska dermatofitija ne može više smatrati problemom javnog zdravlja (19).

Zaključak

Flora dermatofita u Sarajevu izoliranih u periodu novembar 1997 - januar 2001. godine znatno je izmijenjena. Dominira M.canis (73,79%), T.mentagrophytes granulosum i E.floccosum su visoko zastupljeni (13,10% i 6,20%), T.violaceum, T.schoenleini i T.tonsurans, nekad dominantni uzročnici endemskih dermatofitija, izolirani su veoma rijetko (1,37 % i 0,34 %), iako je populacija stanovništva veoma izmijenjena u korist doseljenih izbjeglica iz područja nekadašnjih endemskih dermatofitija.

Summary

Dermatophytes flora in city Sarajevo is dramaticaly changed. In the period novembar 1997 - january 2001 M.canis dominated with 73,79 % of all isolates, followed by T.mentagrophytes var. granulosum and E.floccosum (13,10 % and 6,20 %). T.violaceum, T.schoenleini and T.tonsurans were isolated very rare (1,37 % and 0,34 %),although dominated in previous years and especially on areas of endemic dermatophytoses. The population in Sarajevo is changed due to the war and immigration of population from the regions of treated regions of endemic dermatophytoses.

LITERATURA

1. **Ožegović L.:** *Repartition geographique des dermatophytes en Yougoslavie,* Ann, Soc. Belge Med.Trop.44,4/5,743-745,1963.
2. **Grin E.I., Ožegović L.:** *Les donne es epidemiologiques et therapeutiques des dermatophytes endemiques en Yougoslavie,* Maroc Medicale 464-43-64,27-38,1964.
3. **Grin E.I., Ožegović L., Šenfeld M.:** *T.ferrugineum u Makedoniji,* Naučno Društvo NR BiH, Radovi XV, Knjiga 7, 11-16, 1960.
4. **Šalomon T.:** *Prvi slučajevi dermatofitije izazvani sa M.aoudouini u Bosanskoj Krajini,* Med.Arhiv X,2, 63-67, 1956.
5. **Grin E.I., Ožegović L.:** *Endemske dermatofitije u Bosni i Hercegovini,* ANU-BiH, Građa, Knjiga XXVII, OMN Knjiga 2, Sarajevo 1992-1998.
6. **Grin E.I., Ožegović L.:** *Dermatofitije ljudi i životinja,* Med.Knjiga,Beograd-Zagreb, 1960.
7. **Ožegović L.:** *Dinamika i frekvencija dermatofita izoliranih sa vlasišta i ostalih dijelova tijela u periodu 1964-1974.* Acta Dermatovenerologica Iug. 2, 221-226, 1975.
8. **Grin E.I., Ožegović L.:** *Osvrt na epidemiološko stanje dermatofitija u SFRJ,* IATROS 2, 33-40, 1966.
9. **Ožegović L., Krilić M., Ožegović T., Veljo Vera:** *Mikrosporija kunića uzrokovana M.canis u Jugoslaviji - prvi slučajevi* Veterinaria 39, 3-4, 447-482,1990.
10. **Ožegović L., Ćemalović-Babić Mirela, Adilović D., Zahirević A.:** *Istraživanja rezervoara M.canis na psima i mačkama,* Veterinaria - 48, 3-4, 203-208, 1999.
11. **Ožegović L.:** *Wild animals as reservoir of human pathogenic dermatophytes,* Medical Mycology, Zentralblatt Bakteriol., Suppl.8, 369-380, 1980.
12. **Ovčina-Kurtović Nermina, Ožegović L., Ćemalović- Babić Mirela:** *Dermatofiti i kvasnice na koži nogu u pripadnika vojske federacije,* ANUBiH, Posebna izdanja, Knjiga CX, OMN Knjiga 28, 71- 75, 2000.
13. **Grin E.I., Šimić L., Ožegović L.:** *Dermatophyten der Fusse bei einigen Bevolkerungsgruppen und Personen mit arteriellen Durchblutstorungen,* Mykosen 15(1) 19-21, 1972.
14. **Hay R.J.:** *Epidemiological survey on tinea capitis in Europe,* Mycologic Newsletter, ECMM,2, 13-14,1998.
15. **Skerlev M., Lipozenčić J.:** *The traditional and modern aspects of dermatomycology-significant changes in epidemiology,* Acta Dermatoven.Croat Vol.8,2, 99,2000 (abstract).
16. **Žilić-Ostojić C., Topolovac Z., Tomljanović-Veselski M., Kožul G., Skerlev M.:** *Trichophytosis recorded between february 1993 and january 2000 at the Department of dermatology and venerology,* Dr.J.Benčević, General Hospital Slavonski Brod, Croatia. Acta Dermatoven.Croat Vol.8 ,2,103,2000 (abstract).

17. **Dolenc-Voljč M.:** *Epidemilogic aspects of dermatomycoses in the Ljubljana area during last decades,* Acta Dermatoven.Croat Vol.8,2,101,2000 (abstract).
18. **Starova A.,Ickoca-Laskoska M., Goleva L., Balabanova-Stefanova M., Caca-Biljanovska N., Dervendzi-Sikova D.:** *Tinea capitis and Microsporum canis in the Republic of Macedonia: epidemiological aspects,* Acta Dermatoven.Croat Vol.8,2,102,2000 (abstract).
19. **Grin E.I.:** *Epidemiology and Control of Ringworm of the scalp.Int.Symposium Mycoses,* Washington 1970, WHO-PAN HO., Proc. 149-157, 1970.

ANU
BiH
АНУ
БиХ

Učestalost tumora mozga prije i poslije agresije na Bosnu i Hercegovinu

Faruk Konjhodžić[1], Sabahudin Ekinović,[2] Tatjana Jeremić[1].

Sažetak. Ispitivana je učestalost tumora mozga pet godine prije i pet godina poslije agresije na Bosnu i Herecegovinu, bez obzira na njihovu histološku sliku i intrakranijalnu lokalizaciju. Pošto postoji sumnja da je tumora više u periodu poslije agresije, izvršena je analiza njihove učestalosti od 1987. do 1991., tj. pet godina prije agresije i u periodu od 1996. do 2000., tj. pet godina poslije agresije. Statističkom analizom je dokazano da su uzorci reprezenti iste populacije i ne postoji značajna razlika u varijabilitetima unutar svakoga perioda posmatranja. Ne postoje ni značajne razlike između minimalnih i maksimalnih brojeva pojava tumora po godinama unutar grupa. Srednje vrijednosti se mogu smatrati reprezentima za pojedina dva perioda.

Dokazano je da postoji statistički značajna razlika u srednjim vrijednostima pojave tumora za period poslije agresije, u odnosu na period prije agresije na Bosnu i Hercegovinu, tj. da je tumora poslije agresije više. Sada je nemoguće dokazati postojanje izvjesnih kancerogenih supstancija u tkivu ili u krvi nosilaca. Ali velika količina stresa, prisutna u toku skoro četiri godine, sigurno je jedan od važnih elemenata porasta učestalosti.

Uvod i formulacija problema

Postoji nekontrolirano kliničko iskustvo da je tumora u cjelini, pa time i tumora moždane lokalizacije, više u periodu poslije agresije na Bosnu i Hercegovinu, te da se pomiče starosna granica prema nižim godištima. Razlog za ovakvo mišljenje je, između ostaloga, povećana količina stresa u trajanju od nepune četiri godine, ishrana konzervama sumnjivih kvaliteta kojima je dobrahno prošao rok trajanja, a koje su sadržavale sigurno konzervans u velikim količinama, jer kako inače objasniti njihov jestivi kvalitet dosta poslije istekloga roka upotrebe i, konačno, opravdana sumnja da je neka hemikalija, vjerovatno u ograničenim količinama zbog blizine ratišta, raspršivana iz velikoga broja bombi koje su padale na opkoljene enklave u Bosni i Hercegovini. Također, uzrok porasta tumora mozga valja tražiti i u činjenici da dijagnostički aparati uglavnome nisu radili zbog nedostatka električne energije, ili ih prije agresije nije ni bilo u nekim sredinama, pa sofisticirane ustanove,

[1] Klinički centar Univerziteta u Sarajevu, Klinika za neurohirurgiju

[2] Univerzitet u Sarajevu, Mašinski fakultet Zenica

predviđene za ovu vrstu medicinske djelatnosti, nisu bile kadre otkrivati novotvorine na mozgu, niti obavljati rutinske kontrole mozga, odnosno otkrivati prisustvo kancerogenih tvari u raznim tkivima, poglavito u krvi . Ovo je teško dokazati, jer u vrijeme agresije laboratoriji koji bi bili u stanju dokazati postojanje neke kancerogene materije u krvi (a koja je unošena u organizam ili raspršavanjem ili ishranom) uglavnome nisu radili zbog nedostatka elektirčne energije. Osim toga, populacija s kojom se radilo, nije ista prije i poslije agresije zbog velike unutrašnje i vanjske migracije stanovništva.

Materijal i metode

Da bismo dokazali gornju tvrdnju, tj. da je u periodu poslije agresije tumora više, posmatrali smo učestalost pojave tumora mozga pet godina prije agresije i pet godina poslije nje. Dakle, dovoljno dug period da bi opravdao zaključivanje. Prvu grupu je činila učestalost tumora mozga u godinama 1987., 1988., 1989., 1990. i 1991., što čini pet godine prije agresije na Bosnu, a drugu grupu učestalost tumora moždanih lokalizacija u godinama 1996., 1997., 1998., 1999. i 2000., što čini pet godina nakon agresije na Bosnu, a na materijalu iste ustanove, Klinike za neurohirurgiju u Sarajevu, koja je s obzirom da je dugo vremena bila jedina ustanova te vrste u Bosni i Hercegovini, te da posjeduje podatke do kojih se u svako vrijeme može doći, odličan reprezent za uzimanje materijala. Kriteriji za ulazak u seriju je bio da je tumor dokazan cjelokupnim kliničkim prosuđivanjem, tj. klinički, radiološki, laboratorijski, operativno i patološko histološki. Ako je samo jedan element cjelokupnoga kliničkoga prosuđivanja nedostajao, stastistička jedinica je isključivana iz serije. Posebno to vrijedi za patološko histološki nalaz, pa je tumor samo ono što je cjelokupnim ispitivanjem dokazano kao tumor.

Serija je prezentirana u tabelama 1. i 2. Populacija koja je dala te tumore, međutim, nije ista u oba perioda. Grupa iz prvoga perioda je prezentirana u tabeli 3., a populacija iz perioda poslije agresije u tabeli 4. Izvršeno je upoređivanje dviju serija, serija prije i poslije agresije i statističkim metodama, razlikom srednjih vrijednosti i razlikom varijansi, čime smo pokušali ustanoviti statistički značajnu razliku između dviju serija. Statistički značajna razlika između dviju serija ne postoji kako se vidi iz statističke analize.

Rezultati

Tabela 1. *Učestalost tumora mozga prije agresije*

godine	n
1987	91
1988	81
1989	104
1990	101
1991	139
ukupno	516

Tabela 2. *Učestalost tumora mozga poslije agresije*

godine	n
1996	57
1997	63
1998	75
1999	85
2000	109
ukupno	389

Tabela 3. *Nacionalna pripadnost nosilaca tumora prije agresije (prema popisu iz 1991. godine)*

nacionalnost	% u populaciji s kojom smo radili
Bošnjaci	50,59
Srbi	25,63
Hrvati	6,17
Ostali	17,15

Tabela 4. *Nacionalna pripadnost nosilaca tumora poslije agresije*

Nacionalnost	% u populaciji kojom smo radili
Bošnjaci	94,2
Srbi	3,7
Hrvati	1,05
Ostali	0,52

ANU BiH АНУ БиХ

Statistička analiza

S obzirom na poznato procentualno učešće Bošnjaka u ukupnoj populaciji stanovništva u godinama prije i poslije agresije mogu se dati procijenjene vrijednosti pojava tumora mozga kod Bošnjaka, što je prezentiranao tabelom 5.

Statistička provjera značajnosti razlika srednjih brojeva pojava tumora za pet godina prije i pet godina posliije agresije, urađena je s dva aspekta, i to: provjera značajnosti razlika varijansi (varijabiliteta) unutar svakoga posmatranoga perioda i provjera značajnosti razlike srednjih vrijednosti pojave tumora za periode prije i poslije agresije.

Zašto ove dvije statističke metodologije? U periodu od pet godina prije agresije srednji broj pojava tumora n(87-91) je 52,2, a u periodu pet godina poslije agresije n(96-00) je 73,4, sa minimalnim brojevima pojava n(87-91. Min.) - 41 i n(96-00, min) - 54 i maksimalnim n (87-91, max) - 70 i n(96-00, max) - 103. Potrebno je, dakle, dokazati da varijabiliteti pojava tumora u posmatranim periodima nisu značajni, a s druge strane, potrebno je dokazati da je razlika vrijednosti pojava tumora n(87-91) i n(96-00) značajna.

Za testiranje nulte hipoteze "ne postoji značajna razlika u varijabilitetima" za posmatrane periode prije i poslije agresije tj. H(o) - b(87-'91) - b(96-00) poslužit će Fisherov F-test. Nasuprot nultoj hipotezi stoji alternativna hipoteza "postoji značajna razlika u varijabilitetima" , tj. H(1) - b(87-91) nije jednako b(96-00).

Sa stanovišta postavljene hipoteze u ovom istraživačkom radu, interesantna je nulta hipoteza, jer se njenim potvrđivanjem dokazuje da su oba posmatrana perioda reprezentativna, zatim da razlika između njihovih varijabiliteta nije značajna i da su posmatrani uzorci reprezenti iste populacije.

Tabela 5. *Brojevi pojava tumora mozga kod Bošnjaka pet godina prije i pet godina poslije agresije*

Period prije agresije

godina	n
1987	46
1988	41
1989	53
1990	51
1991	70

Period poslije agresije

1996	54
1997	59
1998	7i
1999	80
2000	103

ANU BiH АНУ БиХ

Sredine su n(87-91) - 52, 2 i n (96-00) - 73,4, varijanse b(87-91) - 120,7 i b(96-00)- 348,3, na osnovu čega slijedi da je F(o) - o,3465.

S obzirom na brojeve, stepeni slobode su: v(1) je 5-1, tj. 4, i v(2) je 5-1 tj. 4. gornji, 95 postotni (iz statističke tabele za kritične vrijednosti Fisherovoga testa) je F(2) - 6,39, a donji 5 postotni je F(1) - 0,156. Kako je računska vrijednost odnosa H(o) - 0,3465 unutar intervala (F1 i F2) to se sa 5% rizika nulta hipoteza H(o) "ne postoji značajna razlika u varijabilitetima" prihvaća.

Dakle, može se zaključiti da su uzorci prije i poslije agresije reprezenti iste populacije (teritorijalno, strukturalno itd) i da ne postoji značajna razlika u varijabilitetima unutar svakoga perioda posmatranja. Ovo također znači i slijedeće: ne postoje značajne razlike između minimalnih i maksimalnih brojeva pojava tumora po godinama unutar grupa. Konačno, srednje vrijednosti se, na osnovu gornjega zaključka, mogu smatrati reprezentantima za pojedina dva perioda.

Testiranje nulte hipoteze "ne postoji značajna razlika u srednjim vrijednostima pojave tumora" za periode prije i poslije agresije, tj. H(o) - (n87-91

- n96-00) poslužit će Studentov t -test. Nasuprot nultoj hipotezi, stoji alternativna hipoteza "postoji značajna razlika u srednjim vrijednostima pojave tumora", tj. H(o) - n87-91 nije jednako n96-00.

Sa aspekta istraživačkoga zadatka interesantna je alternativna hipoteza, jer se njenim povrđivanjem dokazuje da je došlo do značajnoga povećanja broja tumora u periodu poslije agresije u odnosu na period prije agresije.

Na osnovu dobijenih rezultata, računska vrijednost Studenotova t testa je t - 5,04962. Pošto je kritična (tabelarna) vrijednost Studentovoga t - testa manja (2,131846) od računske to se nulta hipoteza odbacuje u korist alternativne hipoteze, tj. "postoji značajna razlika u srednjim vrijednostima pojave tumora" za period poslije, u odnosu na period prije agresije.

Diskusija

Statističkim analizama koje je radila renomirana ustanova, Mašinski fakultet u Zenici, a koji pripada Univerzitetu u Sarajevu, dokazano je da su uzorci prije i poslije agresije reprezenti iste populacije (teritorijalno, strukturalno itd.) i da ne postoji značajna razlika u varijabilitetima unutar svakoga perioda posmatranja. Ne postoje ni značajne razlike između minimalnih i maksimalnih brojeva pojava tumora po godinama unutar grupa. Srednje vrijednosti se na osnovu gornjega zaključka, mogu smatrati reprezentima za pojedina dva perioda.

Također je statistički dokazano da se nulta hipoteza "ne postoji značajna razlika u srednjim vrijednostima pojave tumora" odbacuje u korist alternativne hipoteze, tj. da postoji značajna razlika u srednjim vrijednostima pojave tumora za period poslije u odnosu na period prije agresije.

Tumora je, dakle, više u periodu poslije agresije. Nemamo materijalnoga dokaza da je ijedna činjenica zašto je to tako, a koja je postavljena u uvodu tačna. U svijetu tumori pokazuju porast, mada ne toliki, ali ostaje sve ono što smo prezentirali u uvodu kao ispravno i dokazano, jer je zaista populacija u kojoj se javlja više tumora moždane lokalizacije živjela od konzervi i jer je dokazano da je bila objektom teškoga granatiranja. Jugoslavija je imala sisteme za proizvodnju hemijskoga oružja i samo naivni ne mogu pretpostaviti da ih je agresor i upotrijebio.

Nažalost, u vrijeme opće nestašice, pa tako i nestašice energije, kada je jedino preostajala borba za golo preživljavanje, nisu radili laboratoriji koji bi u krvi ili u tkivu mogli dokazati postojanje supstancija koje su bile i ranije označene kao kancerogene, a koje su raspršivane u zraku ili smo ih uzimali u hrani, otopljene u vodi ili u konzervamaa koje smo morali konzumirati, iako im je vijek trajanja bio dobrahno prošao. Te konzerve su organoleptički bile ispravne, jer su vjerovatno sadržavale konzervans u znatnoj koncentraciji, ali njega nismo imali čim otkriti. Stres je, međutim, u velikoj mjeri bio prisutan i dokazan. Prema podacima iz projekta "Psihosocijalni aspekti rata u BiH", 80% populacije BiH boluje od postraumatskoga stress sindroma. Ako je to tako, onda je potpuno razumljivo povećanje učestalosti broja tumora na mozgu u populaciji Bošnjaka unutar Bosne i Hercegovine.

Zaključak

1. Tumora mozga je u periodu poslije agresije više nego u periodu prije agresije na Bosnu i Hercegovinu.
2. Nemamo dokaza šta je tome uzrok, s obzirom na poznatu činjenicu o nefunkcioniranju laboratorija koji bi mogli dokazati postojanje nekih kancerogenih tvari u krvi ili u tkivu.
3. Povećana količina stresa koja je bila prisutna zbog stalnoga bombardiranja, a koje je trajalo skoro četiri godine u opkoljenim enklavama, sigurno ima utjecaja na porast tumora u populaciji Bošnjaka u Bosni i Hercegovini.

Summary

In this paper the authors made investigation of incidence of brain tumors five years before and five years after the aggression on the Bosnia and Herzegovina, irrespective of their histological picture and intracranial localization.

There is uncontrolled clinical observation that incidence of brain tumors is increased after the aggression. Because of that the authors have investigated this occurrence during five years before aggression (from 1987. to 1991), and five years after the aggression (from 1996 till 2000.) By the help of statistical analysis has been proved that samples represents same population. and that there is no significant difference between variability within every period of investigation. Also, there is no significant differences between minimal and maximal numbers of tumor incidence within the groups. It is possible to consider that mean values represents two periods of time.

It is also proved that there is significant statistical difference in the mean values of tumor incidence after and before aggression, and that incidence of tumor appearance increased after the aggression. It is impossible to prove existence of certain cancerogenous substance in the blood and in the tissue of those who had the tumors. But stress which lasted almost four years is one of very important factors of increased incidence of brain tumors.

Literatura

1. **Loga S.:** *Psihosomatski aspekti rata u Bosni i Hercegovini,* projekat ANUBiH, 1999.

Suicide during the war in Sarajevo

Slobodan Loga,[1)]

Abstract. The goal of this research is to map out of specific rates of suicides during the 1992-1995 war in Sarajevo, in comparison to the situation before and after the war. Data used in this research were taken from the Ministry of internal affaires in Sarajevo during the war and from the statistical institutions in former Yugoslavia and Bosnia and Herzegovina. Suicide rate in Bosnia and Herzegovina was under average in former Yugoslavia, with some tendencies to increase. During the war, Sarajevo has been in very difficult position. So, habitants reacted with increased of psychological disorders. Besides all, it has been observed that the suicide rate increased. To compare of the risk factors in Sarajevo during the war and in peaceful time was done. It is hardly to find same comparison in any literature on the world till today.

Key words: Suicide. War. Rate of suicide. Risk factor.

ANU BiH AHУ

Introduction

Suicide can be defined in various ways, but more employable definition is: it is deliberately initiated a conscious act, and violent way for subtraction of own life, with fatal outcome.

Suicidology is a special scientific discipline that covers researches on suicide. An Antic period and earlier, suicide was not punishable, but later, it was considered as a criminal act. Attempted suicide was punishable with death penalty.

Today, suicide is not considered as a criminal act, but its alleging and helping in suicidal act is punishable.

The researches of suicide have a great importance in each environment, because it gives an impact on difficulties that each individual is facing with in the community.

Suicide belongs partly in social-pathological appearances, so it involves multidisciplinary or specially different people: pedagogues, philosophers, sociologists, layers, criminologists, medical doctors and other experts. Special attentions at this opportunity are devoted to epidemiological aspects of suicide.

[1)] Dopisni član ANUBiH, Medicinski fakultet u Sarajevu

Compared to suicide, attempted suicide is more difficult to define. The most acceptable definition is: nonfatal suicidal behavior. It means, that individuals who deliberately harm themselves, but did not kill themselves. Sometimes, it is very hard to make diagnosis, because individual often calculates with his/hers detailed plans. It is considered that individuals who commit suicide and subjects that attempted are not from the same population.

Most statistics on suicide are not correct, because all suicides were not liable to the court for post mortem examination, what is only arbitrarily to claim suicide diagnosis.

According to the results from investigation that has been made in Sarajevo, women rarely commit suicide. The risk is among younger people, as pupils or students. Maximum of suicide attempts are appearing from February until May, and minimum from July to September. Suicide tendencies are very often during the working days, with its maximum on Mondays. The most rare attempts are during weekends - Sunday (1).

Rates on suicide are increasing with age of both, female and men. Rates are decreased within individuals in marriage, then within those who are divorce or widows/widowers.

In USA, suicide rate is 12,5 on 100.000 habitants. Suicides among psychiatric patients are 10 times higher than among general population. It is on ninth place of the scale on leading causes of the death (2).

Suicide rates variations are in accordance of age, sex, social-economic status, religion and marital status. According to total number, 80% covers male population.

Statistics in USA, dated in 1994, tell us that suicidal rate among children between 5 and 14 years is 0,9 on 100.000 habitants. In this population group, suicide belongs to sixth place in leading causes of death. Suicide among individuals from 15 to 24 years is much higher, 13,8 on 100.000 habitants. It presents one of the leading causes of death. There are 53% of suicide among young population is connected with abuse of pharmacological products. Also, 35% of lethal results are connected with I.V. application of these products (3).

Objective

The goal of this research is to map out of specific rates of suicides during the 1992-1995 war in Sarajevo, in comparison to the situation before and after the war. The four years of war in Bosnia-Herzegovina, Sarajevo in particular, were exceptionally severe position (constant shelling, snipers, starvation, thirst, cold, total siege, complete restriction of movement, as well as many other problems), and the war has created a rather large number of the psychotraumatized, also with consequences for the general psychiatric morbidity in

this region. It could be hypothesized that rate of suicide during the war is higher than in pre-war and post-war periods.

Method

Data used in this research were taken from the Ministry of internal affaires in Sarajevo during the war and from the statistical institutions in former Yugoslavia and Bosnia and Hercegovina.

The research encompasses data analysis of the four year war period, with each year of war being analyzed, as well as before and after the war. Also, it was elaborated risk factors during the war and compare with same in peacetime..

Results and discussion

Statistics data for the regions of former Yugoslavia is given out in peacetime and stabile period.

In former Yugoslavia the highest suicide rate was in Slovenia, and the lowest one in Kosovo (table 1). Suicide rate in Bosnia and Herzegovina was under average in former Yugoslavia, with some tendencies to increase (4).

Table 1. *Rate of suicide in former Yugoslavia 1960 -1980.*

	1960.	1965.	1970.	1975.	1979.	1980.
YU	12	12,4	13,5	13,5	14,1	14,7
BH	7,3	6,5	7,1	8,6	9,6	9,4
Monte Negro	13,7	13,3	8,2	11,3	11,0	12,6
Croatia	13,7	15,1	16,8	18,4	19,6	21,2
Macedonia	3,6	4	5,3	3,9	5,6	4,9
Slovenia	25,6	25,7	30,8	29,3	31,3	32,5
Serbia	11,6	12,4	12,9	12	12	12,3
Vojvodina	20,8	24,1	25,2	25,4	25,4	23,2
Kosovo	2,5	4,2	2,9	1,6	2	1,3

During the war, Sarajevo has been in very difficult position, as it mentioned before. So, habitants reacted with increased of psychological disorders. Besides all, it has been observed that the suicide rate increased, what was not typical for this region before the war.

As it showed on table 2, suicide rate in Sarajevo was steady from 1983 till 1992 (beginning of war), and it increased significantly, especially in 1993 (the most difficult period in war for Sarajevo).

The end of the war and beginning of peaceful period, show us tendency of decrease for rate of suicide.

ANU BiH АНУ БиХ

Table 2. *Rate of suicide in Sarajevo 1982 - 1997.*

Year	1982.	1983.	1984.	1985.	1986.	1992.	1993.	1994.	1995.	1996.	1997.
Rate	2,83	16,17	16,04	16,12	17,00	16,00	22,67	18,33	21,33	7,16	15,17

The committed suicide of male habitants were very significant higher. The ratio between men and women that committed suicide is almost 2,5:1 (table 3). Lowest ratio between man and women was 1993 (1.8 :1), but highest was one year after the war - 1996 (5:1).

Table 3. *Sarajevo: suicide and gender 1992-1997 (%)*

Year/Gender	1992.	1993.	1994.	1995.	1996.	1997.	Total
M	72,92	64,71	72,73	71,88	83,33	68,52	70,93
F	27,08	35,29	27,27	28,12	16,67	31,48	29,07
Total	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00
Ratio M:F	2.7:1	1.8 : 1	2.7 : 1	2.6 : 1	5: 1	2.2 : 1	2.4 ; 1

The table 4. shows the relation between percent of committed suicide and age. It is evident that in the war and post war period, under the highest risk to commit suicide was elderly population. The lowest risk had adolescents between 14 and 18 years.

Table 4. *Sarajevo: suicide and age 1992 - 1997. (%)*

Year/Age	1992.	1993.	1994.	1995.	1996.	1997.	Total
do 14	0,00	1,47	0,00	1,56	0,00	0,00	0,64
15-16	0,00	1,47	1,82	1,56	4,17	1,85	1,60
17-18	0,00	1,47	0,00	0,00	0,00	0,00	0,32
19-20	0,00	5,88	3,64	3,13	4,17	7,41	4,15
21-25	2,08	7,35	9,09	9,38	0,00	1,85	5,75
26-30	6,25	1,47	3,64	6,25	8,33	11,11	5,75
31-35	2,08	5,88	5,45	6,25	4,17	11,11	6,07
36-40	0,00	8,82	7,27	6,25	37,5	5,56	8,31
41-45	0,00	7,35	10,91	6,25	16,67	9,26	7,67
46-50	4,17	8,82	7,27	18,75	0,00	9,26	9,27
51-55	8,33	11,76	7,27	7,81	4,17	0,00	7,03
56-60	6,25	10,29	14,55	6,25	8,33	12,96	9,90
61-65	8,33	5,88	12,73	4,69	0,00	12,96	7,99
66 and more	25,00	14,71	16,36	20,31	12,5	14,81	17,57
No regist.	37,50	7,35	0,00	1,56	0,00	1,85	7,99
Total	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00

АНУ БиХ

It is very interesting compare the risk factors in Sarajevo during the war and in peace-time. It is hardly to find same comparison in any literature on the world till today. Risk factors of suicide are numerous, and they are present on table 5.

They can be divided into general and medical ones. In general ones are male population, marital status, living alone, removal, recently lost of partner, unemployment, multiple attempted suicide, suicide in family (parents), suddenly changes in life and non-existing alternative solutions in life.

Medical factors are most often: symptoms of depression (feelings of helplessness, guiltiness, etc.), depression resistant to therapy , insomnia, somatic problems, non-organic cause, lost of body weight, chronic somatic diseases, expression tendencies to suicide, mental illness and disorders, alcoholism/drug abuse, chronic illness with permanent pain, first five days after the release from hospital, multiple hospitalizations, dysfunction of serotonin and nor-adrenergic system in CNS less level of cholesterol in serum.

Table 5. *Risk factors in peace and war-time*

Risk factors	in peace time	in war time
male	++	+++
old age	++	+++
living alone	+	+++
unemployment	++	
multiple attempted suicide	++	+
suicide in family (parents)	+	+
suddenly changes in life		+++
depression resistant to therapy	++	
non-existing alternative solutions	+	+++
somatic illness	+	++
mental illness and disorders	+	+++
alcoholism/drug abuse	++	
chronic illness with permanent pain	+	++
first five days after the release from hospital	+	
multiple hospitalizations	+	
dysfunction of serotonin and nor-adrenergic system in CNS	+	?
less level of cholesterol in serum.	+	??

According to this findings risk factors are potentiate during the war especially in male and old population who living alone, with had suddenly changes in life, with non-existing alternative solutions in life. Also, medical factors were very important in war-time, and the highest risk factors were:

mental illness and disorders (stress related disorders and transient psychoses), chronic illness with permanent pain, chronic somatic diseases.

In the piece-time, serious risk factors were: unemployment, depression resistant to therapy, multiple attempted suicide and alcoholism/drug abuse, first five days after the release from hospital and multiple hospitalizations.

Dysfunction of serotonin and nor-adrenergic system in CNS, and level of cholesterol in serum were not possible measured during the war in Sarajevo.

Rezime

Istraživanje obuhvata izračunavanje stope suicida u Sarajevu u toku, neposredno prije i nakon rata. Podaci su prikupljeni iz Ministrastva unutrašnjih poslova, kao i iz statističkih izvještaja u bivšoj Jugoslaviji. Prije izbijanja ratnih sukoba, Bosna i Hercegovina je imala niže stope suicida od prosjeka u bivšoj državi. Sarajevo je bilo u izuzetno teškoj poziciji u toku rata (1992 - 1995) i stanovništvo je reagovalo pojavom većeg broja psihičkih poremećaja. Zbog toga je povećan i broj suicida u Sarajevu. Samoubistvo su izvršili pretežno stariji muškarci. Izvršeno je upoređivanje rizičnih faktora suicida u ratu i miru. Koliko je poznato to je jedino do sada izvršeno istraživanje u tom pravcu, koje je zabilježeno u literaturi.

Ključne riječi: Suicid, Rat. Stope suicida. Rizični faktori.

References

1. **Loga,S.:** *Učestalost zahtjeva za hospitalizaciju na Psihijatrijskoj klinici u Sarajevu osoba koje su pokušale samoubistvo u proteklom petogodišnjem periodu,* Proceed. I Congress Prevention of Suicide, Ohrid, 1983:157-161.
2. **Hilard, J.R.:** *Emergency Management of Suicidal Patient,* In: Walker, J.I. (ed): Psychiatric Emergencies: Interventions and Resolution. Philadelphia, Lippincott, 1983: 83-97.
3. **Singh, G.K., Kochanek, K.E., MacDorman, M.F.:** *Advance Report of Final Mortality Statistics,* 1994. Monthly Vital Statistics Report, 45, 3, suppl, Hyattsville, MD, National Center for Statistics, 1996.
4. *Savezni zavod za statistiku: Samoubistva u Jugoslaviji: Saopštenje,* 91, XXVII, 1.04.1983.

ANU BiH АНУ БиХ

MRI i CT timusa kod miastenije gravis

Faruk Dalagija,[1] Šerif Bešlić[1]

Sažetak. Magnetna rezonanca (MRI) i kompjuterizirana tomografija (CT) su komparirane u jednogodišnjoj retrospektivnoj studiji 17 pacijenata (9 muškog i 8 ženskog pola, prosječne dobi od 28,2 godina, 13 sa uputnom dijagnozom miastenija gravis i 4 perzistentni timus). Obje metode (CT i MRI) su potvrdile visoku senzitivnost i tačno identifikovale stanje timusa. CT nalazi su najčešće prikazali mekotkivnu masu ili nakupine masnog tkiva sa linearnim ili nodularnim areama veće gustoće. MRI je obično prikazala aree nižeg intenziteta signala u T1 i PD sekvencama, dok je u T2 signal bio nešto slabiji. T1 i T2 Turbo Flash Breath Hold sekvence su se pokazale veoma korisnim u prikazu timusa sa mogućnošću prikaza timusne kapsule. Radiološki nalazi su potvrđeni intraoperativno kod 12 pacijenata sa miastenijom gravis (11 pacijenata su imali timus perzistens i 1 pacijent timom).

MRI i CT su veoma vrijedne komplementarne radiološke dijagnostičke metode vizuelizacije timusa. CT ima bolju prostornu rezoluciju i lakše prikazuje kalcifikacije. MRI jasno diferencira otočiće žljezdanog tkiva, osobito unutar masnog tkiva i timusnu kapsulu. Iako je MRI skuplja i pregled duže traje, ona je bez jonizirajućeg zračenja i kao takva nije štetna.

Ključne riječi: timus, miastenija gravis, magnetna rezonanca /MRI/, kompjuterizirana tomografija /CT/.

Uvod

Thymus je latinska riječ izvedena od grčke riječi thymos, koja znači bradavičasti izraštaj. Ime je poteklo od njegove sličnosti sa cvjetovima biljke majčina dušica. Poznat je već preko 2000 godina i uloga mu je od najranijih vremena bila zagonetna. Jedno od posebnih oboljenja za koje je optužen timus je Myasthenia gravis (m. g.). Radi se o oboljenju čije su kliničke karakteristike jasno definisane, dijagnoza relativno pouzdana, suština poremećaja ograničena na neuromišićnu spojnicu, a patogeneza vezana za autoimuni proces - prisustvo cirkulirajućih antitijela usmjerenih na proteine nikotinskih, postsinaptičkih acetilholinskih receptora; terapija je proširena novim metodama i u cjelini uspješnija (1). U diferencijalnoj dijagnostici ovog oboljenja dolazi u obzir Lambert-Eaton miastenični sindrom, koji nije tako rijedak, posebno u okviru danas sve brojnijih malignih i autoimunih oboljenja (2).

[1] Institut za radiologiju KCU Sarajevo

Zbog svega navedenog pažnja je fokusirana na utvrđivanje prisustva tkiva timusa u grudnom košu s obzirom na njegovu udruženost sa m.g. (hiperplazija 65 - 77% i timom 8 - 23%) i hirurško timektomiju kao glavnu indikaciju u tretmanu m. g. (3).

Donedavno u dijagnostici timusa na raspolaganju su bile standardna radiografija i klasična tomografija, te od invazivnih metoda pneumomedijastinografija, flebografija i angiografija. Međutim, pomoću navedenih metoda, prisustvo timusa je bilo veoma teško utvrditi. Danas su u dijagnostici timusa na raspolaganju digitalne radiološke dijagnostičke metode kao kompjuterizirana tomografija (CT), ultrazvuk (UZ) i u posljednje vrijeme magnetna rezonanca (MRI). Ovdje treba istaknuti da mogućnosti raspoložive opreme igraju značajnu ulogu, zbog čega se podaci u literaturi u pogledu pouzdanosti pojedinih metoda nerijetko razlikuju.

Cilj ovog rada je prezentacija vlastitih iskustava primjene MRI u dijagnostici patologije timusa u odnosu na CT.

Materijali i metode

Retrospektivnom metodom su obrađeni CT i MR nalazi ukupno 17 (100%) pacijenata kojim su ovi pregledi izvršeni u našoj ustanovi tokom jednogodišnjeg perioda. Od ukupnog broja, 9 (52,9 %) su bili muškog, a 8 (47,1 %) ženskog pola (1,1 : 1), prosječne dobi od 28,2 godina (od 2 do 50 godina). Od toga je 13 (76,5%) pacijenata upućeno pod dijagnozom m. g., a 4 (23,5%) mlađa pacijenta kao thymus persistens.

Svim pacijentima je prvo urađen CT na aparatu ART, firme Siemens. Pregledi su izvršeni nativno i nakon intravenske aplikacije kontrastnog sredstva (50 ccm Omnipaque-a) u vidu bolusa.

Nativnom serijom je obuhvaćen cijeli grudni koš (od plućnih vrhova do stražnjih dijelova f. c. sinusa), a kontrastnom samo zona od interesa (timusna loža-prednji medijastinum, retrosternalno, na nivou luka aorte). Najčešće su rađeni slojevi od po 3-5 mm, na matrici 512x512. Nakon CT pregleda, urađen je i MR pregled (u periodu od nekoliko dana do najduže mjesec dana) na aparatu Magnetom Impact 1,0 Tesla, firme Siemens. Obično su korištene slijedeće sekvence: spin eho (SE), T1 i T2 , proton density (PD) i Turbo Flash T1 i T2 , Breath Hold sa EKG geitingom, najčešće u aksijalnoj i sagitalnoj ravni. Širina vidnog polja je obično bila 380-400 mm. Pregledi su rađeni nativno i nakon intravenske aplikacije paramagnetnog kontrastnog sredstva (10 ccm Omniscan-a), sa slojevima od po 6-7 mm debljine. Analizirana je vidljivost timusa, njegove tkivne karakteristike, sadržaj kalcija, te eventualna vidljivost kapsule.

Rezultati

Od ukupno 17 (100%) pacijenata, 12 (70,6%) pacijenata su operisani, a svi su bolovali od m. g. Kod 11 (64,7%) je patohistološki utvrđen perzistentni timus i kod 1 (5,9%) pacijenta timom. Ovaj posljednji pacijent, muškarac star 25 godina je nažalost egzitirao neposredno nakon operacije.

CT nalazi su najčešće prikazivali mekotkivnu masu ili nakupine masnog tkiva prožetog denznijim trakastim ili nodularnim zonama. Iste su se nakon bolusa kontrastnog sredstva intenzivnije opacificirale, sa porastom denziteta u Haunsfildovim jedinicama.

MR nalazi su u svim slučajevima potvrdili postojanje timusnog tkiva koje je takođe, nakon aplikacije, jasno prihvatalo kontrastno sredstvo, u smislu prisustva aktivnog žljezdanog tkiva. MRI je obično prikazala trakaste, nodularne, te kondenzovanije zone hiposignala u T1 i PD sekvencama, a u T2 je signal bio nešto slabiji. Kod nekolicine pacijenata su se pokazale veoma korisnim T1 i T2 Turbo Flash Breath Hold sekvence sa vrlo plastičnim prikazom timusnog žljezdanog tkiva unutar masnih nakupina kao i timusne kapsule, kod pacijenta sa timomom (Slika 1.). Jasnoća prikaza žlijezde u ovim slučajevima je nadmašila onu kod prikaza CT-om, koji je kod pacijenta sa timomom jasnije prikazao kalcifikat u istom.

Kod ostalih pacijenata nije bilo patohistološke potvrde, jer je jedan odrasli pacijent egzitirao pod slikom miasteničnog statusa, dok su ostala 4 pacijenta bili djeca ispod 15 godina starosti sa hiperplazijom timusa. Kod njih je CT u timusnoj loži otkrio žljezdano tkivo, a MR analizi su podvrgnuti radi tkivne karakterizacije timusa, zbog recidivirajućih infekcija. U ovim slučajevima, žljezdano tkivo je pokazivalo u T1 signal nižeg intenziteta od onog medijastinalne masti, a u T2 sekvencama signal je bio istog ili većeg intenziteta.



Slika 1. *MR prikaz kapsule timoma*

Slika 1. MR prikaz kapsule timoma

Diskusija

Dijagnoza m. g. se postavlja na bazi niza dijagnostičkih pretraga, kao što su: anamneza i fizikalni pregled (ptoza, diplopije, mišićna slabost, dizartrija, disfagija), laboratorijski, farmakološki i elektrofiziološki testovi, te radiološke dijagnostičke metode (standardna radiografija, klasična tomografija, CT, MRI, UZ).

Kod 10% ovih pacijenata se javlja po život opasno zahvatanje mišića (12). Postoji jasna udruženost m. g. sa prisustvom timusa ili autoimunih bolesti (3,6). U 65-77% sreće se hiperplazija timusa, a u 8-23% timom (3). U ovom radu sa relativno malom serijom pacijenata je bilo 91,8% hiperplazija timusa i 8,2% (jedan) timoma. Timom je, inače, najčešći tumor timusa, koji se obično sreće u dobi od 30 do 50 godina, rijetko prije 20 godina, a podjednako kod oba pola. Približno 20-50% timoma su udruženi sa m.g.,odnsno 15% pacijenata sa m. g. imaju timom (8,11,12). Neinvazivni timom u 1/3 slučajeva sadrži intratumorske kalcifikate i zone cistične degeneracije (5,11). Međutim, 15-40% timoma mogu biti maligni (3,6,12).

Sve navedeno ukazuje na potrebu i značaj precizne dijagnostike uzroka m. g., osobito ako se zna da je hirurška timektomija najznačajniji metod njenog liječenja. Od radioloških dijagnostičkih metoda na prvom mjestu su CT i MRI. Kombinacija ove dvije metode može olakšati preoperativnu dijagnostiku i steidžing timusne neoplazme (7). Međutim, u literaturi se nailazi na različita gledišta u pogledu njihovih mogućnosti (9). Tumorska kapsula, malignost i diskretna lokalna invazija se dosta teško dokazuju pomoću obje metode vizuelizacije (14). Neki autori smatraju da je uloga CT i MRI ograničena u detekciji ovih abnormalnosti, jer se 50% slučajeva timusne hiperplazije javlja sa sasvim urednim CT nalazom, zato što su otočići aktivnog timusnog tkiva difuzno raspostranjeni u masnom tkivu (6,7). Smatra se da je CT donedavno bio najpreciznija metoda za dijagnostiku bolesti timusa, posebno za detekciju malih timoma nevidljivih na standardnoj radiografiji (5,12). Pojava MRI je uzdrmala ovo gledište, iako neki autori i nadalje ističu da se prikaz inkapsulirane mase i homogeno pojačanje kapsule, kao indikatora benignosti, najbolje postižu pomoću CT-a, a da MRI ima ograničenu vrijednost (5,7).

Rezultati ovog rada, iako je riječ o relativno maloj seriji, potvrdili su visoku senzitivnost obje metode. Međutim, kod pacijenata sa timomom, kapsula je jasno uočena samo na MR pregledu, dok je kalcifikat u timomu jasnije prikazan CT-om.

Kod MRI, normalno timusno tkivo u T1 ima slabiji intenzitet signala od masti, a u T2 isti ili veći intenzitet. Timus se diferencira od masti zahvaljujući razlici u gustoći protona ova dva tkiva. Normalan timus se prikazuje debljim i gušćim na MR presjecima nego na CT-u, vjerovatno zbog oštrije ocrtanosti timusnog tkiva prema medijastinalnom masnom tkivu (10,15).

U ovom radu je uočeno da patološko tkivo timusa ima intermedijaran signal u odnosu na mast u T1 i nešto niži u T2 . Neki autori ističu bolju kontrastnu rezoluciju MR slika kada je u pitanju diferenciranje tkiva timusa (9). Znatan broj njih daju prednost MRI kada je u pitanju zahvatanje kardijalnih i vaskularnih struktura od strane malignog timoma i procjena rezidualne masti nakon radioterapije, ističući veću senzitivnost MRI u odnosu CT (3,6,7,11,14,15). Nadalje, kao jedna od prednosti MRI se navodi i njena veća sposobnost tkivne karakterizacije (diferenciranje solidnog, cističnog, nekrotičnog) (13). MRI se preporučuje kod svakog nesigurnog CT pregleda (14).

U ovom radu su i CT i MRI u svim slučajevima potvrdile postojanje timusnog tkiva, ali kod 1/5 slučajeva CT nalaz je bio nesiguran, jer su se aktivni timusni otočići unutar masnih nakupina teško diferencirali. Kod ovih pacijenata MRI je pokazala visoku kontrastnu rezoluciju između masti i timusnog tkiva, koje je veoma plastično prikazano (Slika 2, i 3.). MRI je potvrdila i svoje prednosti u pogledu multiplanarnosti (sagitalno, koronalno, aksijalno), bez pojave "step" artefakata i bez štetnog jonizirajućeg zračenja, što je posebno značajno kod pregleda djece i trudnica. Osim navedenog, MRI u izvjesnim slučajevima ne zahtijeva ni primjenu paramagnetnog kontrastnog sredstva dajući dobro diferenciranje kardiovaskularnih struktura od susjednih patoloških procesa.

CT skeniranje je brže, manje skupo, sa boljom rezolucijom i tanjim slojevima, što može biti značajno kod malih lezija. Međutim, ono koristi dosta visoke doze štetnog jonizirajućeg zračenja.

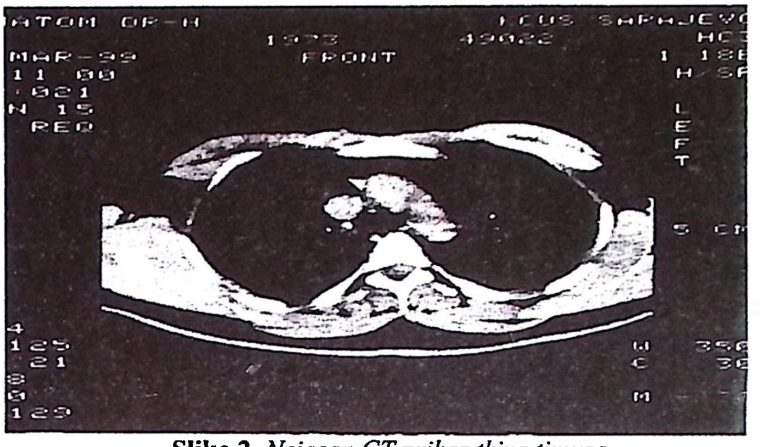
Konačni rezultati pretraga sigurno zavise i od mogućnosti raspoložive aparature,što je vjerovatno jedan od razloga zbog kojeg podaci u literaturi variraju. Stoga su za definitivne zaključke u pogledu prednosti i ograničenja MRI i CT-a, neophodna daljnja istraživanja.

Zaključci

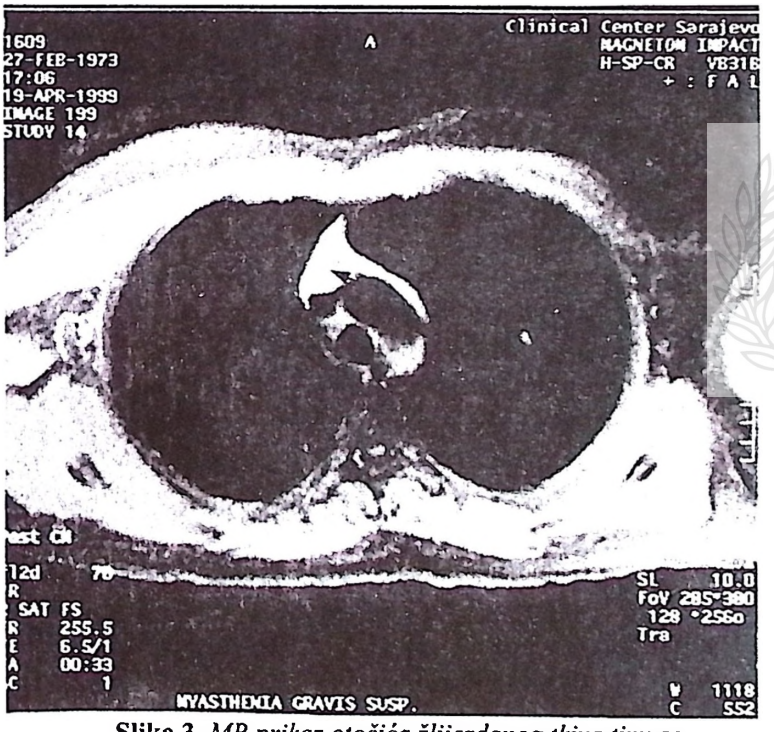
MRI i CT su veoma vrijedne, komplementarne radiološke dijagnostičke metode za vizuelizaciju timusa.

CT ima bolju prostornu rezoluciju i lakše prikazuje kalcifikate.

MRI prikazuje otočiće žljezdanog tkiva timusa, osobito unutar masnog tkiva, kao i kapsulu kod timoma. To je metoda bez štetnog jonizirajućeg zračenja, sa mogućnošću prikaza u više projekcionih ravni i bez primjene jodnih kontrastnih sredstava, ali je pregled skuplji, duže traje i može biti kontraindiciran.



Slika 2. *Nejasan CT prikaz tkiva timusa*



Slika 3. *MR prikaz otočića žlijezdanog tkiva timusa*

ANU BiH АНУ БиХ

Summary

Magnetic resonance imaging (MRI and computed tomography (CT) were comapred in one year retrospective study of 17 patients (9 male and 8 female, overage age 28,2 years, 13 patients were admitted with the diagnosis of myasthenia gravis and 4 patients with the diagnosis of thymus persistents). Both methods (CT and MRI) confirmed high sensitivity and correctly identified patterns of the thymus. CT findings mostly revealed soft tissue mass or fat tissue mass with linear or nodular areas of higher density. MRI usually showed areas of low signal intensity in T1 and PD, while in T2 weighted images the signal was slightly less intensive. T1 and T2 Turbo Flash Breath Hold sequences showed to be very useful in thymic imaging with possibility of capsular display. Radiological findings were confirmed intra-operatively in 12 patients with myasthenia gravis (11 patients with thymus persistents and one patient with thymoma).

CT and MRI are very reliable complementary radiological diagnostic methods for thymic imaging. CT has a better spotial resolutian and provides easier identification of calcifications. MRI clearly differentiates the glandular tissue islets, especially inside the fat tissue and the thymic capsule. Although MRI is more expensive and takes longer time, it is without ionizing radiation, and as such harmless.

Key words: thymus, myasthenia gravis, magnetic resonance imaging (MRI), computed tomography (CT).

АНУ ВіН АНУ БиХ

Literatura

1. **Ivanišević V, Jovičić A.:** *Myasthenia gravis,* Vojnosanit Pregl 1986; 43 (5): 378 - 385.
2. **Magdić B, Jovičić A.:** *Lambert-Eaton sindrom,* Vojnosanit Pregl 1984; 41 (2): 130 - 132.
3. **Tregnaghi A, De Candia A, Calderone M, et al.:** *L' imaging del timo nella miasthenia grave (Tomografia Commputerizzata e Rezonanza Magnetica),* Radiol Med 1995; 90: 404 - 409.
4. **Brenčić E.:** *Veliki neinvazivni timom - Prikaz primera,* Radiol Iugosl 1986; 20 (4): 335 - 337.
5. **Laurent F, Parrents M, Jougon J, et al.:** *Mediastinal masses,* Eur Radiol 1999, 9 (Suppl. 2): 115 - 124.
6. **Laurent F, Latrabe V, Lecesne R, et al.:** *Mediastinal masses: diagnostic approach,* Eur Radiol 1998; 8 (7): 1148 - 1159.
7. **Drevelegas A, Pilavaki M, Hourmouzi D, et al.:** *Imaging of thymoma: Radiologic-histologic correlation,* 11th European congress of Radiology, Book of abstracts, Vienna, Austria, 1999: S 84.

8. **Laurent F, Drouillard J, Joullie M, et al.:** *Tumeurs du mediastin: comparaison de la TDM et de l'IRM pour la diagnostic de nature et d'extension,* Rev Im Med 1990; 2: 693 - 701.
9. **Damascelli B, Spreafico C, Marchiano A, Tatonetti ML.:** *Basic concepts in diagnostic imaging,* New York, Raven Press, 1991: 143.
10. **Wegener OH.:** *Ganzkorper-computer tomographie,* Berlin, Blacwell-Wiss, - Verl, 1992; 144: 154 - 155.
11. **Coulomb M.:** *L'apport de l'imagerie a l'evaluation pre-chirurgicale des thimomes,* 17e Congres International de Radiologie, Livre des Resumes, Paris, France, 1989: 54.
12. **Koops W.:** *MRI Compendium 1990,* Rotterdam, Philips Medical Systems, 1990: 81.
13. **Fritzsche PJ, Stark DD.:** *MRI of the Body,* New York, Raven Press, 1993: 9.
14. **Eisenberg RL, Margulis AR.:** *Radiology,* Philadelphia - New York, Lippincot-Raven, 1996: 285.
15. **Hahn D.:** *Mediastinal masses: Comparison of CT and MRI. European congress of Radiology,* Book of abstracts, Vienna, Austria, 1991: S1.
16. **Iula G, Maraziti A, Mangoni ML, et al.:** *Preoperative staging of thymic neoplasm,* 10th European congress of Radiology, Book of abstracts,Vienna, Austria, 1997: S 354.
17. **Geer G, Webb WR, Gamsu G.:** *Normal Thymus: Assesment with MRI and CT,* Radiology, 1986; 158: 313-317.

АНУ ВіН АНУ БиХ

Retrospektivno-prospektivna analiza primjene antimikrobika na hirurškom odjelu kroz analizu cijene i djelotvornosti (CEA) antimikrobika

Sabira Hadžović[1)], Irfan Zulić[2)], Abdulah Nakaš[3)], Begler Begović[4)]

Istraživanje je izvršeno na Farmaceutskom fakultetu Univerziteta u Sarajevu
Osoba zadužena za korespondenciju: Begler Begović[4].

Institucije koje su pomogle istraživanje:

- *Otvoreno društvo Soroš za Bosnu i Hercegovinu*
- *Institut za farmakologiju, kliničku farmakologiju i toksikologiju, Medicinski fakultet Univerziteta u Sarajevu*
- *Odjeljenje abdominalne i opšte hirurgije, Opća kantonalna bolnica*

Sažetak.

Uvod: U našoj studiji istraživali smo povezanost između cijene i djelotvornosti antimikrobika koji se primjenjuju na hirurškom odjelu. Na osnovu provedenih analiza željeli smo da napravimo vlastite zaključke o vrijednostima ovog modela analize u određenom periodu.

Materijal i metoda: Studija se sastojala iz dva dijela: retrospektivnog (n=60) i prospektivnog (n=60). U periodu od jedne godine mi smo istraživali cijenu liječenja (farmakoterapija) na hirurškom odjelu. Analizirali smo primijenjene lijekove (prosječna dnevna doza) i izračunali smo potrošnju lijekova na osnovu definisane dnevne doze (DDD) kao i ukupnu cijenu primijenjene farmakoterapije. U prospektivnom dijelu istraživanja primijenili smo preporuke savremenih terapijskih vodiča u određenim indikacijama - terapija infekcija i hirurška profilaksa. Analiza primijenjene terapije rađena je u statističkim programima SigmaStat 2.03 i Excel 2000 i na osnovu komparativne analize retrospektivnog i prospektivnog perioda istraživali smo efekat primjene farmakoterapijskih vodiča na smanjenje ukupne cijene koštanja farmakoterapije.

Rezultati: Naši rezultati pokazali su da je prosječna razlika između cijena primijenjenih lijekova u toku jednog bolničkog dana (BO dan) manja za 2,756

1) Farmaceutski fakultet Univerziteta u Sarajevu

2) Institut za farmakologiju, kliničku farmakologiju i toksikologiju, Medicinski fakultet Univerziteta u Sarajevu

3) Odjeljenje abdominalne i opšte hirurgije, Opća kantonalna bolnica

4) Institut za kliničku farmakologiju, Klinički Centar Univerziteta u Sarajevu

KM (smanjenje za 23,5%) u prospektivnom dijelu studije. U prospektivnom dijelu studije dokazali smo da primjenom savremenih preporuka o racionalnoj farmakoterapiji možemo smanjiti cijenu liječenja.

Zaključak: Različite farmakoekonemske metode analize primjene lijekova sa kontinuiranim praćenjem savremenih farmakoterapijskih trendova u sklopu terapijskih vodiča mogu nam pomoći da uskladimo potrebe bolesnika za pravilnim načinima liječenja i mogućnosti društva u izdvajanju sredstava za farmakoterapiju.

Ključne riječi: farmakoekonomija, definisana dnevna doza, cijena, infekcija, hirurška profilaksa

Uvod

U našoj studiji istraživali smo povezanost između cijene i djelotvornosti antimikrobika (1,2,3) koji se primjenjuju na hirurškom odjelu. Na osnovu provedenih analiza željeli smo da napravimo vlastite zaključke o vrijednostima ovog modela analize u određenom periodu.

Praćenjem trenutne situacije u svijetu o potrošnji lijekova procijenili smo da je najbolja metoda analize potrošnje lijekova analiza po definisanim dnevnim dozama lijeka koju preporučuje Svjetska zdravstvena organizacija (4). Definisana dnevna doza je dogovorno utvrđena količina lijeka koja se najčešće koristi za najčešće indikacije.

Može se objasniti i kao prosječna dnevna doza održavanja terapije za lijek propisan odrasloj osobi za posmatranu indikaciju prema ATC/DDD klasifikaciji. DDD je kao statistička jedinica neovisna od cijene, proizvođača, veličine pakovanja, farmaceutskog oblika lijeka ili dužine liječenja. Da bi se što bolje prikazali rezultati dobijeni analizom namjerno je urađena analiza primijenjenih lijekova po generičkom imenu lijeka, zaštićenom imenu lijeka, obliku lijeka, prosječnoj dnevnoj dozi koja je primjenjivana u periodu liječenja i DDD koju preporučuje Svjetska zdravstvena organizacija (WHO).

Ciljevi ovog ispitivanja su bili:

1. Uspostaviti potpuni nadzor nad potrošnjom lijekova u bolnici, na hirurškom odjeljenju;
2. Izučavati i pratiti nove trendove u korištenju lijekova i uspostaviti farmakoinformatički sistem za lijekove;
3. Ispitati opravdanost kombinovane terapije i stvarne terapeutske efekte u korelaciji sa racionalnom potrošnjom lijekova u cilju poboljšanja zdravlja i kvaliteta života pacijenata;
4. Smanjiti troškove za antimikrobike i poboljšati izbor antimikrobika u bolnici;
5. Omogućiti planiranje potreba pojedinih antimikrobika za određene infekcije u pojedinim vremenskim intervalima;
6. Racionalizirati troškove terapije;
7. Formirati bolničke komisije za lijekove i bolničke liste lijekova;

8. Na osnovu provedenog istraživanja izraditi model koji će biti prihvatljiv i adaptibilan za druge lijekove koji se koriste u bolničkoj terapiji.

Indikacije na osnovu kojih su urađene analize retrospektivnog i prospektivnog dijela studije su nabrojane u tabeli 1 :

Tabela 1: *Indikacije za primjenu antimikrobika*

Redni broj	Hirurške discipline
1.	Prevencija infekcija u hirurgiji
2.	Liječenje latentnih infekcija u hirurgiji
3.	Liječenje manifestnih infekcija u hirurgiji

Materijal i metoda

Studija se sastojala iz dva dijela: retrospektivnog (n=60) i prospektivnog (n=60). U periodu od jedne godine mi smo istraživali cijenu liječenja (farmakoterapija) na hirurškom odjelu. Analizirali smo primijenjene lijekove (prosječna dnevna doza) i izračunali potrošnju lijekova na osnovu definisane dnevne doze (DDD) kao i ukupnu cijenu primijenjene farmakoterapije.

U prospektivnom dijelu istraživanja primijenili smo preporuke savremenih terapijskih vodiča u određenim indikacijama - terapija infekcija i hirurška profilaksa (5). Analiza primijenjene terapije rađena je u statističkim programima SigmaStat 2.03 i Excel 2000 i na osnovu komparativne analize retrospektivnog i prospektivnog perioda istraživali smo efekat primjene farmakoterapijskih vodiča na smanjenje ukupne cijene koštanja farmakoterapije.

Etički komitet Medicinskog fakulteta u Sarajevu procijenio je etičke aspekte protokola studije i dao odobrenje za provođenje studije.

Po navedenim indikacijama u retrospektivnom dijelu studije obrađena je primjena terapije antimikrobicima kod 60 bolesniku koji su liječeni na hirurškom odjeljenju u periodu od 01.01.1998. godine do 01. 01. 1999. godine u Državnoj bolnici u Sarajevu.

Na osnovu ovih podataka urađena je analiza primijenjene terapije i ustanovljeno je koji su najčešći primjenjivani antimikrobici i u kojim dozama.

Procijenjeno je da li je primijenjena terapija u skladu sa preporukama najnovijih terapijskih vodiča koji su nam bili dostupni uglavnom iz Velike Britanije (BNF) i Sjedinjenih Američkih Država (terapijski vodiči izrađeni na Univerzitetu Wiskonsin - SAD namijenjeni za profilaksu hirurških infekcija) (5), te preporuke Svjetske zdravstvene organizacije (WHO) (4) u terapiji infektivnih oboljenja. U prospektivni dio studije bili su uključeni bolesnici liječeni na Hirurškom odjeljenju Državne bolnice u Sarajevu. Svim bolesnicima su bili objašnjeni ciljevi i moguće posljedice uključenja u studiju i tek nakon potpisanog informiranog pristanka (u skladu sa pravilima Dobre

kliničke prakse (GCP) i na osnovu kriterija za uključivanje u studiju bolesnici su bili uključeni u studiju.

Kriteriji za uključivanje

- Osobe oba spola, dobi 18 do 70 godina
- Osobe dobrovoljno pristale na istraživanje (informirani pristanak)
- Osobe moraju biti kooperativne i biti na raspolaganju za uključenje u istraživanje
- Osobe oboljele od infektivnih oboljenja izazvanih mikroorganizmima osjetljivim na terapiju antimikrobicima koje imamo na raspolaganju
- Osobe koje pate od bola koji prestaje ili se smanjuje nakon primjene analgetika koje imamo na raspolaganju

Kriteriji za neuključivanje

- Pacijenti koji nisu svjesni, somnolentni i pacijenti u komi
- Maloljetni pacijenti
- Utvrđeni klinički signifikantni hepatički, renalni, gastrointestinalni, kardiovaskularni, pulmonarni, hematološki ili drugi signifikantni akutni ili hronični poremećaji koji su kontraindicirani za primjenu lijekova koje je potrebno primijeniti
- Teška sistemska oboljenja izuzev onkoloških oboljenja
- Preosjetljivost na lijekove ili pomoćne komponente lijekova koje primjenjujemo
- Istovremena primjena drugih antimikrobika ili analgetika
- Pozitivni rezultati HIV1 ili hepatitis testa
- Zloupotreba alkohola, kofeina ili duhana (više od 20 cigareta na dan) ili ovisnost o lijekovima
- Učestvovanje u kliničkom istraživanju unutar 8 sedmica prije početka istraživanja
- Vođenje dijete koja odstupa od uobičajenih navika ishrane

Kriteriji za isključivanje

- Osobe koje ne sarađuju, odnosno ne poštuju preporuke u toku ispitivanja
- Osobe koje su u međuvremenu primjenjivale neki drugi nedozvoljeni lijek
- Osobe u kojih se javila alergija na ispitivani lijek
- Osobe sa novootkrivenom bolešću
- Dokazana neefikasnost lijeka
- Pogoršanje osnovne bolesti

Formular na osnovu kojeg je praćena potrošnja lijekova u toku istraživanja

FAZA II - PROSPEKTIVNA FAZA - 1999 GODINE (30.10. 98. - 30. 10. 99. god.)

PODACI O PACIJENTU	DRŽAVNA BOLNICA SARAJEVO
_____ ime i prezime _____ spol ε M ε F godina rod. Podatke o pacijentu držati u strogoj tajnosti !	ODJELJENJE HIRURGIJA ε INTERNA ε
Datum prijema: _ _ / _ _ / _ _ _ _ (dan, mjesec, godina)	Datum otpusta: _ _ / _ _ / _ _ _ _ (dan, mjesec, godina)

INDIKACIJA ZA PRIMJENU ANTIMIKROBIKA

	Hirurške discipline	ε		Interne discipline	ε
1.	Prevencija infekcija u hirurgiji	ε	1.	Infekcije respiratornog trakta (Bronhitis)	ε
2.	Liječenje latentnih infekcija u hirurgiji	ε	2.	Infekcije urinarnog trakta	ε
3.	Liječenje manifestnih infekcija u hirurgiji	ε	3.		ε

Antimikrobici koje je pacijent primao na odjeljenju u periodu liječenja

Zaštićeno ime	Generičko ime	ATC klasifikacija	Oblik lijeka	Doziranje	Put primjene	Ukupno
1.		/ / / /				
2.		/ / / /				
3.		/ / / /				
4.		/ / / /				
5.		/ / / /				
6.		/ / / /				
7.		/ / / /				
8.		/ / / /				

Formular ispunio: _____ (ime i prezime) Potpis : _____ Datum: _ _ / _ _ / _ _ _ _ (dan, mjesec, godina)	Formular analizirao: _____ (ime i prezime) Potpis : _____ Datum: _ _ / _ _ / _ _ _ _ (dan, mjesec, godina)

U određeni formular upisivani su podaci koji su nam bili neophodni za provođenje studije. Formular je sadržavao jedan niz tabela namijenjenih za unošenje podataka o bolesniku, bolesti i primijenjenoj terapiji u toku istraživanja.

Studiju su proveli ljekari i medicinske sestre zaposleni na Hirurškom odjeljenju Opće kantonalne bolnice u Sarajevu po preporukama kliničkog farmakologa i farmaceutskog informatičara u dogovoru sa ranije formiranim odborom studije.

U prospektivnom dijelu obrađeni su podaci dobijeni iz primjene antimikrobika u navedenim indikacijama na 60 bolesnika koji su dobrovoljno pristali da učestvuju u ovom istraživanju.

Rezultati:

Rezultati retrospektivne analize primjene antimikrobika u periodu od 01. 01. 1998. do 01. 01. 1999. godine u hirurškom i internom odjeljenju Državne bolnice u Sarajevu obrađeni su tabelarno i u obliku grafikona, izračunata je prosječna dnevna doza svih primijenjenih lijekova na osnovu ukupne primjene lijekova i broja dana liječenja u Državnoj bolnici u Sarajevu. Na osnovu dobijenih podataka dobijene su informacije o najčešće primjenjivanim antimikrobicima. Dobijene informacije su upoređivane sa preporukama iz najnovijih terapijskih vodiča i na osnovu ovoga procijenjeno je da li je potrebno mijenjati određene stavove u terapiji infektivnih oboljenja i u terapiji bola.

U prospektivnom dijelu studije u periodu od 6 mjeseci obrađeni su podaci dobijeni od 60 bolesnika liječenih u Općoj kantonalnoj bolnici u Sarajevu koji su zbog osnovnog oboljenja morali da primaju terapiju antimikrobicima.

Dobijeni rezultati iz retrospektivnog i prospektivnog dijela studije upoređivani su (tab. 2-5) i obrađeni grafički kao što je prikazano na kraju dokumenta.

Analiza primjene lijekova je izražena u DDD (Definisanim dnevnim dozama) koje je preporučila Svjetska zdravstvena organizacija (WHO).

Analiza je rađena u kompjuterskom programu iz paketa Microsoft Office 2000 Excel i u statističkom programu SigmaStat 2.03, svi rezultati su predstavljeni tabelarno i grafički, imena lijekova navedena su sa generičkim nazivom a i sa njihovim zaštićenim (komercijalnim) imenom da bismo mogli da primijetimo osjetljivost provedene analize (ovaj podatak je važan radi dalje analize ukupne potrošnje određenih sredstava za lijekove).

Naši rezultati pokazali su da je prosječna razlika između cijena primijenjenih lijekova u toku jednog bolničkog dana (BO dan) manja za 2,756 KM (smanjenje za 23,5%) u prospektivnom dijelu studije. Dokazali smo da primjenom savremenih preporuka o racionalnoj farmakoterapiji možemo smanjiti cijenu liječenja.

Tabela 2: *Analiza primjene antimikrobika u retrospektivnom dijelu studije, analiza je izražena u Definisanim dnevnim dozama*

Antimikrobik generičko ime	Ukupna količina primjenjenog lijeka	Ukupan broj dana liječenja	Prosječna dnevna doza	DDD preporuka WHO
Ampicillin	910400 mg	184	3393,8 mg	2000 mg
Cefazolin	141000 mg	36	3916,7 mg	3000 mg
Ceftazidim	15000 mg	5	3000 mg	6000 mg
Ciprofloksacin	48700 mg	62	785,5 mg	500 mg
Gentamicin	49440 mg	310	159,5 mg	240 mg
Kloksacilin	28000 mg	7	4000 mg	2000 mg
Metronidazol	131500 mg	90	1461,1 mg	1500 mg
Penicillini	22 400 000 i.u.	7	3 200 000 i.u.	3 600 000 i.u.

Tabela 3: *Analiza primjene antimikrobika po zaštićenom imenu u prospektivnom dijelu studije sa DDD koju preporučuje WHO*

Antimikrobik generičko ime	Ukupna količina primjenjenog lijeka	Ukupan broj dana liječenja	Prosječna dnevna doza	DDD preporuka WHO
Amoksicillin	90000 mg	60	1500 mg	1000 mg
Ampicillin	240000 mg	64	3750 mg	2000 mg
Cefaleksin	16000 mg	8	2000 mg	2000 mg
Ceftazidim	36000 mg	12	3000 mg	6000 mg
Ciprofloxacin	67800 mg	105	645,7 mg	500 mg
Gentamicin	22820 mg	117	195 mg	240 mg
Klindamicin	4800 mg	8	600 mg	600 mg
Metronidazol	33000 mg	22	1500 mg	1500 mg

Tabela 4: *Cijene lijekova u retrospektivnom dijelu studije (Cijena doze, pakovanja i ukupna cijena farmakoterapije)*

Antimikrobik generičko ime	Ukupan broj dana liječenja	Cijena jedne doze lijeka (KM)	Broj DDD	Cijena jedne DDD	Ukupna cijena
Ampicillin	184	0,39	455,2	1,56	710,112
Cefazolin	36	7,35	47	22,05	1036,35
Ceftazidim	5	21.45	2,5	64,35	160,875
Ciprofloksacin	62	4,4	97,4	20,6	2006,44
Gentamicin	310	1,83	206	5,46	1124,76
Kloksacilin	7	6,13	18,7	9,2	171,7
Metronidazol	90	0,53	81	33	2673
Penicillini	7	0,42	6,222	2,52	15,68
Ukupno	701				8217,13

Tabela 5: *Cijene lijekova u prospektivnom dijelu studije (Cijena doze, pakovanja i ukupna cijena farmakoterapije)*

Antimikrobik generičko ime	Ukupan broj dana liječenja	Cijena jedne doze lijeka (KM)	Broj DDD	Cijena jedne DDD	Ukupna cijena
Amoksicillin	60	0,4	60	1,2	72
Ampicillin	64	2,52	120	1,56	187,2
Cefaleksin	8	0,63	8	2,52	20,16
Ceftazidin	12	21,45	12	64,35	772,2
Ciprofloxacin	105	4,4	57,8	20,6	1190,68
Gentamicin	117	1,83	9,5	5,46	519,15
Klindamicin	8	7,95	8	7,95	63,6
Metronidazol	22	0,33	22	33	726
Ukupno	396				3550,9

Diskusija

Nakon provedene analize retrospektivnog dijela studije u cilju identifikacije koji su lijekovi primjenjivani po navedenim indikacijama primjećena je nedovoljna informisanost ljekara o terapiji koju su primjenjivali u ranijem periodu (6,7).

U periodu analize retrospektivnog dijela studije "osvježili" smo memoriju ljekara i medicinskih sestara koji su bili uključeni u studiju o informacijama o lijekovima i zajedno smo obradili nekoliko najsvježijih terapijskih vodiča koji su nam bili neophodni u provođenju studije (8,9).

Na primjer Terapijski vodič Univerziteta u Wiskonsinu (USA) u profilaksi hirurških infekcija, zatim preporuke British National Formulary (BNF) u terapiji infekcija urinarnog i respiratornog trakta i u dogovoru sa mikrobiologom napravljena je procjena mogućih mikroorganizama koje možemo očekivati u intrahospitalnim infekcijama.

Nakon analize retrospektivnog dijela studije primijećena je neadekvatna primjena aminoglikozidnih antimikrobika (gentamicin) i ljekarima je skrenuta pažnja na taj problem. Naša je procjena bila da su pacijentima primjenjivane male doze gentamicina (160 mg dnevno) i da te doze mogu biti nedovoljne u terapiji infektivnih oboljenja. Preporučeno je da doza gentamicina bude od 3 do 5 mg / kg tjelesne težine/dnevno u zavisnosti od težine oboljenja i od stanja bubrega (funkcija bubrega procjenjivana je na osnovu serumskog kreatinina i klirensa kreatinina).

Također je uočena i neopravdano malo primjena penicilinskih preparata u terapiji infektivnih oboljenja tako da je i na ovaj problem skrenuta pažnja ljekarima.

U prospektivnom dijelu studije na osnovu ranije određenih indikacija ljekari su primjenjivali terapiju u skladu sa protokolom istraživanja i uglavnom je liječenje počinjalo po empirijskim principima na primjer u terapiji urinarnih infekcija do dobijanja antibiograma liječenje smo započinjali sa kombinacijom sulfometoksazol-trimetoprim u trajanju od sedam do deset dana ukoliko se na antibiogramu pokazalo da je mikroorganizam osjetljiv na ovaj lijek.

Efikasnost primjene antimikrobika je procjenjivana na osnovu mjerljivih parametara: pad sedimentacije, pad broja leukocita, smanjenje febrilnosti, poboljšanje općeg stanja i slično.

Neželjeni efekti lijekova praćeni su u prospektivnom dijelu studije na osnovu objektivnih procjena na primjer analiza krvi i urina i nalaza ljekara te na osnovu subjektivne procjene bolesnika. Sva zapažanja o neželjenim efektima lijekova odmah su unesena u ranije određene tabele, od neželjenih efekata lijekova jedino je primijećena pospanost i osjećaj umora u nekih bolesnika koji su istovremeno primali opijatne analgetike.

Na kraju provedenog liječenja bolesnici su pitani da li su zadovoljni provedenom terapijom i da li imaju određenih primjedbi na provedenu terapiju. Bolesnici su u 97% slučajeva bili zadovoljni provedenom terapijom i možemo reći da je suradnja bolesnika u ovoj studiji bila odlična.

Svi dobijeni rezultati mogu se izraziti u obliku grafikona i primjeri za ovaj način su urađeni u programu iz paketa Microsoft Office 2000 - Excel tako da mogu još jasnije pokazati dobijene rezultate nakon urađene analize.

Zaključci

Iz analize se može primijetiti da je ovakav model primjenjiv jer se mogu svi dobijeni rezultati provjeriti u Bolničkoj apoteci i na odjeljenju gdje je pacijent bio liječen te na osnovu navedenog mogu se raditi procjene potrošnje lijekova u narednom periodu za svaki lijek po generičkom imenu, zaštićenom imenu, obliku lijeka i slično. Na osnovu dobijene ukupne količine utrošenih lijekova daljim jednostavnim računskim radnjama dobijamo rezultate u prosječnim dnevnim dozama te i u Definisanim dnevnim dozama (DDD) koje preporučuje WHO.

Različite farmakoekonomske metode analize primjene lijekova sa kontinuiranim praćenjem savremenih farmakoterapijskih trendova u sklopu terapijskih vodiča mogu nam pomoći da uskladimo potrebe bolesnika za pravilnim načinima liječenja i mogućnosti društva u izdvajanju sredstava za farmakoterapiju.

ANU BiH АНУ БиХ

Summary

Introduction: We examined relations between cost and effectiveness using antimicrobials in surgical department in this study. We wanted to make conclusions on variability of this model in the coming period, based on this analysis.

Material and Methods: The study consist of two sections: retrospective one (n=60) and prospective one (n=60). During one year period of time, we have investigated cost of treatment (pharmacotherapy) on surgical department. We made analysis drugs aplied (the average daily dose) and calculated the consumption of drugs on the basis of defined daily dose (DDD) as well as total cost of therapy applied. In prospective section of this study, we have implemented recommendations of modern therapeutical guidelines in the therapy of infections and surgical prophylaxis. Analysis of used therapy we made in statistical programmes SigmaStat 2.03 and Excel 2000. On the basis of comparative analysis retrospective and prospective parts of study we investigated results using pharmacotherapeutics guidelines on lowering totally cost of pharmacotherapy.

Results: Our results showed that average difference between used drugs during of one hospital day lower for 2,765 KM (decrease for 23,5%) in prospective part of study. In prospective part of study witnessed decrease of the average cost of treatment due to adequate application of antimicrobials did lower the total price of treatment of patients at this department.

Conclusion: Difference pharmacoeconomics methods of analyses using of drugs with continuously monitoring of modern pharmacotherapeutics trends in composite of therapeutic guidelines can help us to harmonize needs of patients toward straight manners of treatment and possibility of society in financial support of pharmacotherapy.

Key words: pharmacoeconomy, defined daily dose, cost, infection, surgical prophylaxis.

Literatura

1. **Mickey C. Smith:** *Studies in Pharmaceutical Economics,* Pharmaceutical Products Press, an imprint of The Haworth Press, 1996, 12: 184-8.
2. **Le Lorier J.:** *Counting the cost of antibiotic therapy from different perspectives: a major issue for 90s,* Eur Resp Rev, 1994, 4: 3335.
3. **Robert J. Bonk, Ph D:** *Pharmacoeconomics in Perspective, a primer on Research, Techniques and Information, PPP,* New York, London, Oxford, 1999.
4. **WHO (World Health Organization) 1987.** *Conference of experts on the rational use of drugs,* Nairobi: Report on the rational use of drugs. Geneva: WHO.
5. University of Pennsylvania Medical Center Guidelines for Antibiotic Use, Pharmacy and Therapeutics Committee: Suggested Recommendations and Guidelines for Surgical Prophylaxis.
6. **Beard K, Forrester E, Lee A, Burns H, Brodie MJ.:** *Systems and strategies for managing the drugs budget in Glasgow,* BMJ 1998; 317: 1378-1381
7. **Karlsonn G, Johannesson M.:** *The decision rules of cost-effectiveness analysis,* Pharmacoeconomics 1996; 9: 113-120.
8. **Drummond M F, Jefferson T O.:** *Guidelines for authors and peer reviewers of economic submissions to the BMJ,* BMJ 1996; 313: 275-283.
9. **Minshall E M:** *Choosing the right balance of health economics expertize: internal capabilities versus external contract research organizations,* Drug Information Journal, 1997; 31: 865-871.

Neonatalni TSH skrining na kongenitalni hipotireoidizam kao indikator jodnog deficita i njegove kontrole

Husref Tahirović,[1)], Alma Toromanović[2)]

Sažetak. Cilj rada je analiza rezultata neonatalnog TSH skrininga na kongenitalni hipotireoidizam u funkciji procjene jodnog deficita i stepena težine javno zdravstvenog problema koji proizilazi iz njegovog postojanja. Distribucija neonatalnog TSH pokazuje da je od ukupnog broja ispitivane novorođenčadi 11.7% imalo veće, a 88.3% manje vrijednosti TSH od 5 mU/L. Pokazalo se da rezultati neonatalnog TSH i urinarne ekskrecije joda u svim opštinama Tuzlanskog kantona ukazuju na prisustvo blagog, dok rezultati prevalencije gušavosti u šest opština ukazuju na blag, u pet na umjeren i u dvije na težak stepen jodnog deficita. Naši rezultati potvrđuju da je neonatalni TSH skrining na kongenitalni hipotireoidizam koristan, praktičan i senzitivan biološki pokazatelj jodnog deficita i da daje mogućnosti kontinuiranog praćenja efikasnosti jodne suplementacije. Mi sugerišemo implementaciju ovog skrininga u funkciji oba pokazatelja (otkrivanje sporadičnog permanentnog hipotireoidizma i procjena stepena jodnog deficita) na području cijele Bosne i Hercegovine. Pored navedenog, dobijeni rezultati su pokazali da na području Tuzlanskog kantona i dalje egzistira blag stepen jodnog deficita, odnosno da je tekuća jodna profilaksa neadekvatna, tj. da je sadržaj joda u soli nezadovoljavajući.

Ključne riječi: jodni deficit, TSH skrining.

Uvod

Jod pripada grupi mikronutricijenata kojih u čovječijem tijelu ima u vrlo malim količinama (10 do 20 mg). Neophodan je za sintezu tireoidnih hormona koji su presudni za metabolizam gotovo svih ćelija u organizmu i koji imaju značajno učešće u procesima ranog rasta i razvoja većine organa. Posebno su značajni za razvoj mozga u fetalnom i ranom postnatalnom životu (1). Jod se unosi u organizam hranom i vodom. Unos je varijabilan i zavisi od mnogih faktora (dob, navike u ishrani, područje u kojem osoba živi i dr.). Kod odraslog organizma kreće se ≤ 10 μg dnevno u oblastima sa naglašenim jodnim deficitom, pa čak i do nekoliko grama kod osoba koje ga uzimaju kao lijek za ekspektoraciju (1 do 3 g dnevno) (2).

[1)] Klinika za dječije bolesti u Tuzli

[2)] Univerzitetski klinički centar Tuzla

Preporučene količine joda u prehrani su: 50 μg/dan u djece od 0 do 12 mjeseci, 90 μg/dan od 1 do 6 godina, 120 μg/dan od 7 do 12 godina, 150 μg/dan u toku adolescencije i odrasle dobi i 200 μg/dan u toku trudnoće i laktacije (3). Metaboličke studije, urađene u područjima Evrope sa blagim jodnim deficitom, ukazuju na to da dijetalne preporuke treba da budu povećane na 90 μg/dan u toku prve godine života (3). Za normalnu sintezu tireoidnih hormona potrebno je oko 150 μg joda dnevno. U slučaju da je dnevni unos joda manji od 50 μg, tireoidna žlijezda ne može obezbijediti normalnu sintezu ovih hormona i organizam ulazi u hipotireoidno stanje.

Kao rezultat jodnog deficita i umanjene sinteze hormona štitaste žlijezde razvija se niz patoloških stanja, danas poznatih kao jod deficitarni poremećaji (JDP) (4). Oni se javljaju u svim životnim dobima, počev od fetalnog do dobi odrasle osobe.

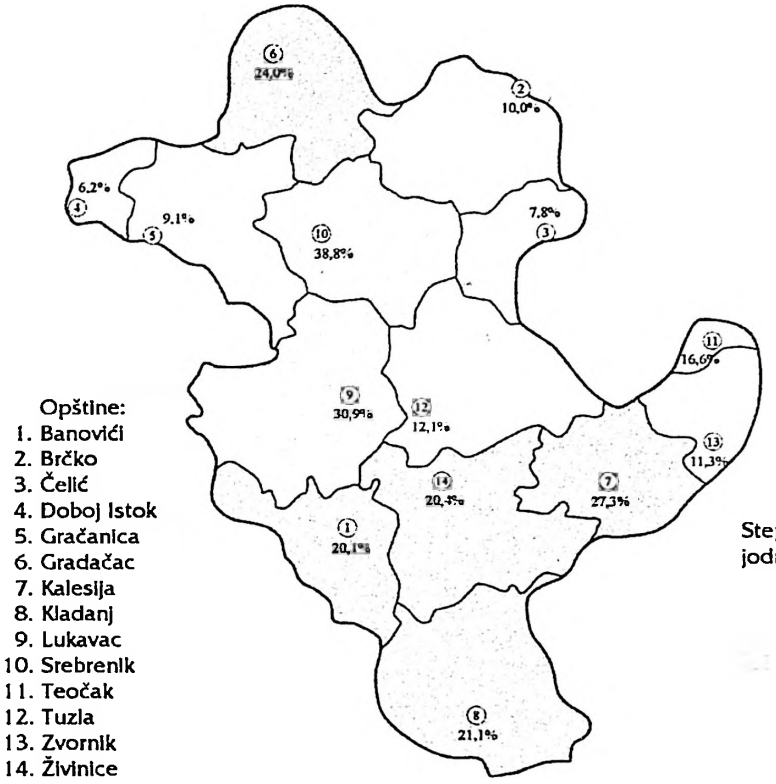
Istraživanja koja su rađena u Bosni i Hercegovini (5,6), ukazuju da je, na osnovu prevalencije gušavosti i urinarne ekskrecije joda, na njenim prostorima prisutan blag do umjeren stepen jodnog deficita (slika 1).

Svjetska zdravstvena organizacija, UNICEF i Internacionalno vijeće za kontrolu jod deficitarnih poremećja 1994.godine preporučili su, pored do tada već poznatih kriterija i indikatora za procjenu JDP (7) da se i rezultati neonatalnog TSH koriste za evaluaciju prevalencije i ocjenu stepena javno zdravstvenog problema JDP. Prema tim preporukama, vrijednosti TSH veće od 5 mU/L (kapilarna krv) u više od 3% novorođenčadi ukazuju na postojanje jodnog deficita u ispitivanom području, dok veličina procenta ukazuje na stepen težine javno zdravstvenog problema (tabela 1).

Tabela 1. *Pokazatelji stepena težine javno zdravstvenog problema jod deficitarnih poremećaja*

Pokazatelj	Ciljna populacija	Stepen težine javno zdravstvenog problema		
		Blag	Umjeren	Težak
TSH > 5 mU/L (%)	Novorođenčad	3.0-19.9	20. 0-39.9	$\geq$ 40. 0
Prevalencija strume (%)	Školska djeca	5.0-19.9	20. 0-29.9	$\geq$ 30. 0
Učestalost volumena štitnjače > 97. percentila mjeren UZ *	Školska djeca	5.0-19.9	20. 0-29.9	$\geq$ 30. 0
Medijan nivoa joda u urinu (μg/L)	Školska djeca	50. 0-99.0	20. 0-49.0	< 20. 0
Medijan Tg (μg/ml) seruma	Djeca i odrasli	10. 0-19.9	20. 0-39.9	$\geq$ 40. 0

* UZ=ultrazvuk



Slika 1.

Stepen težine jodnog deficita u opštinama Tuzlanskog kantona na temelju prevalencije strume u školske djece

ANU BiH АНУ БиХ

Na Klinici za dječije bolesti u Tuzli, u sastavu Odjeljenja za endokrinologiju i bolesti metabolizma, od 2000. godine radi Laboratorij za otkrivanje urođenih metaboličkih bolesti. Od njegovog osnivanja implementiran je Program neonatalnog TSH skrininga na kongenitalni hipotireoidizam za područje Tuzlanskog, Bosansko-podrinjskog, Srednjobosanskog i dijelom Hercegovačko-neretvanjskog i Zapadnohercegovačkog kantona.

Cilj rada je bio da se analiziraju rezultati neonatalnog TSH skrininga na području Tuzlanskog kantona u funkciji procjene jodnog deficita i stepena težine javno zdravstvenog problema koji proizilazi iz njegovog postojanja.

Materijal i metode

Posmatrano područje

Tuzlanski kanton je teritorijalna jedinica Federacije Bosne i Hercegovine sa 538.376 stanovnika i površinom od 2668 km. Administrativno je podijeljen na 14 opština. Prema posljednjim ispitivanjima, koja su urađena u prvoj polovini 1999.godine prevalencija gušavosti iznosi 19.1% (18.1 prvog i 1.1% drugog stepena), a srednja vrijednost urinarne ekskrecije joda, izražena kao medijan, 71.0 μg/L (od 2 do 182 μg/L). Najniža učestalost gušavosti (6.2%), zabilježena je u opštini Doboj Istok, a najviša (38.8%) u opštini Srebrenik (slika 1) (6).

Materijal

Za istraživanje je korištena kompjuterska baza podataka neonatalnog TSH skrininga Laboratorija za otkrivanje urođenih metaboličkih bolesti pri Klinici za dječije bolesti u Tuzli za područje Tuzlanskog kantona. Posmatran je period od 1.1.2000. do 31.12. 2000. godine. Vrijednost TSH u navedenom periodu utvrđena je u 5124 novorođenčeta. Podaci su analizirani ukupno za pomenuto područje i pojedinačno za svaku opštinu. U odnosu na ukupan broj živorođene djece (8), stopa pokrivenosti novorođenčadi neonatalnim TSH skriningom je 93.6%.

Metode

Uzorak pune krvi dobijen je nakon laganog uboda sterilne lancete u zagrijanu kožu na sredini pete novorođenčeta. Uziman je na filter papir između 3. i 5. dana života, a zatim je poštom dostavljan u Laboratorij za otkrivanje urođenih metaboličkih bolesti pri Klinici za dječije bolesti u Tuzli.

Neonatalni TSH određivan je fluoroimunometrijskom metodom (DELFIA neonatal hTSH kit, Walllac Oy, Turku, Finland). Kvalitet dobijenih rezultata, pored interne kontrole, podvrgnut je i obaveznoj eksternoj četveromjesečnoj kontroli koja je organizirana preko Udruženja za kliničku hemiju Njemačke (Deutsche Gesellschafts fur Klinische Chemie, Boon, Germany).

Za obradu podataka korištena je ACCESS-ova relaciona baza.

Rezultati

Distribucija vrijednosti neonatalnog TSH pokazuje da je od ukupnog broja ispitivane novorođenčečadi, 11.7% imalo veće, a 88.3% manje vrijednosti od 5 mU/L (tabela 2).

Tabela 2. *Distribucija neonatalnog TSH u odnosu na graničnu vrijednost za procjenu javno zdravstvenog problema jod deficitarnih poremećaja*

Područje istraživanja	Ukupan broj uzoraka	Vrijednosti neonatalnog TSH			
		< 5 mU/L		> 5 mU/L	
		n	%	n	%
Tuzlanski kanton	5124	4527	88.3	597	11.7

Tabela 3. *Učestalost vrijednosti neonatalnog TSH > 5 mU/L u opštinama Tuzlanskog kantona.*

Opština	Broj ispitanika	Neonatalni TSH > 5 mU/L	
		n	%
Banovići	270	27	10. 0
Čelić	37	4	10. 8
Doboj Istok	80	9	11.2
Gračanica	581	58	9.9
Gradačac	507	50	9.9
Kalesija	370	43	11.6
Kladanj	161	19	11.8
Lukavac	430	40	9.3
Srebrenik	449	80	17.8
Teočak	87	6	6.9
Tuzla	1328	165	12.4
Sapna	159	26	16.3
Živinice	665	70	10.5

ANU BiH АНУ БиХ

U tabeli 3 prikazan je broj ispitanika i učestalost vrijednosti neonatalnog TSH > 5 mU/L pojedinačno za svaku opštinu Tuzlanskog kantona. Najniža učestalost (6.9%) nađena je u opštini Teočak, a najviša (17.8%) u opštini Srebrenik.

Poređenje rezultata neonatalnog TSH, prevalencije gušavosti i urinarne ekskrecije joda u opštinama Tuzlanskog kantona prikazano je u tabeli 4. Uočljivo je da rezultati neonatalnog TSH i urinarne ekskrecije joda u svim opštinama ukazuju na blagi stepena jodnog deficita. Međutim, rezultati prevalencije gušavosti u šest opština ukazuju na blag, u pet na umjeren i u dvije na težak stepen jodnog deficita.

Tabela 4. *Učestalost neonatalnog TSH > 5 mU/L, prevalencija gušavosti i medijan urinarne ekskrecije joda u opštinama Tuzlanskog kantona*

Opština	Učestalost neonatalnog TSH > 5 mU/L	Prevalencija gušavosti (%)*	Medijan urinarne ekskrecije joda (μg/L)*
Banovići	10.0	20.1^b	54.5
Čelić	10.8	7.8^a	59.0
Doboj Istok	11.2	6.2^a	88.0
Gračanica	9.9	9.1^a	77.0
Gradačac	9.9	24.0^b	83.0
Kalesija	11.6	27.3^b	51.5
Kladanj	11.8	21.1^b	53.0
Lukavac	9.3	30.9^c	77.5
Srebrenik	17.8	38.8^c	63.0
Teočak	6.9	16.6^a	59.0
Tuzla	12. 4	12.1^a	88.0
Sapna	16.3	11.3^a	59.0
Živinice	10.5	$20.\ 4^b$	68.0

* Toromanović, 2001. godine.

Stepen jodnog deficita: *a* blag, *b* umjeren i *c* težak.

Diskusija

Jod je osnovni supstrat za sintezu tireoidnih hormona. Njegov nedostatak umanjiće njihovu sintezu, a ako se to dogodi u toku kritične faze razvoja centralnog nervnog sistema, doći će do intelektualnih i neuroloških poremećaja (4). Identifikacija i karakteristike jodnog deficita određenog područja u većini dosadašnjih studija uglavnom su se zasnivale na procjeni prevalencije gušavosti i urinarne ekskrecije joda.

Mada je gušavost najčešće viđen pokazatelj JDP, ona je samo "vrh sante leda" niza abnormalnosti, među kojima su umanjen kvocijent intelegencije, povećanje fetalne i dojenačke smrtnosti, kongenitalne anomalije i usporen rast (9). Sada se zna da mnogi od navedenih poremećaja mogu nastati bez pojave gušavosti (10,11).

Sekrecija TSH iz hipofize rezultat je stimulacije tireotropnog rilizing-hormona hipotalamusa i negativnog fidbek-mehanizma perifernih koncentracija tiroksina i trijodtironina. Niske koncentracije ovih hormona, nastale usljed insuficijencije štitaste žlijezde, ili zbog nedostatka joda u ishrani, vode ka povećanju serumskih koncentracija TSH. Integritet i mehanizam navedene osovine dokumentovan je u fetusa već u dvanestoj sedmici gestacije (12).

Analizirani rezultati neonatalnog TSH skrininga na kongenitalni hipotireoidizam, u funkciji evaluacije stepena jodnog deficita i procjene efikasnosti tekućeg programa jodne suplementacije na području Tuzlanskog kantona, prema preporučenim epidemiološkim kriterijima (7), ukazuju na to da je na pomenutom području prisutan blag jodni deficit, koji je utvrđen i na osnovu prevalencije gušavosti i urinarne ekskrecije joda u prethodnim istraživanjima (5,6). Ovakav rezultat je i očekivan s obzirom na to da, u periodu između dva istraživanja, nije došlo do promjene sadržaja joda u soli, koja je osnovni izvor joda u ishrani stanovništva pomenutog područja.

Uočljivo je da su rezultati neonatalnog TSH i urinarne ekskrecije joda u svim opštinama u okviru raspona vrijednosti koje ukazuju na postojanje blagog stepena jodnog deficita., što nije slučaj sa rezultatima prevalencije gušavosti. Ona je u samo šest od 13 opština u pomenutoj korelaciji sa vrijednostima neonatalnog TSH. Ovaj podatak potkrepljuje činjenicu da su biološki testovi egzaktniji pokazatelji u procjeni jodnog deficita populacije u odnosu na rezultate prevalencije gušavosti dobivene manuelnom palpacijom štitaste žlijezde (12,13,14).

Naši rezultati potvrđuju da je neonatalni TSH skrining na kongenitalni hipotireoidizam koristan, praktičan i senzitivan biološki pokazatelj jodnog deficita, a kompjuterizovana obrada njegovih rezultata omogućuje kontinuirano praćenje efikasnosti jodne suplementacije. Bez obzira na kolikom području je implementiran neonatalni TSH skrining razlika između troškova i koristi od njegove primjene praktično i ne postoji, kada se njegovi rezultati koriste pored detekcije kongenitalnog permanentnog hipotireoidizma i u funkciji procjene uspješnosti profilakse JDP. Mi sugerišemo implementaciju ovog skrininga u funkciji oba pokazatelja na području cijele Bosne i Hercegovine.

Pored navedenog, dobijeni rezultati su pokazali da na području Tuzlanskog kantona i dalje egzistira blag stepen jodnog deficita, odnosno da je tekuća jodna profilaksa neadekvatna, tj. da je sadržaj joda u soli nezadovoljavajući.

Summary

The objective of this work has been to analyze neonatal TSH results from the congenital hypothyroidism screening program as a monitoring tool in the evaluation of the degree of iodine deficiency and of severity of public health problem. The frequency of neonatal TSH above a cutoff point of 5 mU/L whole blood was 11.7%. Neonatal TSH results from screening program were compared to data of the epidemiological surveys, for goiter prevalence and urinary iodine excretion, carried out on a large sample of school children in the same region. Neonatal TSH data and results of urinary iodine excretion in all communities in Tuzla Canton were related to the mild degree of iodine deficiency, while results of goiter prevalence were related to the mild degree of iodine deficiency in six communities, to the moderate degree in five and to the severe degree in two communities. Our results have been confirmed that neonatal TSH data from the congenital hypothyroidism screening program are useful, practical and sensitive biochemical indicator of a population's iodine status, and can be used for monitoring of iodine suplementation efficiency. Therefore, we suggest the implementation of this screening as a function of both indicators (and detection of permanent sporadic congenital hypothyroidism, both evaluation of the degree of iodine deficiency) in the whole region of Bosnia and Herzegovina. Also, the results indicated that in the region Tuzla Canton there is the mild degree of iodine deficiency and that current iodine prophylaxis is inadequate, namely, salt iodine level is unsatisfactory.

Key words: iodine deficiency, TSH screening.

ANU BiH АНУ БиХ

Literatura

1. **Delange F.:** *Neonatal thyroid screening as a monitoring tool for the control of iodine deficiency.* Acta paediatr suppl 1999;432:21-24.
2. **Karanfilski B.:** *Uloga joda u organizmu.* U: Tahirović H, Karanfilski E, eds. Jodni deficit u Bosni i Hercegovini. Tuzla: Medicinski fakultet 2000:8-16.
3. **Delange F.:** *Podrška eliminaciji jodnog deficita u Evropi: Dostignuća, zamke i plan djelovanja.* U: Tahirović H, Konjhodžić F, ur. Jodni deficit u regionu. Sarajevo: Akademija nauka i umjetnosti Bosne i Hercegovine, 11-23.
4. **Delange F.:** *The Disorders Induced by Iodine deficiency.* Thyroid 1994;4:107-128.
5. **Tahirović H, Toromanović A, Hadžibegić N, Štimljanin d, Konjević R, Budimić Z, Čengić H, Rončević Ž, Denjo e, Huskić J, Hadžimujić I, Moro D, Ivanković A, Dodik N, Hasnabegović S.:** *Assessment of Current Status of Iodine Prophylaxis in Bosnia and Herzegovina Federation.* Journal of Pediatric Endocrinology & Metabolism 2001;14:1139-1144.
6. **Toromanović A.:** *Evaluacija efikasnosti profilakse jod deficitrarnih poremećaja.* (Magistarski rad). Tuzla: Univerzitet u Tuzli, 2001. 85 strana.

7. **Anonimno.:** *Indicators for assessing iodine deficiency disorders and their control through salt iodization.* Document WHO/NUT/94.6., Geneva, 1994, p 1-55.
8. **Ferković V, Sarihodžić M, Pašić A, Mulić M.:** *Struktura stanovništva i vitalno-demografski pokazatelji.* U: Bešlagić Z. ed. Zdrvstveni sistem Tuzlanskog kantona i indikatori zdravlja za 2000. godinu. Tuzla: Zavod za zdravstvenu zaštitu Tuzlanskog kantona 2001:1-20.
9. **Hetzel BS.:** *S. O. S. for a billion the nature and magnitude of the iodine deficiency disorders.* U: Hetzel BS, Pandav CS eds. S. O. S for a Billion: The Conquest of Iodine deficiency Disorders. Delhia, India: Oxford University Press, 1994: 1-26.
10. **Delange F.:** *Relation of thyroid hormones to human brain development.* U: Hetzel BS, Smith RM ed. Fetal Brain Disorders. Recent Apporaches to the problems of mental deficiency North Holland New York: Elsevier 1981: 285-296.
11. **DeLong R.:** *Neurological involvement in iodine deficiency disorders.* U: Hetzel BS, Dunn JY, Stanbury JB eds. The Prevention and Control of Iodine deficiency Disorders. International Council for Control of Iodine deficiency Disorders. Amsterdam Elsevier 1987:235-357.
12. **Burrow GN, Fisher DA, Larsen PR.:** *Maternal and fetal thyroid function.* N Eng J Med 1994; 331:1072-1078.
13. **Rajatanavin R, Unachak K, Winichakoon P, Chailurkit LO, Vilasdechanon N, Tananchai P, Sprinawat S.:** *Neonatal Thyrotropin Profile as an Index for Severity of Iodine deficiency and Surveillance of Iodine Prophylactic Program.* Thyroid 1997;7:595-604.
14. **Costante G, Grasso L, Ludiovico O, Marasco MF, Nocera M, Schifino E, Rivalta L, Capula C, Chirella R, Filetti S, Parlato G.:** *The statistical analysis of neonatal TSH results from congenital hypothyroidism screening programs provides a useful tool for the characterization of moderate iodine deficiency regions.* J Endocrinol Invest 1997; 20:251-256.

ANU BiH

ANU
BiH
АНУ
БиХ

Mjesto i značaj amniocenteze u skriningu visoko rizičnih trudnoća sa prethodno ponavljanim ranim spontanim pobačajima

Amira Pekuša-Redžić[1)]

Sažetak. Spontanim pobačajem se smatra nenamjerni prekid intrauterine trudnoće prije 28 sedmice starosti ploda. Uzroke tih dešavanja često je teško konstatovati. Amniocenteza je jedna od metoda u antenatalnoj dijagnostici koja roditeljima može dati informacije o stanju njihovog ploda, posebno kod rizičnih trudnoća ili ponavljanih ranih spontanih pobačaja.

U ovim istraživanjima je posmatrano 755 slučajeva pacijntica prije rata (1987-1991), koje su tražile genetički savjet i kod 409 slučajeva je urađena amniocenteza, a 480 trudnica koje zbog ratnog stanja (1992-1994) nisu mogle da se obrate za genetičku konsultaciju, pa im je možda neuvjetan način življenja, deficitarna ishrana, a naročito stres uzrokovao nastanak spontanog pobačaja. Rezultati ove studije su konstatovali pozitivni efekat amniocenteze, odnosno genetičkog savjetovanja kod visoko rizičnih trudnoća i ponavljanih ranih spontanih pobačaja.

Ključne riječi: spontani pobačaj, amniocenteza, genetičko savjetovanje, rizična trudnoća.

Uvod

Razvoj određenih disciplina biomedicinskih znanosti, u današnjim uvjetima, upozorava na značaj genetičkih znanja koja omogućavaju pravovremeno otkrivanje složenih genetskih malformacija. Njihovo uspješno prevazilaženje se često postiže analizom: resica chorion frondosuma, plodne vode, krvi ili uzorka tkiva ploda pomoću fetoskopije ili biopsije. Danas se u praksi najviše primjenjuje metoda izučavanja amnionske tečnosti dobivene punkcijom, tj. ranom amniocentezom (AC) kroz prednji trbušni zid od 15 do 19 nedjelja trudnoće, tj. u vrijeme kada je moguć selektivni pobačaj. Kako spontani pobačaji nastupaju mimo želje trudnice to zahtijevaju i detaljno traženje uzroka. Pravi razlozi smetnji u humanoj reprodukciji mogu biti:

[1)] Katedra za medicinsku biologiju sa humanom genetikom Medicinskog fakulteta Univerziteta u Sarajevu

- abnormalnosti materice;
- akutne ili hronične bolesti majke;
- genetičke (genske ili hromosomske) promjene ploda.

Rano prenatalno otkrivanje nasljednih bolesti može pomoći u očuvanju zdravlja čovjeka i u prevenciji nasljednih bolesti koje se sprečavaju negativnim eugeničkim principima.

Materijal i metode rada

Ovim istraživanjem su posmatrane dvije grupe pacijentkinja u Sarajevu, gdje uzorak C obuhvata trudnice koje su se na Ginekološko-akušersku kliniku (1987-1991) obratile za genetičku konsultaciju. Po preporuci ginekologa poduzorak C_1 čine pacijentkinje kod kojih je urađena AC (prema kriterijumima 1 i 2), a poduzorak C_2 pacijentkinje kod kojih nije bilo indikacija za AC (tabela 1). Indikacije za AC su opisane u radovima 3,4,5. Uzorak D obuhvata populaciju svih spontanih pobačaja koji su registrirani na GAK -u i u domovima zdravlja u Sarajevu (1992-1994). U ovoj grupi je bilo gotovo 70% žena koje su već ranije imale rane spontane pobačaje (poduzorak D_1). Ostatak čine pocijentkinje kod kojih je prva trudnoća završila ranim spontanim pobačajem (poduzorak D_2), to su trudnice koje zbog ratnog stanja nisu mogle da se obrate za genetičko savjetovanje i eventualno urade AC.

Rezultati rada

U ovim istraživanjima od ukupnog broja urađenih AC - 409 (poduzorak C_1) i analiziranih kariograma, u 10 slučajeva (2,4%) je konstatovan patološki kariogram. Predloženi arteficijelni abortus partneri su prihvatili (negativni eugenički princip). U ostalim slučajevima kariogram je bio uredan, rođeno je 384 zdravstve djece, a u 4 slučaja (0.98%) je došlo do gubitka plodne vode unutar 14 dana od AC i na kraju do spontanog pobačaja, što se može smatrati kao posljedica AC. Kod još 10 pacijentica (2,4%) kasnije je došlo do spontanog pobačaja koji se ne mogu pripisati hromosomskim anomalijama ploda.

U poduzorku C_2 283 trudnoće su završene rađanjem zdravog djeteta, a u 63 slučaja je došlo do spontanog pobačaja. Kako su to pacijentkinje genetičkog savjetovališta kod kojih nije bilo indikacija za AC, uzroci njihovih spontanih pobačaja su bili različite prirode (nerazvijenost genitalnih organa, nedostatak hormona, virusne i bakterijske infekcije, hiperaktivnost uterusa...), poduzorak C_2 karakteriše i jako povećana frekvencija žena sa kasnim spontanim pobačajima, i prijevremenim porodima u anamnezi, što isključuje hromosomopatije, ali ne i druge uzroke koji dovode do gubitka ploda.

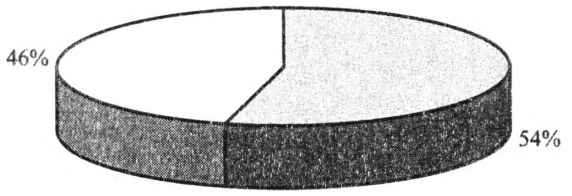
Tabela 1. *Karakteristike posmatranih (pod)uzoraka*

	(Pod)uzorak		*Veličina*
Trudnice koje su se obratile u genetičko savjetovalište (1987-1991)	C_1	Grupa kod koje je indicirana i urađena AC	409
	C_2	Grupa kod koje nije bilo indikacija i nije urađena AC	346
Trudnice koje su imale spontalni pobačaj, a nisu imale mogućnosti za genetičko savjetovanje (ratno stanje) 1992-1994	D_1	Pacijentkinje kod kojih je prvi put nastupio rani spontani pobačaj	145
	D_2	Pacijentkinje koje su imale ponovljeni rani spontani pobačaj	335
Ukupno			*1235*

Tabela 2. *Ishodi trudnoća (aktuelnih i u anamnezi) u posmatranim (pod)uzorcima*

(Pod)uzorak		*Aktuelne trudnoće*	*Trudnoće u anamnezi*
C_1	Živorođenje	384	186
	Arteficijelni pobačaj	10	7
	Spontani pobačaj	10	8
	Gubitak plodove vode	4	3
	Mrtvorođenje	1	1
	Ukupno	409	205
C_2	Živorođenje	283	193
	Spontani pobačaj	63	55
	Ukupno	346	248
D_1	Prvi spontani pobačaj	145	-
D_2	Naredni spontani pobačaj	335	106
Ukupno		***480***	***106***

Trudnice koje su se obratile u genetičko savjetovalište 1987-1991

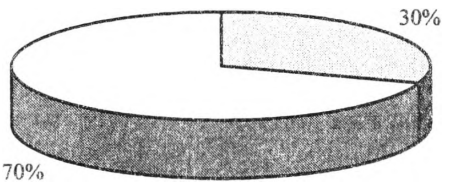


☐C1 Grupa kod koje je indicirana i urađena AC

☐C2 Grupa kod koje nije bilo indikacija i nije urađena AC

Grafikon 1.

Trudnice koje su imale spontani pobačaj, a nisu imale mogućnosti za genetičko savjetovanje (ratno stanje) 1992-1994



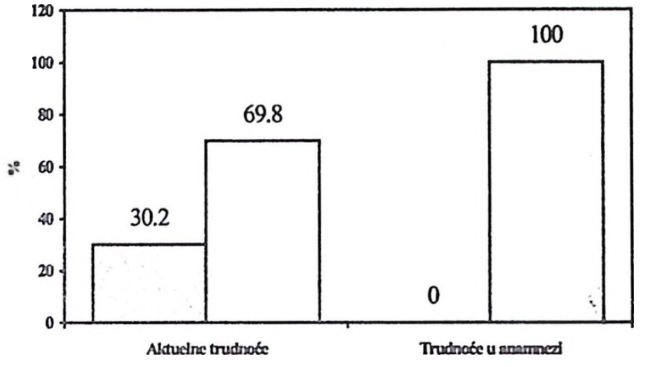
ANU BiH АНУ БиХ

☐D1 Pacijentkinje kod kojih je prvi put nastupio rani spontani pobačaj

☐D2 Pacijentkinje koje su imale ponovljeni rani spontani pobačaj

Grafikon 2.

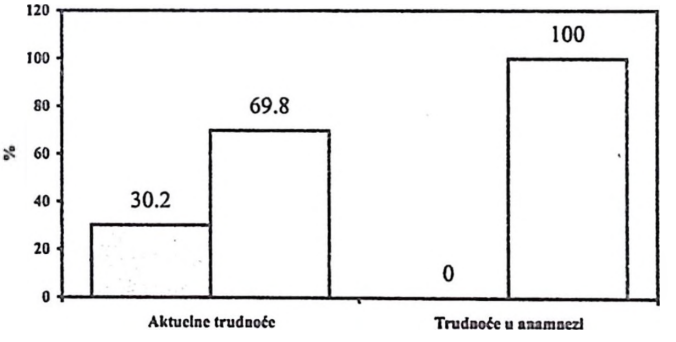
Ishodi trudnoća (aktuelnih i u anamnezi) u posmatranim (pod)uzorcima



☐D1 Prvi spontani pobačaj ☐D2 Naredni spontani pobačaj

Grafikon 3.

Ishodi trudnoća (aktuelnih i u anamnezi) u posmatranim (pod)uzorcima



☐D1 Prvi spontani pobačaj ☐D2 Naredni spontani pobačaj

Grafikon 4.

ANU BiH АНУ БиХ

Uzorak D posmatra sve trudnoće koje su se završile spontanim pobačajem gdje je spoljašnji faktor imao velikog uticaja (ratno stanje) stres-akutni: briga za vlastiti život, stalna životna opasnost i hronični: briga za članove porodice, stalna borba za preživljavanje, neadekvatna ishrana, itd. Genetske abnormalnosti ploda mogu biti posljedica svježe mutacije u jednoj od roditeljskih gameta, nepravilnosti u prvim diobama zigota (posljedični mozaicizam) ili generacijama prisutne obiteljske promjene genoma na genskoj i/ili hromosomskoj razini (tzv. mirni nosioci). Sve te abnormalnosti genoma najčešće se završavaju spontanim pobačajem ili rijeđe rađanjem bolesnog djeteta.

Poduzorak D_1 obuhvata 30% žena kod kojih je prva trudnoća završila ranim spontanim pobačajem što se može tumačiti da je stres možda bio promotor ovih dešavanja. u poduzorku D_2 su se desili ponovljeni rani spontani pobačaji (u anamnezi tih žena je bilo 106 spontanih pobačaja). Sigurno je da je u ovoj grup žena postojao određeni procenat pacijentkinja koje su imale indikaciju za AC, ali koja nije mogla biti urađena iz objektivnih razloga.

Diskusija

Rezultati ovih istraživanja potvrđuju i opće usvojeno stanovište da je opća vjerovatnoća spontanih pobačaja povećana kod trudnica koje su već imale spontane pobačaje (tabela 2). Visok procenat žena sa spontanim pobačajem u anamnezi (u poduzorku C_1 - 8, C_2 - 55, uzorku D - 106) govori i o visoko specifičnom sastavu tih uzoraka. Sigurno je da se znatan dio ovih žena i obratio za medicinsku pomoć u vidu genetičkog savjetovanja zato što su ranije pobacivale. Žene koje zahtijevaju genetičko savjetovanje svakako to čine zbog utvrđenih ili slučajnih genopatija u porodičnoj anamnezi, što stoji u pozitivnoj korelaciji sa povišenom frekvencijom prehtodnih spontanih pobačaja (6,7,8). Prema poznatim relevantnim radovima iz literature (9,10), hromosomopatije su najznačajniji uzrok embrio-fetalnih gubitaka. Svjetska zdravstvena organizacija (11) iznosi podatak da uzrok spontanog pobačaja u 65% slučajeva predstavljaju hromosomske abnormalnosti ploda. Rezultati ovog rada su upoređivani sa rezultatima niza drugih istraživanja (12, 13, 14) i potvrđen je zaključak da se većina pobačaja dešava u ranoj trudnoći, za koje je karakteristična genetička etiologija. Spontani pobačaji u anamnezi mogu se smatrati kao valjan biološki marker, odnosno kao važan momenat za prethodnu procjenu stepena rizika od neuspješne trudnoće. Zato se u rizičnim trudnoćama i preporučuje izvršiti prenatalnu dijagnozu kariotipa ploda.

Zaključci

- Kod trudnica koje su imale ponavljani rani gubitak trudnoće inducirana je AC i genetičko savjetovanje.
- Trudnice koje su imale spontani pobačaj u visokoj trudnoći, također trebaju genetičko savjetovanje gdje treba razmotriti potrebe i korisnost AC u okviru skrininga i prevencije riziko faktora.

- Metod kariotipiziranja stanica plodne vode je put da se trudnica sa rizikom ohrabri i umiri.
- Indikacije za prenatalnu dijagnozu postavlja opstetičar i genetičar. Zahvat RAC izvodi opstetičar pomoću UZ, a odluku o eventualnom prekidu trudnoće uz patološki genotip i očekivani patološki fenotip donose isključivo roditelji uz pomoć etičke komisije.
- Veliki je pozitivni efekat genetičkog savjetovanja, tako da je i konačni ishod visoko rizičnih trudnoća statistički relativno povoljan. Ovaj zaključak nas također obavezuje da biolog - genetičar i ginekolog, kada se radi o visoko rizičnim trudnoćama, moraju timski raditi i imati povratne informacije o ishodu trudnoće i porođaju, što je važno za praćenje kretanja savremene znanosti na prevenciji malformacija, posebno onih vezanih za naslijeđe, s osnovnim ciljem: očuvati ugroženo zdravlje budućeg čovjeka.
- U uzorku D rizik neuspješnih trudnoća najvjerovatnije je povezan sa vanrednim uvjetima življenja u Sarajevu u periodu posmatranja - ratno stanje (1992-1994).

Summary

Aspontaneous abortion is an unintentional interruption of intrauterine pregnancy occurring before the fetus reaches age of 28 weeks. In most cases the cause of spontaneous abortion is difficult to find out. Amniocentesis is a prenatal diagnostic method which can show the condition of the fetus. This is important in the cases where the mother has suffered from early spontaneous abortions or her pregnancy is under risk of them. The research presented here studied 755 cases of the patients who asked for genetic advicee during the period of four years (1987-1991). Amniocentesis was performed in 409 of these cases. The research also considered 480 pregnant women who could not ask for genetic advice due to war in Bosnia. The time period considered here is 1992-1994.It is possible that difficult living conditions, inadequate nutrition and in particular stress could have caused the spontaneous abortions.

The results of this research have shown that amniocentesis or genetic advice in cases of high risk pregnancies and repeated early spontaneous abortions has an overall positive effect.

Key words: spontaneous abortion, amniocentesis, genetic advice, risk pregnancies.

ANU BiH АНУ БиХ

Literatura

1. **Berberović Lj., Redžić A.:** *Krvne grupe ABO sistema u uzorku trudnica sa indikacijama za genetičko savjetovanje.* Radovi ANUBIH, 1996; 26, 119-126.
2. **Redžić A.:** *Rezultati i rizik amniocenteza (analiza 409 slučajeva genetičkog savjetovanja).* Radovi ANUBIH, 1996; 26, 126-133.
3. **Kurjak A., Zergollern-Čupak Lj.:** *Pravo na život i pravo na smrt.* **Kurjak A.:** *Savremena dostignuća antenatalne dijagnostike i neki medicinsko pravni problemi.* Jugoslovenska medicinska naklada, Zagreb, 1982; 9-19.
4. **Lazarević J., Bila S., Radunović N.:** *Savremena antenatalna dijagnostika. Savremena administracija.* Beograd, 1990; 1-190.
5. **Grujić S., Mehmedbašić S., Todorović G., Nikulin B.:** *Rana amniocenteza na ginekološko-akušerskoj klinici u Sarajevu. Dvogodišnje iskustvo.* Medicinski arhiv, 1990; 44, (3-4), 159-161.
6. **Lauritsen J., Jonasson J., Therkelsen A., Lasa F., Lindsten J., Fetersen G.:** *Studies on spontaneous abortion.* Hereditas 71, 1972; 160-163.
7. **Lippman-Hand A.:** *Genetic counseling and Human reproductive loss.* **In Porter H. I., Hook E. B. (eds):** *Human Embryonic and Fetal Death.* - (Proceedings of the Tenth Annual new York State Health Department Birth Defects Symposium). Academic Press, New York-London-Toronto-Sydney-San Francisco, 1980; 299-314.
8. **Thom D. H., Nelson L. M., Vaughan T. L.:** *Spontaneous abortion and subseguent adverse birth outcomes.* American Journal of Obstetrics & Gynecology. 1992; 166 (1 Pt 1), 111-6, Jan.
9. **Carr D. H.:** *Chromosome studes in spontaneous abortions.* Obstetic Gynecological, 1963; 26, 308-326.
10. **Carr D. H.:** *Chromosomal anomalies as a cause of spontaneous abortion.* Amer. J. Obstet. Gynecol, 1967; 97, 283-293.
11. *World Health Organization Spontaneous and induced abortion.* Techical Report Series no 451, Geneva, 1970.
12. **Nelson T., Oakley G. P., Shepard T. H.:** *In Monitoring Birth Defects and Environment.* **Hook E. B., Janerich D. T. and I. H. Porter (Eds.) :** *Academic Press*, New York, 1971, 45-64.
13. **Fantel A. G., Shepard T. H., Vadheim-Roth C. Stephens T. D., Coleman C.:** *Embryonic and fetal phenotypes: Prevalence and other associated factors in a large study of spontaneous abortion. Human Embryonic and Fetal Death.* (Proceedings of the Tenth Annual New York State Health Department Birth Defects Symposium 71 - 87). Academic Press, New York-London-San Francisco, 1980.
14. **Harlap S., Shiono P. H., Ramcharan S.:** *A life table of spontaneous abortions and the effects of age, parity, and other variables. Human Embryonic and Fetal Death.* (Proceedings of the Tenth Annual New York State Health Department Birth Defects Symposium). Academic Press, New York - London - San Francisco - Toronto - Sydney, 1980, 145-158.

Incidence of HIV, HBV and HCV infections detected by PCR method in BiH

Đemo Subašić,[1] Irma Salimović,[1] Rijad Konjhodžić,[1] Amira Pekuša-Redžić[2] and Mensura Šeremet[1]

Apstract.

- Direct monitoring by sensitive nucleic-acid tests would provide data accurately to measure the risk and to assess risk-reduction procedures. We adapted PCR method for investigation the incidence of HIV, hepatitis C virus and hepatitis B virus infections during last two (HBV, HCV) or three years (HIV) in Bosnia and Herzegovina.
- For this PCR testing individual plasma samples were analysed. Virus deoxyribonucleic acids were extracted by QIAamp nucleic acids extraction method. The HCV ribonucleic acid was extracted by High Pure Viral RNA Kit (Roche) also from plasma samples. We detected integrated form of HIV and HBV-viral DNA but in the case of HCV it was RNA from free viral particles present in the blood of patient. For HCV detection an additional reverse transcription step before PCR amplifications was performed. Amplified virus-specific sequences by specific complementary primers were detected by agarose-gel electrophoresis.
- Using this validated methodology routine we checked 184 persons on HIV infection from July 1998. up to the end of 2000. 8 (4.4%) of them were HIV-RNA positive. One of positive persons was a patient from Clinic of Infectious Diseases, other 7 HIV-RNA positive (6 injection drug users and 1 from promiscuity-risk group) were tested on their personal request. During 1999. and 2000 we performed 54 tests for identification HBV infected individuals and found 11 (20.4%) HBV positive persons. 7 of them were patients from Clinic of Gastroenterohaepathology, 1 from Paediatric Clinic and 3 from external medical institution. The HCV tests for the same period included 148 tested persons. 9 (6.1%) of them were HCV-RNA positive. It was 1 patient from Clinic of Infectious Diseases, 1 patient from Institute of Nephrology, 5 patients from Clinic of Gastroenterohaepathology and other 2 patients were from external medical institution. None of PCR-tested persons had HBV/HCV or other dual positivism.
- HIV, HBV and HCV have been the viruses most intensively subjected to PCR analysis. It has been necessary to have an overview of incidence of infectious diseases caused by these viruses for a transition-state country such as BiH. In

[1] Institute for Microbiology, Immunology and Parazitology, Clinical Centre University of Sarajevo, Bosnia and Herzegovina

[2] Medical faculty University of Sarajevo, Bosnia and Herzegovina

consideration of number of our population there is relatively high percentage of HIV, HCV and especially HBV positivism. It would be necessary to realize better transmission control preventing infections by these viruses in BiH. Those are the results of PCR diagnostics without serological investigations.

Introduction

HIV is a retrovirus, a member of the *Lentivirinae* subfamily, which have genes composed of *ribonucleic acid (RNA) molecules.* The outer shell of the virus is known as the *viral envelope.* Embedded in the viral envelope is a complex protein known as env, which consists of an outer protruding cap *glycoprotein* (gp) *120*, and a stem *gp41.* Within the viral envelope is an HIV protein called *p17* (matrix), and within this is the viral core or capsid, which is made of another viral protein *p24* (core antigen). The major elements contained within the viral core are two single strands of HIV RNA, a protein *p7* (nucleocapsid), and three enzyme proteins, *p51* (reverse transcriptase), *p11* (protease) and *p32* (integrase).

Retroviruses, like all viruses, can only replicate within a living host cell because they contain only RNA and they do not contain DNA. In addition, retroviruses use RNA as a template to make DNA. Infection begins when an HIV particle encounters a cell with a surface molecule called CD4. The virus particle uses gp120 to attach itself to the cell membrane and then enters the cell. Within the cell the virus particle releases its RNA, and the enzyme *reverse transcriptase* then converts the viral RNA into DNA. This new HIV DNA then moves into the cell's nucleus where with the help of the enzyme *integrase* it is then inserted into the host cells DNA. Once it is in the cell's genes HIV DNA is called a provirus (Singleton et al., 1993). The HIV provirus is then replicated by the host cell, which can then release new infectious virus particles.

The integrated provirus remains associated with the cellular chromosomal DNA for the life of the infected cell. Further, the integrated provirus can either actively transcribe the genes for the structural proteins of the virus, or, by selective transcription of only the complex array of viral regulatory genes, remain transcriptionally constrained and thereby not release viral particles. The latter condition is frequently referred to as the "latent state" (Cohen et al., 1994). Because proviral DNA is present regardless of the transcriptional state of the cell, early efforts targeted to direct detection of the virus used proviral DNA as template.

Viral hepatitis is a systematic disease primarily involving the liver. HBV, the cause of serum hepatitis, is classified as a *hepadnavirus* (Brooks et al., 1998). HBV establishes chronic infections, especially in those infected as infants; it is a major factor in the eventual development of liver disease and

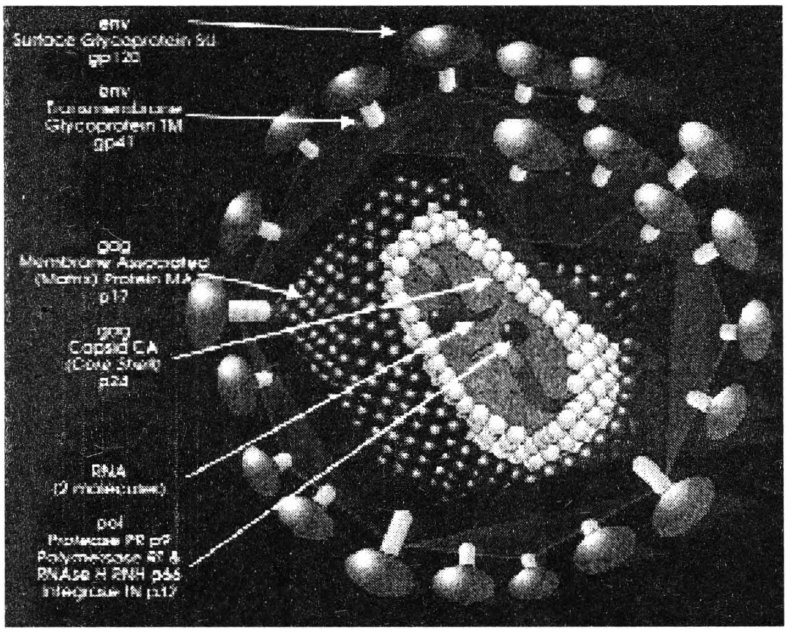


Figure 1. *Complete **HIV** viral particle (structure and components)*

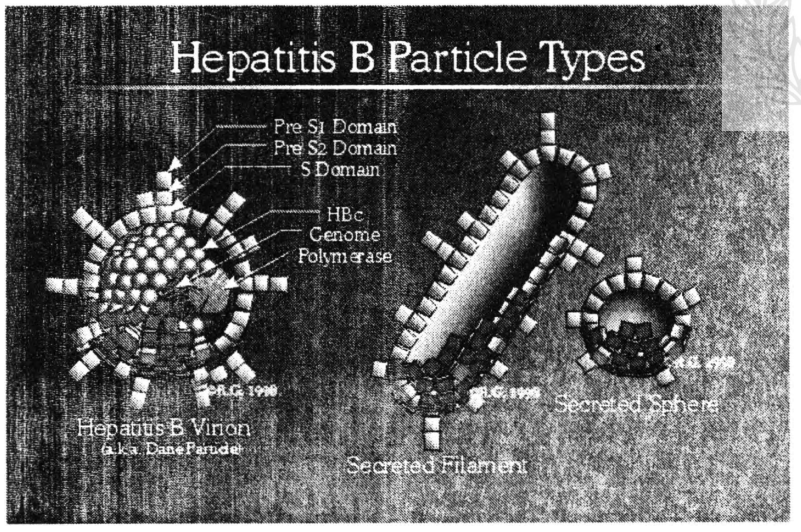


Figure 2. *Hepatitis **B** particle types (Hepatitis **B** virion, secreted filament and secreted sphere)*

ANU BiH АНУ БиХ

hepatocellular carcinoma in those individuals. The viral genome consists of partially double-stranded circular *DNA*, 3200 bp in length. Different HBV isolates share 90-98% nucleotide sequence homology. In ca. 5-10% of individuals infected with HBV, HBsAg persists in the circulation for >6 months, and a carrier state is established which may persist for life. The carrier state may be asymptomatic (latent infection) or symptomatic (with e.g. chronic active hepatitis, cirhosis, and/or HCC-human hepatocellular carcinoma), and is most likely to develop in e.g. perinatally-infected or immunodeficient individuals. In HBV carriers, viral DNA may integrate at one or (apparently random) sites in the host cell genome; the integrated sequences may be complete genomes or subgenomic fragments. Integrated viral DNA may continue to be expressed, resulting in the continued synthesis of e.g. HBsAg; however, in HCC cells virus replication and gene expression appear generally to be absent. Integrated HBV-DNA has been found in the majority of HCC cells examined. The full-length DNA minus strand is complementary to all HBV mRNAs; the positive strand is variable and between 50 and 80% of unit length.

Replication of Hepatitis B Virus: HBV attachement to a receptor on the surface of hepatocytes occurs via a portion of the pre-S region of HBsAg. After uncoating of the virus, unidentified cellular enzymes convert the partially double-stranded viral DNA to *cccDNA (covalently closed circular double-stranded DNA*, in the nucleus. The cccDNA serves as template for the production of all HBV transcripts, including a 3.5-kb pregenome RNA. The pregenome RNA becomes encapsidated by ta packaging signal located near the 5' end of the RNA into newly synthesized core particles, where it serves as template for the HBV *reverse transcriptase* encoded within the polymerase gene. An Rnase H activity of the polymerase removes the RNA template as the negative-strand DNA is being synthesized. Positive-strand DNA synthesis does not proceed to completion within the core, resulting in replicative intermediates consisting of full-length minus-strand DNA plus variable length (20-80%) positive-strand DNA. Core particles containing these DNA replicative intermediates bud from pre-Golgi membranes (acquiring HBsAg in the process) and may either exit the cell or reenter the intracellular infection cycle.

HCV is a positive-stranded *RNA* virus, classified as a *flavivirus*. The genome is 9.5 kb in size and encodes a core protein, two envelope glycoproteins, and several nonstructural proteins (e.g., Ser protease/helicase, RNA-dependent RNA polymerase). The expression of cDNA clones of HCV in yeast led to the development of serologic tests for antibodies to HCV. Most new infections with HCV are subclinical. Over 50% of HCV patients develop chronic hepatitis, and many are at risk of progressing to cirhosis. In some countries, as in Japan, HCV infection often leads to hepatocellular carcinoma.

About 25,000 individuals die annually of chronic liver disease and cirhosis in the USA; HCV appears to be a major contributor to this burden.

HCV displays genomic diversity, with different genotypes predominating in different parts of the world. The virus undergoes sequence variation during chronic infections. This genetic diversity is not correlated with differences in clinical disease.

The diagnosis of HCV infection can be made by qualitatively detecting HCV RNA using gene amplification techniques (e.g., RT-PCR) in serum or plasma of patient within 1-2 weeks after exposure to the virus and weeks before the onset of alanine aminotransferase (ALT) elevations or the appearance of anti-HCV.

Material and methods

I Extraction of genomic DNA (integrated form of viral DNA) from plasma or serum sample - (QIAGEN-QIAamp Blood Mini Kit) - HIV, HBV integrated form

1. 200 μl sample is added to the 20 μl QIAGEN Protease (or Proteinase K) into the 1.5-ml microcentrifuge tube
2. 200 μl Buffer AL is added to the sample and mixed by pulse-vortexing for 15 s.
3. Mix is incubated at 56°C for 10 min
4. Briefly centrifugation the 1.5-ml microcentrifuge tube is performed to remove drops from the inside of the lid.
5. 200 μl ethanol (96-100 %) is added to the sample, and mixed again by pulse-vortexing for 15 s. After mixing, briefly centrifugation the 1.5-ml microcentrifuge tube is performed to remove drops from the inside of the lid.
6. The mixture from step 5 is carefully applied to the QIAamp spin column (in a 2-ml collection tube) and centrifuged at 6500 rpm for 1 min 20 s. The QIAamp spin column is placed in a clean 2-ml collection tube, and the tube containing the filtrate is discarded.
7. 500 μl Buffer AW1 is added to the QIAamp spin column and centrifugation at 6500 for 1 min 20 s is performed. The QIAamp spin column is placed in a clean 2-ml collection tube, and the tube containing the filtrate is discarded.
8. 500 μl Buffer AW2 is added to the QIAamp spin column and centrifugation at 13 000 rpm for 1 min 10 s is performed. The QIAamp spin column is placed in a clean 1.5-ml microcentrifuge tube, and the collection tube containing the filtrate is discarded.
9. For elution of extracted DNA 200 μl Buffer AE or distilled water is added to the QIAamp spin column. Incubation at room temperature for 1 min is performed, and then centrifugation at 6500 rpm for 1 min 10 s.

II Direct purification of viral RNA from serum or plasma with High Pure Viral RNA Kit (Roche) - HCV

1. 200 μl serum or plasma mixed well with 400 μl working solution (binding buffer supplemented with poly(A) carrier RNA).
2. The High Pure filter tube and the collection tube are combined and pipetted the sample in the upper reservoir.
3. Centrifugation for 15 s at 10 000 rpm (ca. 8000 $\times$ g) in a standard table top centrifuge.
4. The flowthrough is discarded and the filter tube is combined with a new collection tube.
5. To the upper reservoir is added 450 μl wash buffer and centrifugation is performed as in step 4.
6. The flowthrough is discarded and the filter tube is combined with a new collection tube. 450 μl wash buffer was added to the upper reservoir and centrifugation is performed as in steps 4,5. Finally, centrifugation for 10 s at max. speed (ca. 13 000 x g) is performed to remove residual wash buffer.
7. The collection tube is discarded and the filter is inserted in a clean, nuclease-free 1.5 ml reaction tube.
8. For the elution of the viral RNA is used 50 μl of elution buffer. After elution buffer was added to the filter tube centrifugation is performed for 1 min at 10 000 rpm (ca. 8000 $\times$ g).
9. The RNA is stable and can be used directly or stored at -80°C for later analysis.

III Guanidine isothiocyanate (GTC)/silica gel extraction of nucleic acids

(in consideration of Addenbrooke's Hospital Cambridge - Public Health and Clinical Microbiology, Boom et al., 1990) was performed just several times when above mentioned kits were not available.

IV Oligonucletide primers

Primers for HIV PCR: amplification region-gag

1. rnd.:	GAG1 primer: 5'-GCG AGA GCG TCA GTA TTA AGC GG-3'	23 nt
	GAG4 primer: 5'-TCT GAT AAT GCT GAA AAC ATG GG-3'	23 nt
2. rnd.:	GAG2 primer: 5'-GGG AAA AAA TTC GGT TAA GGC C-3'	22 nt
	GAG3 primer: 5'-CTT CTA CTA CTT TTA CCC ATG C-3'	22 nt

Final fragment length of PCR product after second round amplification is 412 bp.

Primers for HBV-PCR: amplification region-HBS gene

HBS1 primer: 5'-CAA GGT ATG TTG CCC GTT TG-3'	20 nt
HBS2 primer: 5'-AAA GCC CTG CGA ACC ACT GA-3'	20 nt

Fragment length of PCR product is 259 bp.

Primers for In house HCV nested RT-PCR: region of amplification - 5' UTR

RT-PCR: random primers	6 nt-hexamers
HCV detection:	
1. rnd: NCR2 primer: 5'-ATA CTC GAG GTG CAC GGT CTA CGA CT-3'	26 nt
OKA3 primer: 5'-CTG TGA GGA ACT ACT GTC TT-3'	20 nt
(outer)	
2. rnd: NCR4 primer: 5'-CAC TCT CGA GCA CCC TAT CAG GCA GT-3'	26 nt
OKA1 primer: 5'-TTC ACG CAG AAA GCG TCT AG-3'	20 nt
(outer)	

Fragment length of PCR product after first round amplification is 299 bp and final fragment length after second round amplification is 235 bp.

V PCR reactions (in consideration of Addenbrooke's Hospital Cambridge - Public Health and Clinical Microbiology)

HIV: *two rounds of amplification*

- We used 20 μl of First round mix (10 x buffer II, 75 mM $MgCl_2$, dNTPs, Taq polymerase 5 U/μl, GAG1 and GAG2 primers 20 pmol/μl, RNase free water) and 5 μl *of template* (extracted DNA or positive control). The total volume of reaction mix is 25 μl.
- *Positive control:* HIV positive plasma sample.
- *PCR cycle:* The pre-heating of sample at 94°C for 2.5 min is followed by *25* PCR cycles (denaturation at 94°C for 25 s, primer annealing at 50°C for 35 s and primer extension at 68°C for 2.5 min), finishing of polymerization reaction is performed at 68°C for 9.5 min and at the end, cooling at 4°C. All reactions are performed in PCR thermocycler machine (Perkin Elmer GeneAmp PCR system 2400).
- *20 μl of Second round mix* (10 x buffer II, 75 mM MgCl2, dNTPs, Taq polymerase 5 U/μl, GAG2 and GAG3 primers 20 pmol/μl, RNase free water) and *2 μl of the first round PCR product.* The total volume of reaction mix is 22 μl.
- PCR cycle: is the same as in the first round amplification.

HBV: *one round amplification*

- We used *40 µl of First round mix* (10 x buffer II, 75 mM MgCl2, dNTPs, Taq polymerase 5 U/µl, HBS1 and HBS2 primers 20 pmol/µl, RNase free water) and *10 µl of template* (extracted DNA or positive control). The total volume of reaction mix is 50 µl.
- *Positive control*: HBsAg positive plasma sample.
- *PCR cycle:* The pre-heating of sample at 95°C for 5 min is followed by *30* PCR cycles (denaturation at 95°C for 2 min, primer annealing at 55°C for 2 min and primer extension at 70°C for 2 min), finishing of polymerization reaction is performed at 70°C for 5 min and at the end, cooling at 4°C. All reactions are performed in PCR thermocycler machine (Perkin Elmer GeneAmp PCR system 2400).

HCV: *RT-PCR*
Step one: Reverse transcription

- 1 µl of random primer mixed to 20 µl of extracted nucleic acid and incubated at 70°C for 5 min in a heating block. Then chilled on ice for 2 min The total volume in tube was 21 µl. After that Step 2 mix was prepaired (10 x buffer II, 75 mM MgCl2, dNTPs, M-MuLV RT, RNase-free water) and added in 14 µl to each tube. Reaction mix is incubated for 10 min at room temperature and for 1h at 37°C in a water bath. After incubation samples are pulsed spin at 13 000 rpm for 15 s and incubated at 95°C for 5 min in a thermocycler or in a heating block. Chilled tubes on ice for 2 min and the total volume in tube after Step 2 was 35 µl.

Ist round PCR

- We used *20 µl of First round mix* (10 x buffer II, 75 mM MgCl2, dNTPs, Taq polymerase 5 U/ µl, NCR2 and OKA3 primers 20 pmol/µl, RNase free water) and *5 µl of template* (cDNA from RT reaction). The total volume of reaction mix was 25 µl which is the reaction volume for the PCR amplification. After brief spin in microcentrifuge (5 s) the samples are ready for PCR.
- *Positive control:* HCV positive plasma sample.
- *PCR cycle: 25* PCR cycles (denaturation at 94°C for 25 s, primer annealing at 50°C for 35 s and primer extension at 68°C for 2.5 min), finishing of polymerization reaction is performed at 68°C for 9.5 min and at the end, cooling at 4°C. All reactions are performed in PCR thermocycler machine (Perkin Elmer GeneAmp PCR system 2400).
- *20 µl of Second round mix* (10 x buffer II, 75 mM MgCl2, dNTPs, Taq polymerase 5 U/µl, NCR4 and OKA1 primers 20 pmol/µl, RNase free water) and *2 µl of the first round PCR product.* The total volume of reaction mix is 22 µl.

- *PCR cycle:* is the same as in the first round amplification.

VI Visualisation of PCR products

Gel electrophoresis

10 μl aliquots of amplification products from the last PCR round are analyzed by 3% NuSieve agarose gel electrophoresis. Gel contained 0.5 μg/ml ethidium bromide and electrophoresis was runing at 45 V 30-60 min in 1 x TAE solution. After electroforesis gels were photografized under UV illumination (transilluminator) by CDD camera with terminal printer. Marker of length that was used is a 50, 150, 300, 500, 750 and 1000 bp ladder.

Results

- The polymerase chain reaction (PCR) assay is an extremely sensitive technique for the detection of specific DNA and RNA fragments. Numerous laboratories perform (RT) PCR using in-house laboratory methods and reagents.
- In our laboratory we perform the procedures for qualitative PCR assays, in consideration of Addenbrooke's Hospital Cambridge - Public Health and Clinical Microbiology.
- For this PCR testing individual plasma samples were analysed. Virus deoxyribonucleic acids were extracted by QIAamp nucleic acids extraction method or by guanidine isothiocyanate (GTC)/silica gel extraction of nucleic acids. The HCV ribonucleic acid was extracted by High Pure Viral RNA Kit (Roche) also from plasma samples. We detected integrated form of HIV and HBV-viral DNA but in the case of HCV it was RNA from free viral particles present in the blood of patient. So, for HCV detection an additional reverse transcription step before PCR amplifications was performed. Using specific complementary primers to the virus sequences we were able to detect a low amount of virus at early phase of viral infection by amplification reaction. Amplified virus-specific sequences by specific complementary primers were detected by agarose-gel electrophoresis. Primers used for HIV identification were specific for gag region (figure 1.) resulting in *412 bp* PCR product after second round of amplification. One round amplification of specific HBV DNA region HBS gene sequence (figure 2.) was identified by *259 bp* PCR product. Primers for HCV detection were complementary to *5' UTR* region (figure 3.) resulting in *235 bp* PCR product after second round amplification. The predicted length of specific PCR products was determined by comparing fragment length with known markers of length (50, 150, 300, 500, 750 and 1000 bp). After electrophoresis gels were photographing under UV illumination (transilluminator) by camera.

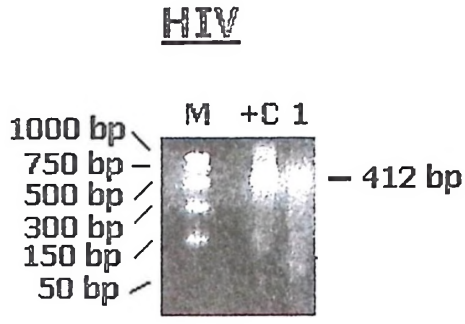


Figure 1. Amplification of specific HIV DNA region- *gag* sequence - by specific PCR primers. Length of amplified fragment is 412 bp. (M - marker of length, +C - positive control, 1- HIV positive specimen).

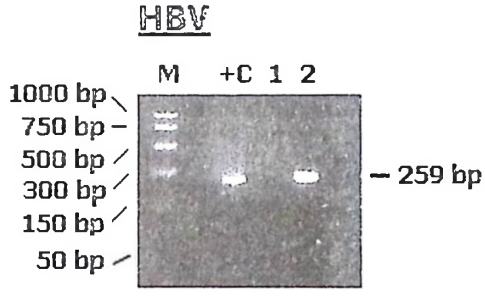


Figure 2. Amplification of specific HBV DNA region - *HBS gene* sequence - by specific PCR primers. Length of amplified fragment is 259 bp. (M - marker of length, +C - positive control, 1,2 - specimen). Specimen 1 did not contain virus specific sequence but specimen 2 is HBV positive.

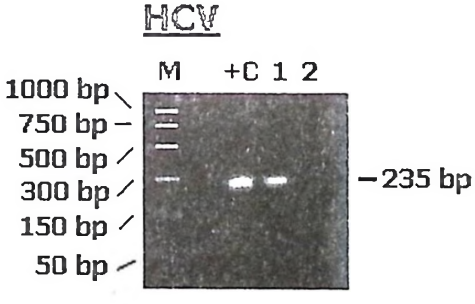


Figure 3. Amplification of specific HCV DNA region- *5' UTR* sequence - by specific PCR primers. Length of amplified fragment is 235 bp. (M - marker of length, +C - positive control, 1,2 - specimen). Specimen 2 did not contain virus specific sequence but specimen 1 is HCV positive

ANU BiH АНУ БиХ

Year	Medical Institution	Number of HIV tested persons		
		Total	Positive	Negative
from July 1998	Clinic of Infectious Diseases	5	0	5
	Clinic of Neurosurgery	1	0	1
	Personal request	12	2	10
Total		**18**	**2**	**16**
Percentage		100%	11.1%	88.9%
1999	Clinic of Neurosurgery	3	0	3
	Department of Oral Surgery	2	0	2
	Clinic of Haematology	1	0	1
	Clinic of Infectious Diseases	3	0	3
	Institute of Nephrology	3	0	3
	Personal request	110	5	105
Total		**122**	**5**	**117**
Percentage		100%	4.1%	95.9%
2000	Clinic of Cardiac diseases and Rheumatism	1	0	1
	Clinic of Infectious Diseases	2	1	1
	Institute of Nephrology	1	0	1
	Clinic of Haematology	1	0	1
	Clinic of Endocrinology	1	0	1
	Clinic of Pulmonary Diseases	1	0	1
	Clinic of Psychiatry	1	0	1
	Personal request	36	0	36
Total		44	**1**	**7**
Percentage		100%	2.3%	97.7%
T o t a l (1998-99-2000)		**184**	**8**	**176**
Percentage (1998-99-2000)		100%	4.4%	95.6%

ANU ВіН АНУ БиХ

HBV, HCV

Year	Medical Institution	Number of tested persons								
		HBV			HCV			HBV+HCV		
		Total	Positive	Negative	Total	Positive	Negative	Total	Positive	Negative
1999	Clinic of Infectious Diseases	0	0	0	3	1	2	0	0	0
	Institute of Nephrology	1	0	1	43	1	42	0	0	0
	Institute of Vascular Diseases	0	0	0	2	0	2	0	0	0
	Clinic of Otorinolaringology	0	0	0	1	0	1	0	0	0
	Post transfusion	1	0	1	1	0	1	0	0	0
	Pediatric Clinic	0	0	0	1	0	1	1	0	1
	Clinic of Gastroenterohaepathology	6	1	5	45	2	43	4	0	4
	Medical staff	0	0	0	7	0	7	1	0	1
	External medical institution	0	0	0	10	0	10	2	0	2
Total		8	1	7	113	4	109	8	0	8
Percentage		100%	12.5%	87.5%	100%	3.7%	96.3	100%	0%	100%

Year	Medical Institution	Number of tested persons								
		HBV			HCV			HBV+HCV		
		Total	Positive	Negative	Total	Positive	Negative	Total	Positive	Negative
2000	Clinic of Infectious Diseases	0	0	0	1	0	1	0	0	0
	Institute of Nephrology	0	0	0	1	0	1	0	0	0
	Institute of Vascular Diseases	1	0	1	0	0	0	0	0	0
	Clinic of Cardiac deseases and Rheumatism	1	0	1	1	0	1	0	0	0
	Pediatric Clinic	2	1	1	0	0	0	0	0	0
	Clinic of Pacdiatric Surgery	0	0	0	1	0	1	0	0	0
	Clinic of Gastroenterohaepathology	31	6	25	21	3	18	1	0	1
	Clinic of Urology	1	0	1	0	0	0	0	0	0
	External medical institution	10	3	7	10	2	8	3	0	3
Total		46	10	36	35	5	30	4	0	4
Percentage		100%	27.8%	72.2%	100%	16.7%	83.3%	100%	0%	100%
Total (1999-2000)		54	11	43	148	9	139	12	0	12
Percentage (1999-2000)		100%	20.4%	79.6%	100%	6.1%	93.92%	100%	0%	100%

Discussion

Epidemiologically, the main resource of HIV, HBV and HCV infection are infected persons with no clinical symptoms of disease. The number of HIV infection in the world reaches tens million. The diagnosis of HIV, HBV and HCV infection can be made by qualitatively detecting of viral nucleic acid using gene amplification techniques (e.g., PCR, RT-PCR respectively).

- Screening for viral infection most often relies on the detection of antibody to specific proteins in the serum of infected persons. In some situations, antibody testing for i.e. HIV is not useful, such as in patients with early or "latent " HIV infection, when virus may be present without the production of detectable amounts of antibody, or neonates who have HIV antibodies from their infected mothers. HIV antigen assays are not useful in these situations because of relatively insensitive antigen test. The PCR assay is extremely sensitive and may detect even a few molecules of a specific DNA or RNA sequence.
- Using PCR as a validated qualitative methodology routine we checked 184 persons on **HIV** infection from July 1998. up to the end of 2000. *8 (4.4%)* of them were HIV-RNA positive. One of positive persons was a patient from Clinic of Infectious Diseases, other 7 HIV-RNA positive (6 injection drug users and 1 from promiscuity-risk group) were tested on their personal request. In 1999 number of infected persons with HIV was relatively high compairing it with results in the year before and after. During 1999 and 2000 we performed 54 tests for identification HBV infected individuals and found *11 (20.4%) HBV* positive persons. 7 of them were patients from Clinic of Gastroenterohaepathology, 1 from Paediatric Clinic and 3 from external medical institution. The HCV tests for the same period included 148 tested persons. *9 (6.1%)* of them were *HCV*-RNA positive. It was 1 patient from Clinic of Infectious Diseases, 1 patient from Institute of Nephrology, 5 patients from Clinic of Gastroenterohaepathology and other 2 patients were from external medical institution. None of PCR-tested persons had HBV/HCV or other dual positivism.
- Quantitative assays for measuring the concentration (titer) of viral nucleic acid have been developed and are available from commercial laboratories, including a quantitative RT-PCR (Amplicor HCV MonitorTM, Roche Molecular Systems, Branchburg, New Jersey) and a branched DNA (deoxyribonucleic acid) signal amplification assay (QuantiplexTM HCV RNA Assay -bDNA-, Chiron Corp., Emeryville, California). A quantitative assay for virus infection would be important for the evaluation of new drugs and vaccines or for monitoring disease progression. Because of yet mention reasons our main aim in the near future will be

employment of quantitative assay as additional test to qualitative PCR method.

SUMMARY

- For early diagnostics of HIV, HBV and HCV it is inevitable to have fast laboratory method with high sensitivity and specificity to avoid and reduce the risk of viral transmission. For this purpose serological tests and culture methods are replaced with PCR amplification techniques for detection of virus in clinical specimens especially during the window period before appearing of the clinical symptoms of diseases. Serological tests and culture methods can be useful in a postsymptomatic terapeutic treatment of patients.
- HIV, HBV and HCV have been the viruses most intensively subjected to PCR analysis. It has been necessary to have an overview of incidence of infectious diseases caused by these viruses for a transition-state country such as BiH. In consideration of number of our population there is relatively high percentage of *HIV* (the most affected risk group have been the intravenous drug users- 6 of 8 infected individuals- tested on their personal request), *HCV* (the most frequently cases were identified in patients from Clinic of Gastroenterohaepathology with acute or chronic hepatitis- 5 of 9 infected persons) and especially *HBV* positivism (5 of 7 infected persons have been also the patients from Clinic of Gastroenterohaepathology). But, in consideration of the extent national migrations in last few years and a large arrival and exchange of foreign citizens and soldiers in our country, the number of infected individuals by those viruses is not alarming.
- It would be necessary to realize better transmission control preventing infections by these viruses in BiH for the public health.
- For monitoring disease progression or for evaluation of new medicaments and vaccines of early antiviral therapy it would be important to employ a quantitative assay with the present diagnostics method. A quantitative assay as additional test to qualitative PCR method would be our next goal.

REFERENCES

1. **Boom, R., Sol., C.J.A., Salimans, M.M., Jansen, C.L., Wertheim-Von Dillen, P.M.E., and Noordaa van der J.A., 1990:** *A rapid and simple method for purification of nucleic acids.* Journal of Clinical Microbiology, 28, 495 - 503.
2. **Brooks, G.F., Butel, J.S., Morse, S.A., 1998.:** *Jawetz, Melnick & Adelberg's Medical Microbiology,* 21st ed., Apleton & Lange.
3. **Cohen, P.T., Sande, M.A., Volberdong, P.A., 1994.:** *The AIDS Knowledge Base. A Textbook on HIV Disease from the University of California, San Francisco and San Francisco General Hospital,* 2nd Edition, Little Brown and Company, USA.
4. **Schochetman, G. and Shinsky, J.J.:** *Direct Detection of Human Immunodeficiency Virus Infection Using the Polymerase Chain Reaction. Reprinted from the book,* AIDS Testing: Methodology and Management Issues edited by Gerald Schochetman and J. Richard George. Roche Diagnostic Systems, Inc.
5. **Singleton, P., Sainsbury, D., 1993.:** *Dictionary of Microbiology and Molecular Biology,* 2nd ed., John Wiley & Sons.

Kvasnice iz roda Candida u miješanim vaginalnim infekcijama žena reproduktivne dobi

Fatima Numanović,[1)] Mirsada Hukić,[1)]
Mahmud Nurkić,[1)] Zineta Delibegović[1)]

Institucija u kojoj je istraživanje izvršeno:
Zavod za mikrobiologiju, Univerzitetski klinički centar Tuzla

Sažetak. Ispitivana je uloga Candide u nastanku vaginitisa u 140 žena reproduktivne dobi, koje su liječene u ginekološkim ambulantama. Vaginalni iscjedci su pregledani mikološki, bakteriološki i parazitološki. Iz vaginalnih iscjedaka izolovane su: aerobne bakterije 54,28% (76/140) kvasnice iz roda Candida 21,42% (30/140) mikroorganizmi udruženi sa bakterijskom vaginozom 20,7% (29/140) i Trichomonas vaginalis 3,57% (5/140). Kvasnice iz roda Candidae izolovane su iz 30/140 (21,42%) uzoraka i to: 22/30 (73,33%) Candidae albicans i 8/30 (26,66%) Candidae species. Rod Candiae izolovan je: u čistoj kulturi 10/30 (33,30%), udružen sa aerobnim bakterijama 16/30 (53,33%), sa mikroorganizmima povezanim sa bakterijskom vaginozom 3/30 (10%) i sa Trichomonas vaginalis 1/30 (3,33%). Kvasnice iz roda Candida, kao jedini uzročnik ili udružene sa drugim mikroorganizmima, su značajni uzročnici vaginalnih infekcija žena reproduktivne dobi. Izolacija i identifikacija uzročnika je neophodna za efikasno sprovođenje terapije.

Ključne riječi: vaginitis, Candida, miješane infekcije vagine, žene reproduktivne dobi.

Uvod

Vaginalne infekcije su najčešći klinički sindrom u žena. Pored subjektivnih tegoba čiji intenzitet zavisi od etiološkog uzročnika, ove infekcije imaju ogromno socio-ekonomsko značenje. Potpuno značenje vaginitisa iskazao je Gardner riječima: "Vaginitis uzrokuje više nesreće na svijetu nego bilo koja druga ginekološka bolest. Uz mnoge fizičke i emocionalne probleme povezane s vaginitisom, ekonomski gubici dostižu astronomske svote" (1).

Uzročnici vaginalnih infekcija nalaze se među: bakterijama, gljivama, protozoma i virusima. Zastupljenost pojedinih uzročnika vaginitisa se mijenjala kroz istoriju, što je zavisilo od: seksualnog ponašanja i sloboda, higijenskih prilika, terapijske primjene hormona, antibiotika, hemioterapeutika, te

[1)] Katedra za mikrobiologiju, parazitologiju i imunologiju, Medicinski fakutet, Univerzitet u Tuzli

mogućnosti mikrobiološke laboratorije da ih izoluje i identifikuje. Neisseria gonorrhae i Treponema pallidum su dugo bile najznačajniji uzročnici infekcija genitalnog trakta žena. Međutim, u posljednje vrijeme vođstvo preuzimaju mikroorganizmi udruženi sa bakterijskom vaginozom, Candida albicans, Chlamydiae trachomatis, Trichomonas vaginalis, Herpes simplex virus tip 2 i Humani papilloma virusi.

Candida albicans je danas drugi najčešći uzročnik vaginalnih infekcija. Prevalenca kandidijaze se kreće od 5-20%, što zavisi od životne dobi žena i od geografskog područja na kome žive (2). Najniža prevalenca od 1% se nalazi u žena u postmenopauzalnom periodu (3), a najviša u toku trudnoće, kada iznosi do 59,3% (4).

Između 25 i 40% žena su asimptomatski nosioci Candidae u vagini (5). Candida u vagini asimptomatskih nosilaca prisutna je uglavnom u malom broju sve dok postoji ravnoteža sa zaštitnom bakterijskom florom vaginalnog ekosistema i lokalnog imunog odgovora. Kao predisponirajući faktori za prelazak asimptomatskog vaginitisa u simptomatski ističu se trudnoća, nekontrolisani diabetes mellitus, dugotrajna upotreba antibiotika širokog spektra i oralnih kontraceptivnih sredstava. Međutim, svi patogenetski mehanizmi ni do danas nisu potpuno razjašnjeni. Smatra se da je prvi uslov za ovu transformaciju poremećaj vaginalnog ekosistema, kao i povećanje virulencije uzročnika i gubitak lokalnog imunog odgovora.

Vaginalne infekcije su u 20-25% žena uzrokovane sa dva ili više mikroorganizma (6). Najčešće se nalazi udruženost bakterijske vaginoze i vaginitisa uzrokovanog sa Trichomonas vaginalis, zatim kandidijaze i bakterijske vaginoze, a nije rijetka ni koinfekcija Candidae albicans i Trichomonas vaginalis (6) Vaginalna kandidijaza je danas daleko učestalija nego u zadnje dvije decenije i vrlo često je udružena sa drugim mikroorganizmima. Miješane vaginalne infekcije uzrokovane sa Candidom i drugim mikroorganizmima predstavljaju veliki medicinski problem jer simptomatologija ovih infekcija je vrlo često nespecifična, te je i njihovo prepoznavanje i pravilno liječenje otežano.

Cilj ovog rada je da prikaže zastupljenost Candide albicans kao uzročnika vaginalnih infekcija, te njenu udruženost sa drugim mikroorganizmima.

Materijal i metode

Istraživanja su vršena u Zavodu za mikrobiologiju UKC Tuzla. Retrospektivnom studijom je obuhvaćeno 140 ispitanica reproduktivne dobi koje su liječene u ginekološkim ambulantama. Ispitanice su imale različite subjektivne tegobe zbog kojih su potražile savjet ginekologa: nepravilna krvarenja, pojačan vaginalni iscjedak, peckanje, svrbež, bolove pri dnu stomaka i td. Svakoj ispitanici je uzet bris vaginalnog iscjedka i ispirak zadnjeg svoda vagine od koga je napravljen nativni preparat i preparat bojen po Gramu. U nativnom preparatu mikroskopski je tražen Trichomonas vaginalis. Mikroskopskim pregledom bojenog preparata u sekretu je evidentirano prisustvo ili

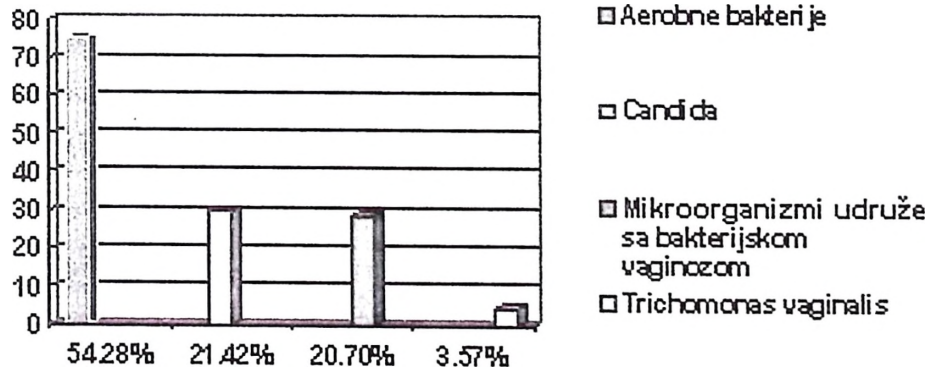
odsustvo polimorfonuklearnih leukocita, blastospora Candide sa ili bez pseudohifa, te prisustvo morfološki različitih bakterijskih vrsta.

Vaginalni iscjedak je zasijan na hranjive podloge za izolaciju, gljiva, aerobnih i anaerobnih bakterija najkasnije 6 sati od uzimanja materijala. Za izolaciju gljiva korišteni su Sabouraud dekstrozni bujon (SDA) i Sladni agar. SDA je inkubiran u termostatu na 370C kroz 24 sata a Sladni agar na temperaturi od 270C kroz 48 sati. Nakon inkubacije, od tečnog SDA pravljen je nativni preparat u kome su tražene blastospore Candide. Za diferencijaciju Candide albicans od drugih kvasnica korišten je test germinacije (produkcija germinativnih tuba). Kod negativnog testa germinacije rađena je mikrokultura na krompirovom agaru za dokazivanje hlamidospora. Ako su poslije 5 dana inkubiranja u vlažnoj komori na 270C u mikroskopskom preparatu nađene hlamidospore, kvasnice su identifikovane kao Candida albicans. Prisustvo pseudohifa bez hlamidospora označavan je kao Candida species u koju su svrstane sve druge vrste Candide osim Candide albicans.

Za izolaciju aerobnih i anaerobnih bakterija korištene su standardne bakteriološke podloge a identifikacija poraslih kolonija vršena je mikroskopskim pregledom, biohemijskim i serološkim testovima (7).

Rezultati

Iz vaginalnih briseva ispitanica kao najčešći uzročnici vaginalnih infekcija izolovane su aerobne bakterije 76/140 (54,28%), zatim kvasnice iz roda Candida 30/140 (21,42%), mikroorganizmi udruženi sa bakterijskom vaginozom 29/140 (20,7%), a najrjeđe Trichomonas vaginalis 5/140 (3,57%) (Slika 1.).



Slika 1. *Mikroorganizmi i grupe mikroorganizama izolovanih iz vaginalnog iscjedka u žena sa kliničkom slikom vaginitisa*

Candida albicans kao jedini uzročnik infekcije vagine izolovana je u 7/30 ispitanica (23,33%), a udružena sa drugim mikroorganizmima izolovana je u 15/30 ispitanica (50%) , dok je Candida species kao jedini uzročnik infekcije vagine izolovana u 3/30 ispitanica (10%) a udružena sa drugim mikroorganizmima u 5/30 ispitanica (16,66%) (tabela 1).

Tabela 1. *Odnos kvasnica iz roda Candidae i drugih mikroorganizama izolovanih iz vaginalnog iscjetka žena reproduktivne dobi*

Drugi izolati	Rod Candida		Candida albicans		Candida species	
	n	%	n	%	n	%
Čista kultura	10	33,30	7	23,33	3	10,00
Aerobne bakterije	16	53,33	12	50,00	4	16,66
Mikroorganizmi povezani sa bakterijskom vaginozom	3	10,00	3	10,00	/	
Trichomonas vaginalis	1	3,33		/	1	3,33
ukupno	30	100,00	22	73,33	8	26,66

n = broj izolata,

N = 30 (ukupan broj izolata pripadnika roda Candida),

% = postotak od N

Miješana infekcija vagine uzrokovana sa kvasnicama iz roda Candida i Gram pozitivnim i Gram negativnim aerobnim bakterijama nađene su u 53,33% slučajeva (tabela 2).

Tabela 2. *Udruženost kvasnica iz roda Candidae i aerobnih bakterija*

Aerobne bakterije	Candida albicans		Candida species	
	n	%	n	%
Escherichia coli	4	25	1	6,25
Escherichia coli i Streptococcus faecalis	2	12,5	/	
Escherichia coli i Streptococcus agalactiae	1	6,25		
Citrobacter freundi	/		1	6,25
Streptococcus faecalis	2	12,5	1	6,25
Streptococcus agalactiae	3	18,7	/	
Streptococcus agalactiae i Staphylococcus aureus	/		1	6,25
Ukupno	12	75,00	4	25,00

n = broj izolata,

N = 30 (ukupan broj izolata pripadnika roda Candida),

% = postotak od N

Analizom anamnestičkih podataka ispitanica u kojih je izolovana Candida, ustanovljeno je da njih 10/30 (33,33%) imaju specifične znake i simptome za vaginalnu kandidijazu: sirast vaginalni iscjedak, crvenila spoljnih genitalije i pruritusa . Ovakve promjene su nađene u 3/7 (42,85%) ispitanica kod kojih je izolovana Candida albicans kao jedini uzročnik vaginitisa; u 5/15 (33,33%)ispitanica sa izolovanom Candidom albicans udruženom sa drugim mikroorganizmima; u 1/3 (33,33%) ispitanica sa izolovanom Candidom species kao jedinim uzročnikom infekcije i u 1/5 (20%) ispitanica sa izolovanom Candidom species udruženom sa drugim mikroorganizmima.

Nespecifičan vaginalni iscjedak za vaginalnu kandidijazu imale su 20/30 (66,66%) ispitanica i to: 4/7 (57,14%) ispitanica kod kojih je izolovana Candida albicans kao jedini uzročnik vaginitisa; u 7/15 (66,66%) ispitanica sa izolovanom Candidom albicans udruženom sa drugim mikroorganizmima; u 2/3 (66,66%) ispitanica sa izolovanom Candidom species kao jedinim uzročnikom infekcije i u 4/5 (80%) ispitanica sa izolovanom Candidom species udruženom sa drugim mikroorganizmima.

Direktan mikroskopski preparat sa nalazom rijetkih polimorfonuklearnih leukocita, blastospora Candide sa pseudohifama i rijetkim Lactobacilom imalo je 9/30 (40,90%) ispitanica. Ovakav mikroskopski preparat je nađen u 4/7 (57,14%) ispitanica sa izolovanom Candidom albicans kao jedinim uzročnikom infekcije i u 5/15 (33,33%) ispitanica sa miješanom vaginalnom infekcijom (Candida albicans i drugi mikroorganizmi). U direktnom mikroskopskom preparatu vaginalnog iscjedka ispitanica u kojih je izolovana Candida species sama ili udružena sa drugim mikroorgnizmima nisu nađene blastospore sa pseudohifama.

Diskusija

Vaginitis je jedan od najčešćih problema u ginekološkoj praksi. Statistički podaci objavljeni u Americi 1991. godine pokazuju da je čak jedna polovina ukupnog broja žena u dobi od 25 godina imalo barem jednu medicinski dijagnosticiranu vaginalnu infekciju (1). Na povećanu incidencu vaginalnih infekcija utiče pored pojačane seksualne aktivnosti i nekontrolisana upotreba antibiotika širokog spektra, hormonalnih preparata, kortikosteroida, vaginalnih deodoransa i mirisnih otopina koje stvaraju idealne uslove za razvijanje razliitih vrsta mikroorganizama. Najčešći izročnici vaginitisa su mikroorganizmi udruženi sa bakterijskom vaginozom, rod Candida i Trichomonas vaginalis. U posljednja dva desetljeća došlo je do povećanja incidence vaginalne kandidijaze. Bingham je u svom istraživanju incidence vaginalne kandidijaze u periodu između 1971. i 1981. godine zabilježio povećanje incidence od 42% (8). Ispitujući zastupljenost kvasnica iz roda Candide, Ožegović i sar. su u 20,79% vaginalnih briseva ispitanica imali pozitivne rezultate (9). Najčešća

genitalna infekcija u tinejdžera prema rezultatima istraživanja grupe italijanskih autora je kandidijaza i to 32%, zatim bakterijska vaginoza 31,9% i miješana infekcija vagine oko 25,9% (10). Relativna incidenca uzročnika vaginitisa prema rezultatima U S Center for Health Statistics je za bakterijsku vaginozu 35-50%, kandidijazu 20-25% i trihomonijaza 5-15% (11). Prema našim rezultatima, kandidijaza je vodeće oboljenje (21,42%), a potom dolaze bakterijska vaginoza 20,7%, i trihomonijaza 3,57% (12). Procentualna zastupljenost Candidae u nastanku vaginitisa od 21,42% u žena reproduktivne dobi nađena u ovom istraživanju, je u skladu sa istraživanjima Sobella i sar iz 1992. godine. Oni su naveli da je prevalenca vaginalne kandidijaze između 5 i 20% što zavisi od starosti i geografskog područja stanovanja (13).

Candida albicans je još uvijek vodeći uzročnik vaginalne kandidijaze. Prema podacima iz Brazila iz 120 vaginalnih briseva ispitanica kvasnice su izolovane u 47,5% ispitanica a među njima Candida albicans je identificirana u 90,47% izolata (14). Ispitivanjem vaginalnih briseva porodilja, Babić-Ćemalović i saradnici su identificirali kvasnice iz roda Candide u 59,3% ispitanica od čega je Candida albicans identificirana u 59,4% ispitanica. Analizom izolata kvasnica iz roda Candide u ovom istraživanju, Candida albicans je identificirana u 73,33% ispitanica a Candida species u 24,67%.

Problem vaginalne kandidijaze je u čestoj pojavi recidiva ili relapsa. Smatra se da je prvi korak u rješavanju ovog problema u potvrdi kliničke dijagnoze i smanjenju uticaja predisponirajućih faktora jer korektna dijagnoza Candide sa ispitivanjem osjetljivosti na postojeće antimikotike rezultira u dobrom odgovoru na bilo koji oblik antifungalnih lijekova.

Poseban problem u tretiranju vaginalnih infekcije predstavljaju miješane vaginalne infekcije uzrokovane sa dva ili više mikroorganizama. Prilikom postavljanja dijagnoze vaginalne infekcije obavezno je isključiti multiplu infekciju jer je pozitivna prediktivna vrijednost za specifične simptome i znake generalno niska za miješane infekcije.(15). Ovo potvrđuju i podaci dobiveni u ovom istraživanju jer je svega 10/30 pacijenata ili 33,33% imalo tipične simptome i znake vaginalne kandidijaze, dok je 20/30 ili 66,66% imalo izmijenjenu kliničku sliku kao posljedicu miješane vaginalne infekcije uzrokovanu sa Candidom albicans i nekim drugim mikroorganizmom.

Prema rezultatima Hillier i saradnika, kvasnice iz roda Candida, često udružene sa drugim mikroorganizmima, uzrokuju vaginalne infekcije, i to u 15-26% slučajeva udruženi sa bakterijskom vaginozom, a u 10% slučajeva sa Trichomonas vaginalis. Prema rezultatima ovog istraživanja kvasnice iz roda Candida su u 10% slučajeva udružene sa bakterijskom vaginozom i u svega 3,33% sa Trichomonas vaginalis, dok je najčešća udruženost (53,33%) bila sa različitim aerobnim bakterijama (Escerichia coli, Streptococcus fecalis, Streptococus agalactiae). Miješane infekcije vagine su 2 puta češće nego infekcije uzrokovane jedino sa Candidom. Klinički znaci i simptomi miješanih

infekcija su u 20/30 ili 66,66% bili nespecifični za kandidijazu što otežava postavljanje etiološke dijagnoze a samim tim i sprovođenje pravilne terapije. Značaj miješanih infekcija je i u činjenici da su u ovom slučaju reinfekcije 4 puta češće i da miješani karakter infekcije znatno produžava terapiju (16).

Zaključak

Iz vaginalnih iscjedaka ispitanica izolovane su aerobne bakterije 54,28% (76/140) kvasnice iz roda Candida 21,42% (30/140) mikroorganizmi udruženi sa bakterijskom vaginozom 20,7% (29/140) i Trichomonas vaginalis 3,57%. (5/140).

Kvasnice iz roda Candidae izolovane su iz 30/140(21,42%) uzoraka i to 22/30 (73,33%) Candidae albicans i 8/30 (26,66%) Candidae species. Rod Candiae izolovan je u čistoj kulturi 10/30 (33,30%), udružen sa aerobnim bakterijama 16/30 (53,33%), sa mikroorganizmima povezanim sa bakterijskom vaginozom 3/30 (10%) i sa Trichomonas vaginalis 1/30 (3.33%).

Kvasnice iz roda Candida, kao jedini uzročnici ili udruženi sa drugim mikroorganizmima, su značajni u etiologiji vaginalnih infekcija žena reproduktivne dobi. Izolacija i identifikacija uzročnika je neophodna za efikasno sprovođenje terapije.

ANU BiH АНУ БиХ

Summary

We have examined the role of Candida in the vaginitis in 140 women in the reproductive period had been treated in gynecology Dispensery. The vaginal discharge were examined micologicaly, bacteriologicaly and parasitologicaly. From these vaginal discharges were isolated: aerobic bacterium in 54,28% (76/140); yeasts of the genus Candida in 21,42% (30/140); microorganisms associated with bacterial vaginosis in 20,7% (29/140) and Trichomonas vaginalis in 3,57% (5/140). Yeasts of the genus Candida were isolated from 3/140 (21,42%) specimens as following: 22/30 (73,33%) Candida albicans and 8/30 (26,66%) non Candida albicans. The genus Candida had been isolated in pure culture in 10/30 (33,30%) associated with: aerobic bacterium in 16/30 (53,33%); microorganisms associated with bacterial vaginosis 3/30 (10%) and with Trichomonas vaginalis 1/30 (3,33%). Yeasts of the genus Candida as the only cause of the vaginal infection of women in the reproductive period. The proper identification and isolation of the etiologic agent are necessary for successful therapy.

Key words: vaginitis, Candida, mixed vaginal infection, women in reproductive period

LITERATURA

1. **Kent HL.:** *Epidemiology of vaginitis,* Am J Obstet Gynecol 1991; 165: 1168-1976.
2. **Odds FC.:** *Candosis of the genitalia,* U: Odss FC., ed. Candida i Candidiosis. 2nd edn, London: Baillire Tindall,1988: 124-35.
3. **Hillier Sh, Lan RJ.:** *Vaginal microflora in postmenopeuzal women who have not received estrogen replacement therapy Clinical Infections Diseases 1997,* (Suppl 2): 123-6.
4. **Babić-Ćemalović M, Ožegović L, Zvizdić A, Ovčina-Kurtović N.:** *Kvasnice u vagini porodilja,* Medicinski žurnal 2000; 6 (1): 32-36.
5. **Drake TE, Maibach HI.:** *Candida i candidiasis: cultural conditions, epidemiology, and pathogenesis,* Postgrad Med 1973;53: 83-7.
6. *A clinical forum for health care providers. Contemporary Perspectives in vaginal infection and health,* Becton Dickinson and company1996, p 7.
7. **Henry D. Isenberg:** *Essential Procedures for Clinical Mycrobiology,* Long Island Jewish Medical Centar 1998.
8. **Bingham JS.:** *Vulvovaginal candidiasis. An overview,* Acta Derm Venerol 1986; 121. (suppl): 39-46.
9. **Ožegović L, Salčić S, Tigerman-Tadić V.:** *Prilog poznavanju raširenosti kvasnica u kožnih bolesnika i u izabranim kolektivima,* Acta. derm. Jug.1978; 5: 167-173.
10. **De Seta F, Sartore A, Piccoli M, De Santo, Grimaldi E, Ricci G, Campello C, Guaschino S.:** *Gynecologic infections in adolescente,* Minerva Ginecol 2000; 52 (9): 327-332.
11. **Katherine LaGuardia:** *Contemporary Perspectives in vaginal infection and health A clinical forum for health care providers Becton Dickinson and company 1996,* p 6.
12. **Numanović F.:** *Korelacija različitih biotipova Gardnerellae vaginalis i bakterijske vaginoze,* (Magistarski rad), Tuzla, Bosna i Hercegovina: Univerzitet u Tuzla, 2001. 57 str.
13. **Sobel JD Vulvovaginitis:** *Dermatol Clin 1992b,* 10: 339-359.
14. **Evandro Leao Ribeiro:** *Biological aspects of the yeasts of the genus Candida isolated of vaginal candidiasis,* Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical 1998; 31 (6): 595.
15. **Mardh PA, Tchoudomirova K, Elshibly S, Hellberg D.:** *Simotoms and signs in single and mixed genital infections,* Int J Gynecol Obstet 1998; 63 (2): 145-152.
16. **Szezurowicz A, Szezurowicz A, Swiercz G, Dziubinska H, Witezak A, Kolodziejski D.:** *Vulvovaginitis in girls. III. Clinical manifestations and efficiency of therapy,* Gynekol Pol 1993;64 (7): 349-353.

Endokrine stanice u upalno-regenerativnim i displastičnim epitelnim lezijama sluznice kolona

Svjetlana Radović,[1] Ivan Selak,[1] Mirsad Babić, [1]
Aleksandar Nikulin[1] i Ismet Bratović[2]

Sažetak. *Cilj.* Imunohistohemijskom metodom ispitivano je da li pri nastanku epitelne displazije u ravnoj, hronično inflamiranoj mukozi kolona, dolazi do promjene broja, oblika i načina raspoređivanja kriptalnih i perikriptalnih endokronih stanica (ES).

Metoda. Pregledani su biopsijski uzorci 270 pacijenata, među kojima su 74 okarakterisana kao upalno-regenerativne promjene, a 198 slučajeva kao displastične lezije. Lagana displazija nađena je u 108, srednja u 58, a teška u 30 slučajeva. Brojnost i lokacija ES-a, koje su imunohistohemijski vizuelizirane hromograninom A, određivani su unutar kripti i u perikriptalnoj zoni, te komparirani sa nalazom u normalnoj sluznici i u tkivu adenokarcinoma kolona.

Rezultat. Kod lagane displazije, u odnosu na upalno-regeneratorno promijenjenu mukozu, zapaženo je signifikantno povećanje broja kriptalnih i perikriptalnih ES-a. Kod srednje, u odnosu na laganu displaziju, uočeno je povećanje broja kriptalnih ES-a, dok je broj perikriptalnih stanica ostao nepromijenjen. Kod teške, u odnosu na srednju displaziju, te u tkivu adenokarcinoma kolona, nije uočana promjena broja kriptalnih ES-a, ali je zapaženo povećanje broja perikriptalnih ES-a.

Zaključak. Signifikantno povećanje broja kriptalnih i perikriptalnih ES-a u stadiju lagane displazije u odnosu na upalno-regenerirajuću mukozu, može se smatrati jednim od relevantnih patoloških parametara početnog razvoja epitelne displazije. ES u displastičnim lezijama ravne mukoze kolona nisu neoplastične prirode, s obzirom da nisu verifikovane atipije njihovog oblika i međusobnog odnosa.

Endokrine stanice (ES) formiraju male organe (prednji režanj hipofize), izdvojene stanične nakupine unutar drugih tkiva (ostrvca endokrinog pankreasa) ili difuznu mrežu stanica razasutih unutar brojnih organa ljudskog organizma (timusa, štitnjače, respiratornog sustava, prostate, gastroinestinalnog trakta). Endokrine stanice gastrointestinalnog trakta, kao sastavni dio difuznog neuroendokrinog sistema (DNES-a), čine mrežu dispergovanih stanica, utisnutih između epitelija žljezdanih kripti, a nalaze se i u perikriptalnom prostoru unutar lamine proprie mukoze.

[1] Institut za patologiju Medicinskog fakulteta u Sarajevu

[2] Gastroenterološka interna klinika KBC Sarajevo

O porijeklu ES-a digestivnog trakta, desetinama godina vode se polemike. Jedni su mišljenja da su one neuroektodermalnog porijekla (1), a drugi da su porijekla iz endoderma (2,3,4). Danas je sve više istraživača koji zastupaju stajališta da su neuroendokrine stanice gastrointestinalnog trakta (GIT) edodermalnog porijekla, s obzirom da su u ovim stanicama, imunohistohemijskom metodom, otkriveni citokeratinski intermedijarni filamenti (5,6). U mukozi kolona ove stanice luče različite polipeptidne hormone. Biološki efekat najvećeg broja polipeptidnih hormona nije dovoljno poznat. Neki od hormona mogu da izazivaju različite odgovore, u ovisnosti od mjesta gdje se luče, kao i od okolnosti u kojima djeluju. Eenteroglukakon, suspanca P, bombenzinu slična supstanca, somatomedin i gastrin imaju dokazano trofičko djelovanje na mukozu GIT-a (7,8). Somatostatin ima suprotan efekat, tj. ima inhibitorno djelovanje na rast epitelnih stanisa sluznice.

Povećanje broja ES-a uočena je u sluznici želuca u stanjima hroničnog atrofičnog gastritisa i perniciozne anemije (9), te hipohlorhidrije (10). Hiperplazija ES-a zapažena je u sluznici debelog crijeva kod postojanja hroničnog ulceroznog kolitisa 11,12), te u adenomima (13) u kojima je porast broja ovih stanica bio u korelaciji sa stepenom epitelne displazije. Promjene u brojnosti ovih stanica nisu nađene u tkivu karcinoma kolona (14). Ovo istraživanje ima za cilj da se ispita da li i u kom obimu u toku nastanka epitelne displazije u ravnoj, upalno promijenjenoj mukozi kolona, dolazi do promjena broja i, eventualno, izgleda i načina raspoređivanja ES. Ispitivana je populacija ES-a unutar kripti i onih koje se nalaze u njihovoj neposrednoj blizini.

Materijal i metode

Kod rutinskog endoskopskog pregleda pacijenata, kod kojih je kliničar postavio dijagnozu upalnog procesa bilo kojeg oblika, uzimana su, uvijek iz ravne sluznice, dva do tri biopsijska uzorka na udaljenosti od 30 cm od anusa. Pregledani su biopsijski uzorci sluznice kolona 270 pacijenata, od kojih su 208 bili muškarci, a 62 žene. Svi pacijenti su bili stariji od 45 godina. Kao kontrola, iz tekućeg obdukcionog materijala, uzeti su biopsijski uzorci mukoze kolona 40 pacijenata, kod kojih nije bilo znakova upalnog procesa. Umrli su bili starosti između 30 i 70 godina, 26 su bili muškarci i 24 žene.

Iz tekućeg obdukcionog materijala, od 40 umrlih, 27 su bili muškarci i 13 žene, starosti od 38 do 76 godina, uzeti su uzorci tkiva adenokarcinoma sluznice kolona, u slučajevima gdje se radilo o tzv. karcinomu de novo. Radi se o karcinomima malog promjera (7-10mm), u nivou, ili lagano iznad ili ispod nivoa okolne sluznice. U ovim karcinomima se niti makroskopskim niti mikroskopskim pregledom u serijskim rezovima, nije moglo utvrditi postojanje rezidentnog adenoma.

Uzorci su fiksirani u 10% neutralnom formalinu, potom su uklapani u formalin, te rezani na debljinu od 3-5 milimikrona. Tkivni uzorci su bojeni standardnom hematoksilin-eozin (HE) metodom, te imunohistohemijski

u cilju vizuelizacije neuroendokrinih stanica chromograniininom A (chromogranin A, code No. A430, lot 072, firme DAKO).

Definisani su histološki kriteriji za jednostavnije razlikovanje upalno-regenerirajućih od displastičnih promjena (15,16,). Prema ovim parametrima, epitelna displazja podijeljena je u tri stepena - laganu, srednju i tešku. Uvrštavanje u jednu od ovih kategorija vršeno je nakon analize 19 mogućih morfoloških promjena, koje su u ovisnosti od stepena intenziteta gradirane vrijednostina od 1 do 4. Raspon kretanja indeksne vrijednosti I, za pojedine kategorije promjena kreće se:

1.3<I<1.8 upalno-regenerativne promjene

1.9<I<2.3 lagana displazija

2.4<I<2.9 srednja displazija

3.0<I<3.7 teška displazija

Imunohistohemijski bojenjem identifikuju se sekretorni produkti unutar ES-a. Okvirno određivanje broja ES-a utvrđeno je u uzorcima normalne mukoze. Kvantifikacija broja ES-a vršena je na nivou svjetlosne mikroskopije pri uvećanju 40X. Broj stanica utvrđivan je u 20 kripti, kao i u njihovoj neposrednoj blizini. Broj, izgled, način raspoređivanja (pojedinačne, nodularno ili difuzno raspoređene) i lokacija ES-a određivani su na isti način u upalno-regenerativno promijenjenoj mukozi kolona i unutar displastičnih lezija, te je nalaz uporeden sa onim u normalnoj mukozi i u tkivu adenokarcinoma kolona. Hromogranin se unutar stanica prikazuje u vidu fino dispergovanih smeđe-žutih granula.

Pozitivna kontrola za prisustvo i intenzitet obojenosti hromogranina bilo je tkivo normalnog pankreasa, u kojem se antigen nalazi unutar stanica Langerhansovih otočića.

Rezultati

Među mikroskopski pregledanim uzorcima sluznicekolona 270 pacijenata, koji su bojeni standardnom HE metodom, 74 su okarakterisana kao upalno-regenerativne promjene, a 196 kao displastične promjene. Lagana displazija nađena je u 108, srednja u 58, a teška u 30 slučajeva (Tabela 1.).

40 slučajeva normalne mukoze bili su lišeni bilo kakvih, i minimalnih patoloških promjena.

Među biopsijskim uzorcima tkiva adenokarcinoma (40 slučajeva) u 21 se radilo o dobro diferenciranom, a u 19 slučajeva o srednje diferenciranom tipu adenokarcinoma.

Tabela 1. *Klasifikacija morfoloških promjena u mukozi kolona 270 pacijenata sa upalno-regeneratovnim i displastičnim lezijama epitela*

Morfološke promjene	Index*	Broj pacijenata
Upalno-regenerativne promjene	1.3	7
	1.4	10
	1.5	16
	1.6	9
	1.7	20
	1.8	12
Ukupno		**74**
Lagana displazija	1.9	21
	2.0	10
	2.1	29
	2.2	30
	2.3	18
Ukupno		**108**
Srednja displazija	2.4	14
	2.5	15
	2.6	8
	2.7	6
	2.8	11
	2.9	4
Ukupno		**58**
Teška displazija	3.0	5
	3.1	9
	3.2	4
	3.3	6
	3.4	2
	3.5	2
	3.6	2
	3.7	0
Ukupno		30

* Index (I) je numerički izračunat raspon kretanja morfoloških promjena

U svih 40 uzoraka normalne sluznice (100%) nađene su ES. Bile su smještene između epitelnih stanica kripti i u lamini proprii u neposrednoj blizini kripti. Broj ES je bio veoma vrijabilan i kretao se od 2 do 8 (prosječan broj 4.2). Bile su pretežno locirane u bazalnom dijelu kripti, mada su se mogle naći i u ostalim nivoima. Broj ES u perikriptalnom prostoru, gdje se difuzno raspoređuju, kretao se od 12 do 25 (prosječno 16.5).

ANU BiH АНУ БиХ

Tabela 2. *Rezultati nalaza hromogranin A pozitivnih stanica u upalno-regenerativno i displasticno promijenjenoj ravnoj mukozi kolona kod 270 pacijenata*

Morfološke promjene	Index*	Broj slučajeva	Prosječan broj NE stanica u kriptama	Prosječan broj NE stanica perikriptalno
Upalno-	1,3	7	4,7	21,2
regenerativne	1,4	10	4,3	20,5
promjene	1,5	16	5,1	21,6
(N=74)	1,6	9	4,5	15,4
	1,7	20	4,2	23,9
	1,8	12	4,3	19,1
Prosječno (Standardna devijacija)			4,51 (0.346)	20,87 (2.620)
Lagana	1,9	21	4,4	21,2
displazija	2.0	10	4,5	22,7
(N=108)	2,1	29	4,8	24,3
	2,2	30	4,7	22,9
	2,3	18	4,7	22,5
Prosječno (Standardna devijacija)			4,65 (0.147)	22,86 (1.062)
Displazija	2,4	14	4,9	22,7
srednjeg	2,5	15	4,9	23,1
stepena	2,6	8	4,8	22,9
(N=58)	2,7	6	4,9	23,4
	2,8	11	4,6	23,2
	2,9	4	4,7	23.0
Prosječno (Standardna devijacija)			4,82 (0.119)	23.02 (0.224)
Teška	3.0	5	4,7	22,9
displazija	3,1	9	4,9	25,1
(N=30)	3,2	4	4,6	22,4
	3,3	6	5	23,1
	3,4	2	5,2	24,2
	3,5	2	4,5	23,9
	3,6	2	4,9	23.7
	3,7	0	0	0
Prosječno (Standardna devijacija)			4,84 (0.187)	23,74 (1.02)

* Index(1) je numerički izračunat raspon kretanja morfoloških promjena

Rezultati nalaza hromogranin A pozitivnih stanica u upalno-regenerativno i displastično izmijenjenoj mukozi kolona dati su u Tabeli 2. Prosječan broj ES-a u kriptama u inflamatorno-regenerativno izmijenjenoj mukozi (Slika 1.) iznosio je 4.51, a u perikriptalnoj zoni 20.87.Kod lagane displazije (Slika 2.) prosječan broj ES-a u kriptama iznosio je 4.65, kod srednje 4.82, a kod teške 4.84. Povećanje broja hromogranin A pozitivnih stanica unutar kripti u slučajevima lagane displazije pokazao se kao signifikantan u odnosu na

upalno-regenerativno promijenjenu mukozu. Signifikanta je porast broja ovih stanica kod srednje u odnosu na laganu displaziju (Tabela 2a.). Kod teške u odnosu na srednju displaziju nije uočeno signifikantno uvećanje.

Tabela 2a. *Rezultati testiranja Tabele 2.*

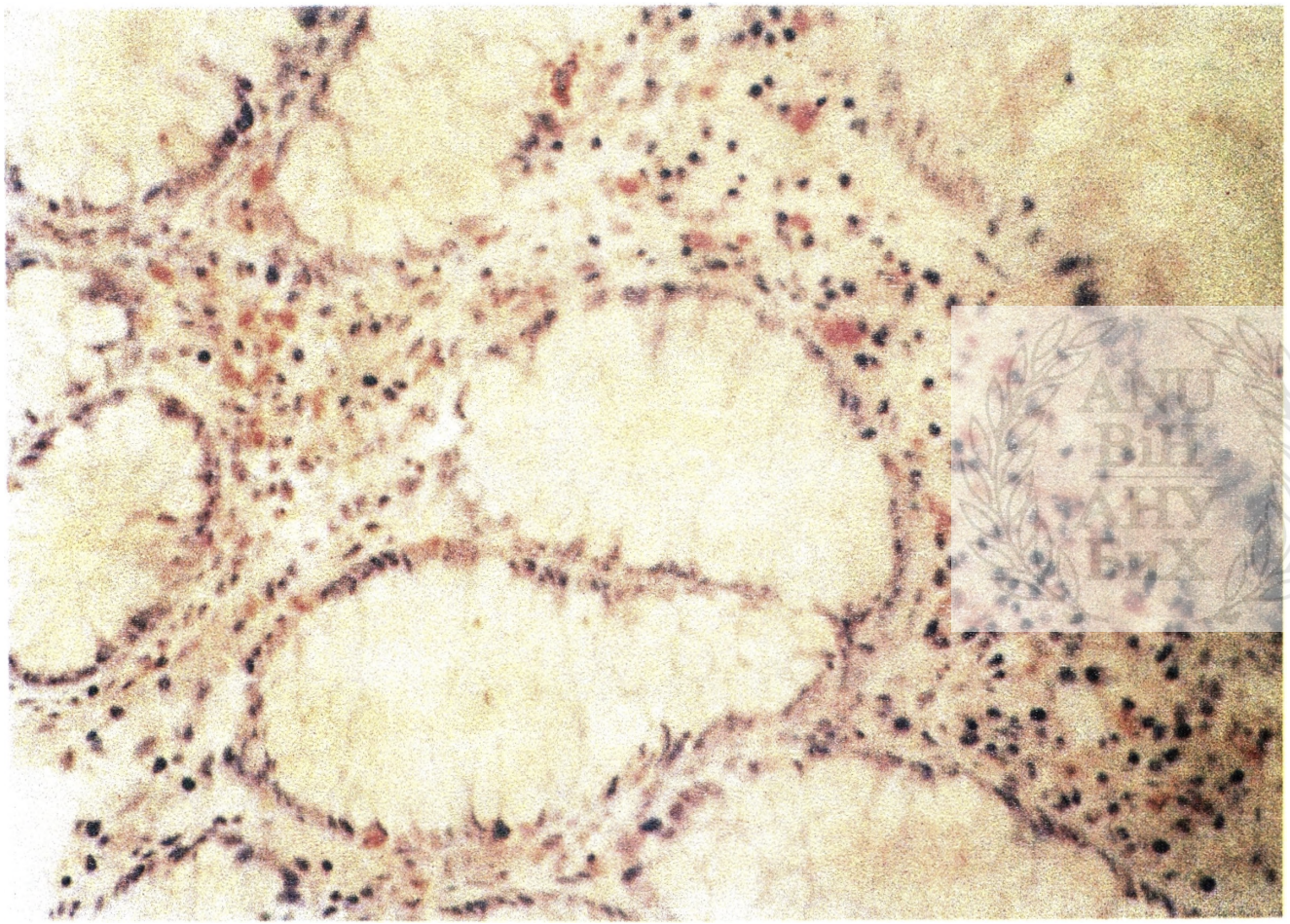
Morfološke skupine između kojih se ispituje signifikantnost	Vrijednost "t" testa	Zaključak o signifikantnosti razlika i nivo signifikantnosti
Test za prosječan broj NE stanica u kriptama		
1. Upalno-regenerativne promjene - lagana displazija	t=3.335	signifikantno, $p<0.01$
2. Lagana displazija - displazija srednjeg stepena	t=7.807	signifikantno, $p<0.01$
3. Displazija srednjeg stepena - teška displazija	t=0.665	nije signifikantno
Test za prosječan broj NE stanica u perikriptalnoj zoni		
4. Upalno-regenerativne promjene - lagana displazija	t=6.177	signifikantno, $p<0.01$
5. Lagana displazija - displazija srednjeg stepena	t=1.494	nije signifikantno
6. Displazija srednjeg stepena - teška displazija	t=3.817	nije signifikantno

Prosječan broj perikriptalnih ES-a kod upalno-regenerativnih promjena iznosio je 20.87, kod lagane displazije 22.86, kod srednje displazije 23.02, a kod teške 23.74. Povećanje broja perikriptalnih ES kod lagane displazije bilo je signifikantno u odnosu na njihov broj u upalno-regenerirajuće izmijenjenoj mukozi. Razlika u brojnosti ovih stanica kod srednje i lagane displazije nije bila signifikantna, ali je signifikantna za tešku u odnosu na srednju displaziju (Tabela 2a.).

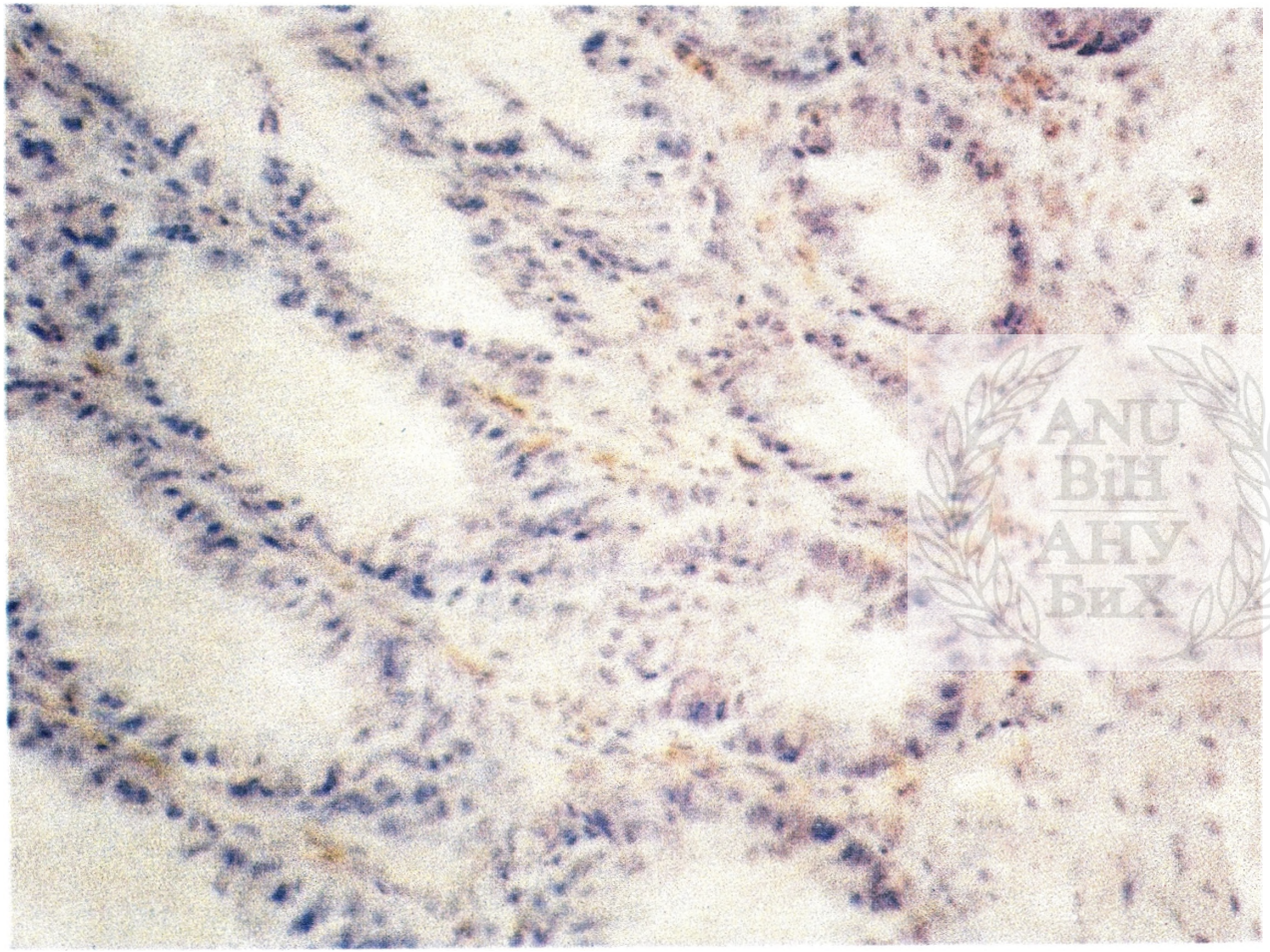
U ispitivanim displastičnim lezijama, kriptalne i perikriptalne ES raspoređivale su se na identičan način kao i u normalnoj sluznici. U 37 slučajeva (92.5%) adenokarcinoma kolona (Slika 3.) u stromi tumora nađene su razbacane, pojedinačne ES (prosječno 23.2 stanice oko kripti), dok su unutar kripti bile u gotovo nepromijenjenom broju (4.80).

U svim pregledanim uzorcima različitih patoloških lezija, hromogranin A pozitivne stanice nisu pokazivale citonuklearne abnormalnosti.

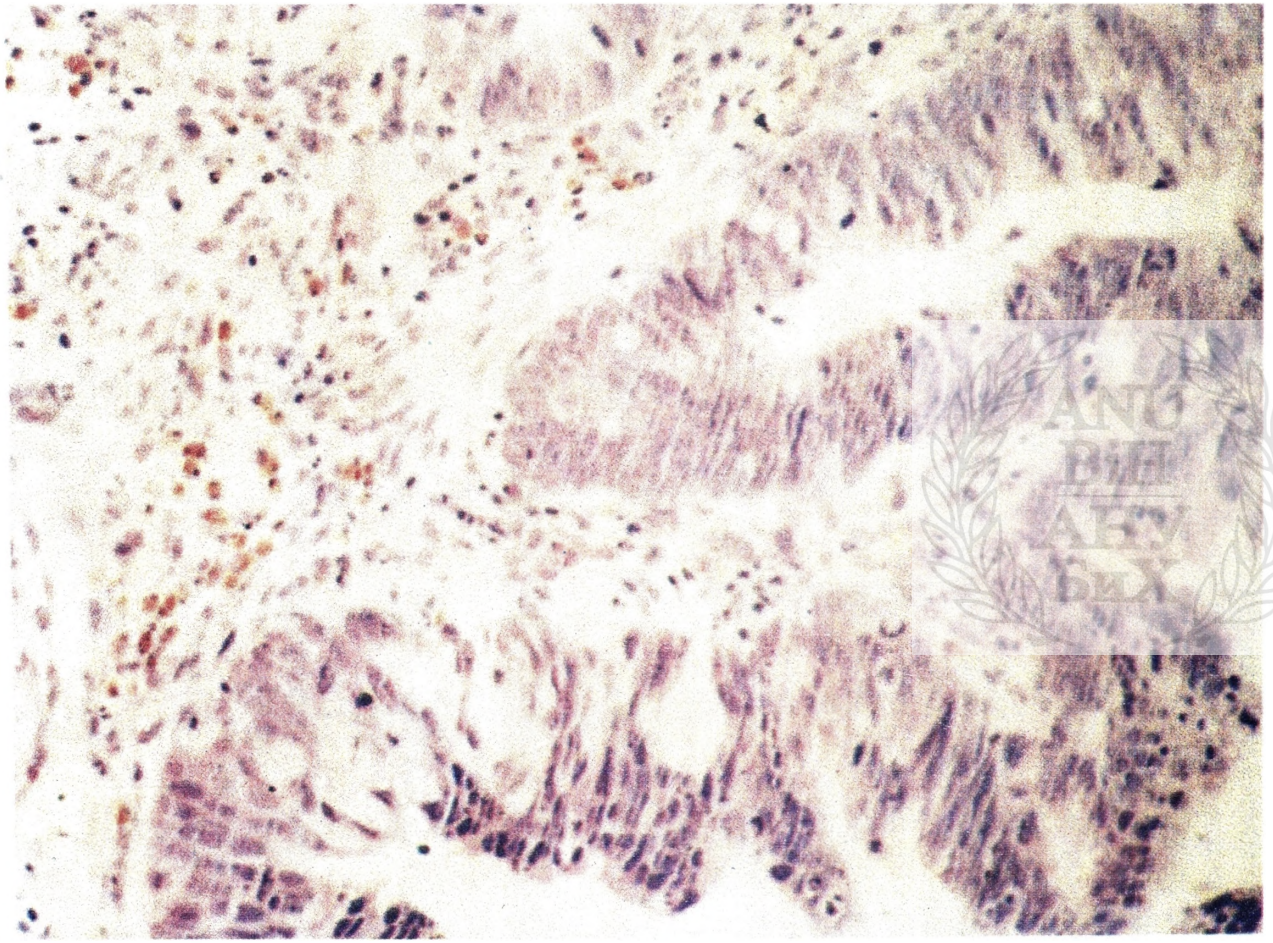
ANU BiH АНУ БиХ



Slika 1. *Hromogranin A pozitivne endokrine stanice unutar kripti i u perikriptalnoj zoni upalno-regenerativno izmijenjene mukoze kolona. (250x)*



Slika 2. *Povećan broj hromogranin A pozitivnih stanica u perikriptalnoj zoni sluznice kolona koja pokazuje znake lagane displazije. (100x)*



Slika 3. *Hromogranin A pozitivne stanice u vezivnoj stromi adenokarcinoma kolona kolona. (250x)*

Diskusija

U određivanju broja ES-a unutar kripti normalne mukoze kolona nisu nađena veća odstupanja u odnosu na nalaze nekih drugih istraživača (14). Zapaženo je da se broj kriptalnih ES-a u stanjima upalno-regenerativno izmijenjene mukoze kolona ne mijenja u odnosu na normalnu sluznicu. Kod lagane displazije, u odnosu na inflamatorno-regenerativne promjene, notirano je blago, ali signifikantno uvećanje povećanje broja kriptalnih i perikriptalnih ES-a. Kod srednje, u odnosu na laganu displaziju, također je zapaženo signifikantno uvećanje broja kriptalnih, ali ne i perikriptalnih ES-a. Kod teške, u odnosu na srednju displaziju, te u tkivu adenokarcinoma kolona u odnosu na tešku displaziju, broj kriptalnih ES-a nije bio signifilatno promijenjen, ali je zapaženo signifikantno uvećanje broja perikriptalnih ES-a.

Neki od hormona (enteroglukakon) koje luče ES mukoze kolona imaju trofičko djelovanje na mukozu, dok drugi imaju inhibitorno djelovanje na proces rasta epitelnih stanica. Imunohistohemijsko bojenje hromograninom A omogućava otkrivanje in situ opće populacije ES-a, ali ne i pojedinih njenih podtipova. Za identifikaciju pojedinih vrsta ES-a neophodna je primjena mnogobrojne palete antitijela za identifikaciju širokog spektra hormona koje ove stanice luče. Određivanje tipa hormona koje luče ove stanice, moglo bi rasvijetliti njihovu ulogu u displastičnom procesu.

Na osnovu dobijenih rezultata zaključuje se da se ES mogu naći u svim stadijima epitelne displazije koja se razvija u ravnoj mukozi. S obzirom da je u stadiju lagane displazije zapaženo blago, ali signifikantno povećanje broja ES-a to se ovo povećanje može smatrati jednim od relevantnih patoloških parametara početnog razvoja epitelne displazije. Broj kriptalnih ES-a u stadiju srednje displazije, te broj perikriptalnih ES-a u teškoj displaziji podjednaka je njihovom broju u tkivu adenokarcinoma kolona. Mišljenje je da ES nisu neoplastične prirode, s obzirom da nisu notirane atipije njihovog oblika i međusobnog odnosa. Utvrđivanje njihovog hormonskog sastava, odnosno načina djelovanja hormona koje luče, osvijetlilo bi ulogu ovih stanica u displastičnom procesu. Neki istraživači (17) su mišljenja da ove stanice nemaju proliferativni kapacitet, odnosno dase radi o postmitotičkim stanicama, što bi bilo potvrda teorije njihovog porijekla iz pluripotentnih stem stanica bazalnog dijela kripti. Po ovom mišljenju, svako povećanje njihovog broja nastaje kao rezultat diobe stem stanica, sa naknadnom diferencijacijom novonastalih stanica u pravcu linije ES-a. Povećanje njihovog broja u perikriptalnoj zoni tumači se kao rezultat umnožavanja stem stanica i odvajanja novonastalih stanica put lamine proprie, nakon čega tek nastaje njihova konačna diferencijacija u pravcu ES-a, na isti način kao i u kriptama. Ekspanzija ove stanične linije prethodi konačnoj diferencijaciji ES. Hiperplazija ES u toku displazije može biti uzrokom kontinuiranog povećanja količine trofičkih hormona, koji mogu djelovati kao promotorni akt u procesu kancerogeneze. Povećanje broja

perikiptalnih ES-a, odnosno količine izlučenih hormona, u toku teške displazije i u tkivu adenokarcinoma, može biti u službi daljeg podsticaja malignog bujanja epitelnih stanica.

SUMMARY

Aim. Immunohistochemical study of endocrine cells (EC) number, distribution and morphology in inflammatory-regenerative and dysplastic epithelial lesions in flat bowel mucosa.

Methods. Biopsy specimens of 270 patients were examined: 74 classified as inflammatory-regenerative and 108 as dysplastic (108 mild, 58 moderate, and 30 severe dysplasia). The expression of EC was assessed on the basis of quantity and location chromogranin A positive cells in cryptal, and pericryptal zone. Biopsies of normal bowel mucosa were used as controls for the number EC.

Results. In mild dysplasia, number of cryptal and pericryptal EC was significantly increased in the number of cases with inflammatory-regenerative changed bowel mucosa. In all types of moderate dysplasia there was significant increassed of the number of cryptal EC, but number of pericryptal EC was the same. Compared with mild dysplasia, in severe dysplasia and colonic adenocarcinoma the number of pericryptal EC was incrised.

Conclusion. The development and increase of the intensity of dysplastic lesion come along with mild but significant increase in number of cryptal and pericryptal EC, that therefore could be taken as a relevant parametar in determination of coming premalignant transformation of mucosa. EC in dysplastic lesions in flat bowel mucosa are not of neoplastic nature, since there were no cell and distribution atypia.

LITERATURA

1. **Pearse AGE.** *The cytochemistry and ultrastructure of polipeptide hormone producing celle of the APUD series and the embryologic, physiologic and pathologic implication of the concept.* J Histochem Cytochem 1969; 17:303-313.
2. **AndrewA.** *Furter evidence that enterochromaffin cells are not derived from the neural crest.* J Embryol Exp Morphol 1974;31:589-598.
3. **Aubock L, Hofler H.** *Extraepithelial intraneural endocrine cells as starting points for gastrointestinal carcinoid.* Virchows Arch A 1983; 401:17-33.
4. **Aubock L, Ratzenhofer M.** *"Extraepithelial enterochromaffin cell-nerve-fibre complex" in the normal human appendix, and in neurogenic appendicopathy.* J Pathol 1982; 136:217-226.
5. **Hofler H, Denk H.** *Immunohistochemical demonstration of cytokeratin in gastrointestinal carcinoids and their probable precursor cells.* Virchows Arch A; 1984;235-240.

6. **Solcia E, et al.** *Endocrine cell of the digestive sistem.* In Johnson LR (Ed). Physiology of the gastrointestinal tract, Vol. 1, 2nd ed. New York: Raven Press, 1987: 111.
7. **Polak JM, Bloom SR.** *Neuroendocrine neoplasms and regulatory peptides. in: Polak JM, and Bloom SR: Endocrine Tumours. The pathobiology of regulatory peptide-producing tumours.* Churchill Livingstone. Edinburgh, London, New York 1985; 1-20.
8. **Sundler F, Aluments J, Hakanson R.** *Peptides in the gut with dual distribution in nerves and endocrine cells. In: Bloom SR. Gut hormones.* Churchill Livingstone. London and New York. 1978; 406-410.
9. **Papdaki L, Dhillon AP, Rode J, Stockburgger R, Moss E, Cotton PB.** *Gastric mucosal endocrine proliferation in pernicious anaemia (absract).* J Pathol 1985; 145:89a.
10. **Rubin CE, Haggitt RC, Burmer GC, Brentnall TA, Stevens AC, Levine DC, et al.** *DNA aneuploidy in colonic biopsies predicts future development of dysplasia in ulcerative colitis.* Gastroenterol 1992; 103: 1611-1620.
11. **Brown DC, Cole D, Gatter KC, Mason DY.** *Carcinoma of the cervix uteri: An assesment of tumour proliferation using the monoclonal antibody Ki67.* Br J Cancer 1988;57:178-181.
12. **Dodd SM.** *Chronic ulcerative colitis complicated by atypical carcinoid tumor.* J Clin Pathol 1986; 39: 913-916.
13. **Van den Ingh H, Van den Broek L, Verthofstad A.** *Neuroendocrine cells in colorectal adenomas.* J Pathol 1986: 148:231-237.
14. **Gledhill A, Enticott M, Howe S.** *Variation in the argyrophil cell population of the rectum in the ulcerative colitis and adenocarcinoma.* J Pathol 1986; 149:287-291.
15. **Newmark HL, Lipkin M.** *Calcium, vitamin D, and colon cancer.* Cancer Res 1992;52:2067s-2070s.
16. **Radović S.** *Definicija morfoloških kriterija za dijagnosticiranje displastičnih promjena u sluznici debelog crijeva.* Rad 1989; Sarajevo.
17. **Barrett P, Hobbs RC, Coates PJ, Risdon RA, Wright NA, Hall PA.** *Endocrine cells of the human gastrointestinal tract have no proliferative capacity.* Histochemical Journal 1985;27:482-486.

REFERATI

IZLAGANI NA SIMPOZIJUMU:

PRIONI KAO UZROČNICI SPONGINOZNE ENCEFALOPATIJE (KRAVLJEG LUDILA) LJUDI I ŽIVOTINJA: STANJE I PERSPEKTIVE U BOSNI I HERCEGOVINI

(Sarajevo, 01. 11. 2001. godine)

ANU BiH АНУ БиХ

ANU
BiH
АНУ
БиХ

Molekularna biologija u medicinskim temama

Ljubomir Berberović[1)]

U sjajnoj intelektualnoj shemi Jacquesa Monoda, koja je ubjedljivo vladala naučnim umom od početka sedamdesetih godina naovamo, dva tipa bioloških makromolekula nukleinske kiseline i bjelančevine, dobijaju strogo odijeljene uloge u procesima života. Dok su prve zauzele mjesto nosilaca invarijantne reprodukcije, drugima je u cjelini ostavljena biokatalitička funkcija, funkcija presudna za osiguranje adaptivne, svrhovite konstitucije živih bića. Remek-djelo nauke XX vijeka, izuzetno plodonosna teorija genetičke informacije, apsorbuje ovu ingenioznu shemu, prema kojoj su dvije ključne opšte odlike života, ponovljivost i promjenljivost, dobile svaka svog molekularnog nosioca.

Međutim, molekularna biologija, naučna grana koja svojim pečatom vitno obilježava čitavu drugu polovinu XX stoljeća, nastavila je da neumorno isporučuje nova saznanja fundamentalnog značaja. Tokom posljednjih dvadeset godina njenog munjevitog razvoja pojavljuju se dva daljnja kapitalna otkrića o prirodi i faktorima životnih procesa. Cech i Altman, kao što je čest slučaj u istoriji znanosti, istovremeno i nezavisno jedan od drugoga, našli su prve dokaze o principijelno novoj klasi biokatalizatora, a to su nukleinske kiseline. Bjelančevine, dakle, nisu jedini aktivni činilac biohemijske katalize, jedina kategorija teleonomskih molekula u živom svijetu. Katalitičke funkcije pripadaju i na kleinskim kiselinama; one također neposredno sudjeluju u determinaciji svrhovitosti živih sistema.

Druga fundamentalna spoznaja, koja će ubrzo opet potresti cijelu savremenu naučnu sliku živog svijeta i njegovih temeljnih organizacijskih i funkcionalnih osobina, privukla je punu pažnju svjetske javnosti sa nailaskom pandemije spongiformne encefalopatije goveda, koja je počela harati Velikom Britanijom sredinom osamdesetih godina prošlog stoljeća. Tada je, odjednom, široko odjeknula teorija američkog biohemičara i neurologa, Stanleya B. Prusinera, da izvjesne poznate degenerativne bolesti centralnog nervnog sistema ljudi i životinja, a među njima i "kravlje ludilo" imaju neobičnog

[1)] Redovni član ANUBiH

uzročnika, bez ikakve nukleokiselinske komponente. Prusiner tim zagonetnim patogenim česticama nadijeva ime prioni. Njegova teorija podrazumijeva da su prioni, kao bjelančevinske molekule, obdareni sposobnošću identične reporukcije, odnosno da funkcija invarijantnosti živih sistema ne leži isključivo na nukleinskim kiselinama. Iako postoje i alternativna objašnjenja prionskog fenomena, Prusinerova teorija raspolaže zavidnim fondom istraživačke argumentacije i nesumnjivo je prihvaćena u najvećem dijelu globalnog znanstvenog establishmenta.

Osim što implicira autoreproduktivnost proteina, pa time iziskuje promjene u samim temeljima savremenog naučnog shvatanja života, prionska teorija se tiče i sve izraženijeg medicinsko-epidemiološkog problema, problema degenerativnih spongiformnih encefalopatija. Iz oba ova razloga, zagonetka priona ušla je na velika vrata u središte preokupacija vrhunske svjetske nauke. Današnji skup o prionima i prionskim bolestima u Akademiji nauka i umjetnosti Bosne i Hercegovine ohrabrujuće je svjedočanstvo da se i ovdje, uprkos svim ograničenjima, pažljivo prati aktuelna biomedicinska problematika, kao i opšti napredak biomedicinskih znanja u svijetu.

ANU BiH
АНУ БиХ

Istraživanje humanih prion bolesti i mogućnosti rane dijagnostike nove varijante Creutzfeldt-Jakobove bolesti (nv CJB)

Đemo Subašić[1)]

Uvod

Creutzfeldt i Jakob su 1920. odnosno 1921., prvi put opisali slučajeve spongioformne encefalopatije kod ljudi. Kasnije je ova pojava nazvana Creutzfeldt-Jakobova bolest (CJB). Uobičajena patološka osobenost kod CJB a i drugih sličnih oboljenja (Kuru, Gerstmann-Strassler-Scheinker sindrom ili GSS, Fatal familial insomnia ili FFI) uočena prilikom pregleda tkiva mozga svjetlosnim mikroskopom je vakuolizacija sive moždane mase (spužvasti izgled).

Davne 1954. godine Sigurdson i suradnici ova oboljenja nazvali spore virusne infekcije (slow virus infections). Već 1966. Alper je pretpostavio da bi kritična komponenta najvećeg infektivnog agensa, uzročnika spongioformne encefalopatije mogao biti protein. Prusiner je 1982. godine heretički postavio PRION teoriju, odnosno, da se radi o proteinskim infektivnim partikulama (bez prisustva nukleinske kiseline), rezistentnim na uobičajene procedure inaktivacije, različitim od svih do tada poznatih patogena. Prion protein (PrP) prisutan je naime, kod svih sisara. Kod čovjeka PrP gen, koji kodira prion protein nalazi se na 20-tom hromosomu. PrP ima 253 amino kiseline, a ekspresija PrP gena ustanovljena je u neuronima, plućima, srcu, bubrezima, pankreasu, testisima, tonzilama, leukocitima. Kako uopće dolazi do spongioformne encefalopatije? Pod do sada ne razriješenim okolnostima dolazi do stvaranja malignih PrP molekula (PrPm) koje se razlikuju od normalnih PrP molekula (PrPn) po trodimenzionalnoj strukturi (konformaciji) te ekstremnoj rezistentnosti na proteaze.

Usprkos intenzivnim istraživanjima ni do danas nije utvrđena etiologija spongioformne encefalopatije ili prion bolesti kod ljudi i životinja, niti način

[1)] Institut za mikrobiologiju, imunologiju i parazitologiju Kliničkog centra Univerziteta u Sarajevu

prevencije. Sve prion bolesti su fatalne, a glavna karakteristika je akumulacija enormnog broja PrP molekula u centralnom nervnom sistemu. PrPm molekule nastaju od PrPn molekula na za sada nepoznat način i to njihovom čudesnom interakcijom (PrPm $\longleftrightarrow$ PrPn $\longrightarrow$ PrPm). Ostala je zagonetka kako, na koji način i pod kakvim okolnostima dolazi do pojave prvih malignih PrP molekula? Neki smatraju da je to uzrokovano specifičnim mutacijama PrP gena. Međutim nije dokazana niti virusna , niti virino niti prion teorija o nastanku spongioformne encefalopatije. Danas se također pouzdano zna da prve PrPm molekule nastaju u limfnim čvorovima (tonzilama npr.) i slezeni te da se prenose na ostale dijelove organizma putem krvi i to njihovim specifičnim vezivanjem za krvni protein plazminogen. Zašto to svojstvo vezivanja nemaju PrPn molekule nije do sada razjašnjeno. Plazminogen je prekursor plazmin enzima, sintetiše se u jetri i leukocitima. Mehanizam prenošenja PrPm molekula pomoću plazminogena, sigurno je jedan od ključnih momenata bitnih za razumjevanje inicijacije i kliničkog toka spongioformne encefalopatije, jednake kao što je to i konverzija PrPn molekula u maligne isoforme otporne na proteaze (Prusiner et al., 1992.; Prusiner, 1991. Fisher et al., 2000.).

Nova varijanta CJB (nvCJB)

Klasične forme CJB (sporadična, nasljedna i patogena) su rijetke fatalne neurodegenerativne bolesti prisutne svugdje u svijetu. 1996. godine u Engleskoj je identificirana tzv. nova varijanta CJB(nvCJB) koja je za razliku od klasičnih oblika CJB karakteristična za mlađe ljude, čak i tinejdžere (od 15 do55 godina). Simptomi nvCJB su sasvim specifični a smatra se da je nastala konzumiranjem inficiranog goveđeg mesa. Dakle nvCJB i CJB spadaju u tzv.prenosive spongioformne encefalopatije.

Možda prije samo godinu dana analiza tkiva mozga (autopsija) uzetog dakle post mortem bila je jedini način da se uspostavi definitivna dijagnoza nvCJB. Međutim, danas se raspolaže sa testovima za rano otkrivanje PrPm molekula i to prije pojave bilo kakvih simptoma kod čovjeka.

Naime, otkriveno je da se prve PrPm molekule počinju nakupljati u tonzilama i to samo u slučaju nvCJB ali ne i kod klasičnih oblika. Također je i u uzorcima urina moguće utvrditi PrPm molekule pomoću odgovarajućih imunoloških testova. Sve to je omogućilo ranu dijagnostiku nvCJB što predstavlja fantastičan napredak. Naravno to podrazumjeva i analizu PrP gena i utvrđivanje specifičnih patoloških mutacija osobito kada je riječ o 129 kodonu. Razvojem metoda prečišćavanja krvi u cilju eliminacije PrPm molekula (prion bolesti se prenose transfuzijom, hirurškim zahvatima), sterilizaciji medicinskih instrumenata, pronalaženjem medikamenata koji spriječavaju PrPn $\longrightarrow$ PrPm pretvorbu stvorili bi se uslovi za kontrolu i preventivnu terapiju u

slučajevima nvCJB. Zbog velikog broja suspektnih slučajeva nvCJB u Engleskoj, Njemačkoj i Francuskoj sve ove navedene mogućnosti su u fazi istraživanja u okviru odgovarajućih istraživačkih projekata.(Kretzschmar et al., 1996. Collings et al.,1996.)

Tabela 1. *Dijagnoza nvCJB u različitim kliničkim fazama podrazumjeva interdisciplinaran pristup.*

	nvCJB	Dijagnostički kriteriji	Profil stručnjaka neophodan za konačnu dijagnozu
A	Nisu uočljivi bilo kakvi klinički simptomi	- Detekcija PrPm molekula - Mutacije PrP gena	Patolozi, imunolozi, molekularni biolozi...
B	Istražena simptomatologija	- Psihijatrijski kriteriji - Neurološki kriteriji + A	Psihijatri, neurolozi, patolozi,imunolozi, molekularni biolozi...
C	Post mortem dijagnoza	Elektronsko-mikroskopski kriterij za nvCJB +A +B	Psihijatri, neurolozi, patolozi, elektronski mikroskop, imunolozi, molekularni biolozi...

Metodologija istraživanja humanog prion proteina (PrP) i PrP gena

Analizom tkiva mozga uzetog (post mortem) biopsijom od pacijenata koji su bili oboljeli od nvCJB, pomoću elektronskog mikroskopa moguće je utvrditi specifične patološke spongioformne promjene. Međutim, pomoću imunoelektronske mikroskopije moguće je ustanoviti reakciju fibrila i membranskih struktura (plazma i vezikularne membrane) sa anti- prion protein (PrP) antitijelima.

Amiloidni fibrili su neobično usko vezani za abnormalne membrane što ukazuje na izvjestan odnos između PrP fibrilogeneze i promjena membrana. Ovi ultrastrukturalni nalazi omogućili su da se dođe do odgovarajućih kriterija za razlikovanje nvCJB od klasičnih CJB-tip specifičnih plakova. Ovi nalazi u izvjesnom smislu idu u prilog hipotezi o različitim "prion sojevima". (Fournier et al., 2000.).

Otkriće mutacija u kodirajućem regionu PrP gena navelo je naučnike na drugačiji način razmišljanja jer je ustanovljena njihova čvrsta veza sa pojavom PrPm molekula. Dakle prion bolesti nastaju kao posljedica poremećaja PrP gena iz nepoznatih razloga. Prion protein kodiran od takvog gena odgovoran je za transfer bolesti. Danas se kod svih pacijenata psihijatrijskim i neurološkim poremećajima ozbiljno uzima u razmatranje diferencijalna molekularna dijagnostika odnosno istraživanjem PrP gena.

DNA ekstrakcija

QIAamp Blood Kit (Qiagen, Hilden, Germany) - za uzorke krvi.
QIAamp Tissue Kit (Qiagen) - za uzorke tkiva.

Sve ekstrakcione procedure se izvode prema upustvu firme proizvođača.

Detekcija mutacija

PCR amplifikacija kodirajuće oblasti PrP gena uz korištenje specifičnih detekcionih primera.

Detekcija PCR produkAta vrši se u 1% agaroznom gelu za identifikaciju insercionih i delecionih mutacija.

SSCP - Single Strand Conformational Polymorphism.

Elucija PCR produkata iz gela QIAEX II procedurom, reamplifikacuja 4 overlapping fragmenta korištenjem slijedećih primera :

Fragment 1.

5' - CTGACATTCTCCTCTTC - 3'

5' - CGGGTTGCCTCCAGGGCT - 3'

Fragment 2.

5' - CCTGGAGGATGGAACAC- 3'

5 - GTAGCCGCCAAGGCCCC - 3'

Fragment 3.

5'- TGGCACCCACAGTCAGT-3'

5' - TTCTCCCCCTTGGTGGT - 3'

Fragment 4.

5'- CGTGAAAACATGCACCG - 3'

5'- CCTCAAGCTGGAAAAG - 3'

ANU BiH АНУ БиХ

Primeri za amplifikaciju fragmenata PrP gena 1 i 2 su neradioaktivno obilježeni sa fluorescirajućim bojama IRD - 41 dok su primeri za 3 i 4 fragment obilježeni sa digoksigeninom (DIG). Detekcija fragmenata 1 i 2 se vrši digitalnim vizueliziranjem pomoću automatskog sistema za sekvenciranje tokom elektroforeze. DIG - obilježeni produkti se blotiraju nylon membrane (kontakt bloting) i vizueliziraju pomoću anti-DIG antitjela konjugiranih sa alkalnom fosfatazom i odgovarajućeg supstrata.

Analize mutacija

Kada se pomoću SSCP tehnike utvrdi prisustvo mutacija onda se te mutacije analiziraju da bi de tačno vidjelo o kakvim se promjenama radi. To se može vršiti na slijedeće načine:

RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism-Polimorfizam restrikcionih fragmenata DNA).

PCR produkti se analiziraju digestijom sa restrikcionim enzimima specifičnim za pojedine kodone PrP gena (Wu et al., 1987.).

Direktno sekvenciranje

Kompletna PrP kodirajuća oblast se sekvencira na slijedeći način :

Purificirani PCR produkti se reamplificiraju korištenjem 895 Wta primera (5' - TGTAAAACGACGGCCAGTTCTCCTCTTCATTTTGCAGAG - 3') i 896 Wta primera (5'- CAGGAAACAGCTATGACCCTCAAGCTGGAAAA-AAGATTAG - 3').

Uslovi PCR amplifikacije su jednaki kao i za genomsku PrP amplifikaciju (genomska DNA) sa 20 ciklusa.

Purifikacija reamplificiranih PCR produkata.

Sekvenciranje pomoću Thermo sequenase i 5' IRD - 41 obilježenih primera (5'- TGTAAAACGACGGCCAGT- 3') ili rev (-29) primera (5'- CAGGAAACAGCTA TGACC - 3').

Sekvenciranje pomoću automatskog sekvencera ABI PRISM (Windl et al., 1999.)

Institut za mikrobiologiju, imunologiju i parazitologiju -KCU Sarajevo je nosilac projekta ANUBiH pod naslovom Istraživanje humanog prion proteina (PrP) i PrP gena u okviru kojeg su planirana elektronsko-mikroskopska , imunološka i molekularno-biološka istraživanja. Realizacijom ovog projekta BiH bi zasigurno ušla u svjetske tokove iz istraživanja u oblasti priona, a također bi bila realno moguća rana dijagnostika nvCJB.

Literatura

1. **Collinge, J., Sidle, K.C.L., Meads, J., Ironside, J., Hill, A.F., (1996):** *Molecular analysis of prion strain variation and the aetiology of "new variant" CJD,* Nature 383:685-690.
2. **Fisher, M.B., Roeckl, C., Parizek, P., Schwarz, H.P. and Aguzzi, A., (2000):** *Binding of disease-associated prion protein to plasminogen,* Nature 23, p479-483.
3. **Fournier, J.G., Kopp,N.,Streichenberger, N., Escaig-Haye, F., Langeveld, J. and Brown, P., 2000.:** *Elecron microscopy of brain amyloid plaques from a patient with nvCJD,* Acta Neuropathologica 99, 637-642.
4. **Kretzschmar, H.A., Ironside, J.W., DeArmond, S.J., Tateishi, J., (1996):** *Diagnostic criteria for sporadic Creutzfeldt - Jakob disease,* Arc Neurol 53:913 - 920.
5. **Prusiner, S.B. , Collinge, J., Powel, J. and Anderton, B., (1992):** *Prion diseases of Humans end animals,* Ellis Harwood, 1992.
6. **Prusiner, S.B., (1991):** *Molecular biology of prion diseases,* Science, vol. 252, 1515-1522.

7. **Sutherland, K., Barrie, C. and Ironside, J.W., (1994):** *Automatic quantification of amyloid plaque formation in human spongioform encephalopathy,* Neurodegeneration 3, 293-300.
8. **Windl,O., Giese,A., Schulz-Schaeffer, W., Zerr, I., Skworc, K., Aremdt, S., Oberdieck, C., Bodemer, M., Poser, S. and Kretzschmar, H.A. (1999):** *Molecular genetics of human prion diseases inGermany,* Human genetics 105:244-252.

ANU
ВіН
АНУ
БиХ

Neuropsihijatrijski poremećaji izazvani prion-proteinima

Slobodan Loga[1)]

Sažetak. Prionske bolesti su fatalni, zarazni i neurodegenerativni poremećaji. Etiološki faktor je visoko rezistentan na dezinfekciju i sterilizaciju i realizuje se kod životinja i ljudi. Pretpostavlja se da je bolest primarno manifestna kod ovaca i goveda, te da se putem hrane prenosi na čovjeka. Prionske bolesti su uzrokovani jedinstvenim etiološkim faktorom, koji injicira infekciju bez inflamatornog odgovora organizma. Infektivni agens je manji od virusa i za razliku od drugih patogenih uzročnika ne sadrži DNK ili RNK. Tiha inkubacija traje u rasponu od par mjeseci do četrdeset godina. Prionska bolest se manifestuje kod životinja i ljudi. U ovom radu opisani su pretežno neuropsihijatrijski aspekti prionske bolesti kod ljudi, posmatrani iz ugla psihijatrije. Pronalazak uzročnika prionske bolesti navelo je pojedince da spekulišu o mogućnosti da su prioni, moguće, uključeni u nastanak drugih neurodegenerativnih oboljenja kod čovjeka.

Ključne riječi: Prioni. Prionska bolest. BSE. Creutzfeldt-Jakobova bolest (CJD). Nova varijanta CJD (nvCJD). Kuru. Fatalna familijarna insomija (FFI). Gerstmann-Straussler-Scheinkerova bolest (GSSD).

Uvod

Prionske bolesti su hronična, progresivna i uvijek fatalna neurodegenerativna oboljenja životinja i ljudi. Uzrokovani su infektivnim agensom koji se sporo reprodukuje u dugom inkubacionom periodu, sve do pojave karakterističnih manifestacija oboljenja.

Bovina spongiformna encefalopatija (BSE) je prvo dijagnostikovana kod stoke u Velikoj Britaniji 1986. godine (1). Početak bolesti se ispoljava uznemirenim i agresivnim ponašanjem oboljele životinje, što je uslovilo pežorativno ime "kravlje ludilo", premda bi adekvatniji naziv bio "bolest ludih proteina". Tada je postavljena sumnja da je bolest uzrokovana ishranom stoke, koja je pripravljena od proteina. Zabrana upotrebe stočne proteinske hrane dovela je do drastičnog pada oboljenja goveda. Tako, od 36.680. oboljele stoke u 1992. u Velikoj Britaniji je pao 2000. godine na manje od 1500. (2). Uprkos tome, opasnost i dalje prijeti zemljama Evrope. Između 1989 i 2000. godine, utvrđena su 1642 slučaja BSE kod stoke u Belgiji,

[1)] Dopisni član ANUBiH

Danskoj, Francuskoj, Njemačkoj, Irskoj, Italiji, Lihtenštajnu, Holandiji, Portugalu, Španiji i Švajcarskoj (3). U Bosni i Hercegovini do sada nije dijagnostikovan niti jedan slučaj BSE.

Etiologija

Prionske bolesti su uzrokovani prionima, jedinstvenim etiološkim faktorom, koji injicira infekciju mozga, bez inflamatornog odgovora organizma. Prioni su infektivni proteini manji od virusa i, za razliku od drugih patogenih uzročnika, ne sadrže DNK ili RNK. Jedina poznata njihova komponenta je abnormalno formirani protein. Prioni se repliciraju transformacijom normalnog ćelijskog prion proteina u aberantni izomorfni protein. Na taj način dolazi do akumulacije priona u mozgu, što rezultira pojavom psihičkih poremećaja i neuroloških ispada. Kod ljudi na hromozomu 20 može nastati mutacija, koja je okidač za transformaciju proteina u ovaj izomorfni protein.Tiha i češće spora inkubacija traje u rasponu od par mjeseci do četrdeset godina.

Neuropatološki nalaz

Neuropatološki nalaz prionskih bolesti je karakterističan, ali zavisi od stadija bolesti kada se vrši analiza i od još nekih, za sada, nepoznatih faktora, pa je moguće naći na obdukcionom materijalu slijedeće (4):

- atrofija moždanog tkiva se nalazi u rasponu od toga da je uopšte nema, pa do veoma izraženih formi,
- od minimalnog do veoma izraženog gubitka neurona,
- od rijetkih do veoma raširenih vakuola, ili spongiformnih promjena moždanog tkiva (odatle naziv " spongiformna encefalopatija"!),
- od umjerene do teške reaktivne astrocitne glioze i
- od nepostojanja do izražene pojave PrP amiloidnih plakova.

Epidemiologija

I pored velikog broja inficiranih životinja, rizik prenosa infektivnog agensa na ljude je relativno mali. Tako, taj rizik u Velikoj Britaniji, koja je najugroženija država na svijetu, iznosi jedan slučaj na 10 milijardi konzumiranih porcija govedine (5). Učestalost pojedinih formi prionske bolesti su dati u okviru opisa tih različitih, kliničkih formi oboljenja.

Dijagnoza

Prioni se akumuliraju u nervnom tkivu, što praktično čini nemogućim dijagnostikovanje bolesti za života pacijenta, jer je potrebno uzeti uzorak mozga, kako bi se oboljenje laboratorijski potvrdilo. Aktuelno, u razvoju su dijagnostičke metode, odnosno tehnike verifikacije poremećaja in vivo, ali

one još nisu dobile svoju rutinsku i masovniju aplikaciju u praksi. Danas je evidentan i urgentan zahtjev za brzim, u toku života primjenjljivim, testom priona kod ljudi i životinja.

Klasifikacija

Prionske bolesti kod ljudi se ispoljavaju kao:
- Creutzfeldt-Jakobova bolest (CJD)
- Nova varijanta CJD (nv CJD)
- Kuru
- Fatalna familijarna insomija (FFI)
- Gerstmann-Straussler-Scheinker sindrom (GSSS)

Creutzfeldt-Jakobova bolest (CJD)

Creutzfeldt-Jakobova bolest (CJD) se u novijoj literaturi dijeli na naslijednu, infektivnu i sporadičnu. Istovremeno se izučava u neurologiji i psihijatriji, jer su kod nje paralelno zastupljeni i psihijatrijski simptomi i neurološki znaci. Mada je danas Creutzfeldt-Jakobova bolest (CJD) veoma aktuelna i u fokusu pažnje naučnih krugova i javnosti, otkrivena je davno još 1920. godine. Smatra se da aproksimativno 85% od svih slučajeva prionske bolesti ljudi pripada sporadičnoj Creutzfeldt-Jakobovoj bolesti (CJD). Jatrogrena ili infektivna transmisija CJD dešava se transplantacijom tkiva, ekstrakcijom hormona štitne žljezde od kadavera i putem hirurških instrumenata. Incidencija CJD iznosi jedan slučaj na milion stanovnika. Međutim, incidencija među ljudima od 60 do 74. godine života je znatno veća i iznosi - pet na milion ljudi (6).

CJD uključuje širok spektar kliničkih manifestacija, koje se karakterišu pojavom kognitivnih poremećaja i neuroloških znakova. Najčešće su izraženi:
- demencija,
- ataksija,
- insomnija,
- paraplegija,
- parestezije i
- devijantno ponašanje.

Neurološki nalaz obuhvata: spazam, mioklonus, hipertonus i slabost mišića, pojavu patoloških refleksa, ispade u vidnom polju (sljepoća), koje pacijent ne primjećuje, poremećaj vizuelno-spacijalne percepcije (poremećaj koordinacije - cerebelerna ataksija).

U psihičkom nalazu dominiraju simptomi poremećaja viših kortikalnih funkcija: pažnje, pamćenja, mišljenja, svijesti i inteligencije (demencija).

Od laboratorijskih testova kod CJD najpouzdaniji je elektro-encefalogram, gdje se nalaze učestala, visoko-voltažna, trifazična i polifazična oštra pražnjenja (u poodmaklim slučajevima), koja mogu biti i prolazna.

Tok je progresivan i smrt nastupa do 14 mjeseci nakon prvih manifestacija bolesti.

Nova varijanta Creutzfeldt-Jakobove bolesti (nvCJD)

Premda ima ubjedljivih argumenata da je ovaj entitet posebna bolest, ipak je, za sada, udomaćen naziv nova varijanta CJD (nvCJD).

Tabela 1. *Razlike između nvCDJ i CJD*

	nvCJD	CJD
naslijeđe	ne	da
transmisija	od životinja (BSE)	od ljudi - transplantacija (kornea, dura) ekstrakcija hormona sa kadavera i hirurški instrumenti
dob početaka bolesti (prosjek)	29. godina	57 - 62. godine
tok	<1. godine	do 14 mjeseci
simptomi (rani)	senzorni poremećaji, povlačenje u sebe, anksioznost i depresija	ataksija
simptomi (zatim)	neurološki	progresivni cerebelarni, zaboravnost, apatija, gubitak tjelesne težine, blaga insomnija
simptomi (kasnije)	progresivna demecija mioklonus	
simptomi (pred smrt)	akinetički mutizam, kortikalna sljepoća	
EEG	promjene nisu karakteristične	karakterstične

Podudarnost prostorne i vremenske distribucije slučajeva nvCDJ i BSE, ukazuje na vjerovatnoću da su BSE prioni transferisani u ljudsku populaciju i da su time i uzrok nvCJD. Mada je, do sada, opisano nešto više od 100 slučajeva nvCDJ, nije moguće utvrditi razlike, prema načinu ishrane, između pacijenta i zdravih osoba. Također, nije jasno zašto su naročito osjetljivi mlađi na ovu bolest (7). Postoji razlika u mnogim aspektima između CJD i nove varijente CJD, ali na kliničkom planu treba istaći da psihički simptomi su u početku dominantni kod CJD, a neurološki kod nove varijanta CJD, da bi na kraju efekat bio isti (Tab. 1).

Kuru

Kuru je opštepoznata prionska bolest kod ljudi. Prenosi se ranije praktikovanim ritualnim kanibalizmom u Novoj Gvineji. Više od 2600 ljudi,

pretežno djece i žena je umrlo od ove bolesti (2). Danas je zabranjen kanibalizam u Novoj Gvineji i sada nema ove bolesti na tom lokalitetu.

Gerstmann-Straussler-Schienkerova bolest (GSSD)

Ova forma prionske bolesti je dominantno nasljedna uzrokovana mutacijom autosomalnog dominantnog hromozoma. Nema dokaza da se bolest prenosi po nekom drugom tipu transmisije. Ovo oboljenje je veoma rijetko, incidencija je 1:milijardu stanovnika u toku jedne godine. U svijetu je ustanovljeno da se bolest pojavila, do sada, kod 43 porodice (2).

Fatalna familijarna insomnija (FFI)

I ovaj oblik prionske bolesti je nasljedan. Nastaje mutacijom u prion protein genu i nema dokaza da se vrši po nekom drugom tipu transmisije. Vrlo je rijetka, te je ustanovljeno da se, do sada, javila kod 17 porodica u svijetu (2). Kod ovog oboljenja dolazi do oštećenja talamusa i poremećaja ciklusa spavanja.

Liječenje

Nema imunizacije protiv prionskih oboljenja, a i tretman je nepoznat.

Prevencija

S obzirom da nema efikasnog liječenja ove bolesti, praktično, jedina mogućnost izbjegavanja prionske bolesti je dobro organizovana prevencija na nacionalnom planu. Ona treba da uključi: zabranu uvoza mesa i mesnih prerađevina iz zemalja, u kojima se bolest već javila kod životinja i ljudi. Zatim, monitoring životinja, koje su izložene najvećem riziku razboljevanja. Pored toga, potrebna je zabrana upotrebe proteina sisara za ishranu životinja. Takođe, treba zahtijevati od centara za transfuziju da ne koriste krv donatora, koji su boravili šest ili više mjeseci u Velikoj Britaniji između 1980. - 1996. godine. Konačno, neophodno je stimulisati naučno-istraživački rad veterinarskih i medicinskih stručnjaka koji se bave problemom prionskih oboljenja. Preventivne mjere uključuju zaštitu medicinskog osoblja od infekcije, kao i provođenje mjera eliminacije prenošenja infektivnog agensa putem hirurških instrumenata, transplantacijom moždanog tkiva i kornealnog transplantata.

Implikacije saznanja o postojanju prionske bolest

Otkriće da prioni i nasljedni faktori mogu uticati na pojavu degeneracije moždanog tkiva uticalo je da se brojne naučno-istraživačke laboratorije usmjere ka traženju uzroka nastanka i drugih neurodegenerativnih oboljenja, kao što su: Azheimerova bolest, Parkinsonova bolest, amiotrofična lateralna skleroza, Huntingtonova bolest i spinocerebelarna ataksija. Velika pažnja je

posvećena abnormalnom procesiranju neuronalnih proteina kod ovih oboljenja. Šak šta više, pojavile su se i spekulacije o "spektru degenerativnih oboljenja", koji uključuje shizofreniju, bipolarni afektivni poremećaj, autizam i narkolepsiju. Međutim, nažalost do danas nema pouzdanih dokaza da se i navedena oboljenja uklapaju u koncept prionske bolesti.

Summary

Prion diseases are infectious, fatal and neurodegenerative disorders. The etiological factor is highly resistant to desinfection and sterilization processes. It is realized in animals and humans. Prion diseases are primarily manifested among cattle and sheeps. These infectious agents are smaller than viruses and, unlike any other pathogens, contain no DNA or RNA. The silent incubation period ranges from months to 40 years. Prion diseases are manifested in animals and humans. In this article are described dominantly neuropsychiatric aspects of prion diseases in human, from a specific point of the psychiatry. The discovery of prions were followed by speculations about explanation of other neurodegenarative disorders in humans.

Key words: Prions. Prion disease. BSE, Creutzfeldt-Jakob disease (CJD). New variant CJD (nvCJD). Kuru. Fatal familiar insomia (FFI). Gerstmann-Straussler-Scheinker disease (GSSD).

НУ ВиН АНУ БиХ

Literatura

1. **Wells, G. A., Scott, A. C., Johson, C. T. et al.:** *A Novel Progressive spongiform encephalopathy in Cattle,* Vet. Rec., 121: 419-420, 1987.
2. **Prusiner, S. B.:** *Neurodegenerative Diseases and Prions,* N. Engl. J. Med., 344: 1516-1526, 2001.
3. **Bosch , X.:** *European Concern Over BSE transmission,* JAMA, 285(4): 397-398, 2001.
4. **Seelman, V. M.:** *Prion-Diseases-An Evidence-Based Protocol For Infection Control,* AORN Journal, 69(5): 945- 969, 1999.
5. **Johson R. T., Gibbs, C. J. Jr.:** *Creutzfeldt-Jakob Disease and Related Transmissible Spongiform Encephalopathies,* N. Engl. J. Med., 339: 1994-2004, 1998.
6. **Ironside, J. W.:** *Review: Creutzfeldt-Jakob Disease,* Brain Pathol. 6: 379-388, 1996.
7. **Ghani, A. C., Ferguson, N.M., Donnelly, C. A. et all:** *Predicted nvCJD Mortality in Greit Britain,* Nature, 406: 583-584.

HUMANI OBLICI SPONGIFORMNIH ENCEFALOPATIJA

Jovan Dimitrijević[1)]

Sažetak. Spongiformne encefalopatije su prenosiva neurološka oboljenja, karakterizirana difuznim oštećenjem nervnog sistema, prvenstveno sive mase, duge inkubacije, subakutnog toka i smrtnog ishoda.

Do danas je sigurno poznato pet oblika humanih spongiformnih encefalopatija i to: Morbus Creutzfeldt-Jacob /MCJ/, Kuru, Sindrom Gerstmann-Straussler-Scheinker /GSS/, Porodična fatalna insomnia i Nova varijanta Creutzfeldt-Jacobsove bolesti /nv-MCJ/.

Današnja saznanja povezuju ove bolesti sve više sa infekcijom prionima /infektivni proteinski partikul ili PrP/, pri čemu je veoma važno da ih organizam domaćina ne prepoznaje kao takve, te ne odgovara ni imunom ni upalnom reakcijom, već se sve odvija kao degenerativna promjena.

Dijagnostika prionskih bolesti na osnovu kliničke slike i dopunskih nalaza može biti postavljena kao moguća i vjerovatna /pa i vrlo vjerovatna za MCJ/, ali je sigurna dijagnoza tek nakon neuropatološkog ili imunohemijskog pregleda, a najbolje sa oba.

Dok su prve četiri bolesti relativno rijetke, dotle peta, nv-MCJ, prenosiva sa životinja na ljude, predstavlja potencijalno veliku opasnost oboljevanja znatnog broja stanovništva, tim prije što je inkubacija duga i ne znamo mogući broj bolesnika u budućnosti..

Mogućnost prenošenja bolesti, a za sada bez mogućnosti liječenja iste, učinilo je da su mjere prevencije osnovni i jedini vid zaštite od njih. U tom smislu postoje i preporuke Svjetske Zdravstvene Organizacije, kojih bi se trebali pridržavati i u našoj sredini.

Prva dva slučaja bolesti humanih spongiformnih encefalopatija opisani su prije osamdeset godina, nezavisno od dva istraživača, u razmaku od godinu dana /Creutzfeldt 1920, Jacob 1921/. Smatralo se da se radi o rijetkim degenerativnim bolestima centralnog nervnog sistema. Godinama su se publikovali radovi o pojedinačnim slučajevima, da bi 60-ih godina naglo porastao interes saznanjem da se bolest /Morbus Creutzfeldt-Jacob/ može da prenosi sa čovjeka na čovjeka tokom operativnih zahvata, odnosno prenošenjem transplantata. Tada je nastala teorija da se ne radi o degenerativnim bolestima, već o rijetkim infektivnim oboljenjima, izazvanih "sporim virusima". Pojavom bovine spongiformne encefalopatije i pojavom prvih sličnih oboljenja

1) Neurološka klinika Kliničkog centra, Sarajevo

kod ljudi, te otkrićem priona kao mogućim uzročnikom nastanka svih ovih bolesti, dobili smo potpuno nova saznanja, koja su nam omogućila novi pristup starom problemu.

Subakutne spongiformne encefalopatije su prenosiva neurološka oboljenja ljudi i životinja, veoma duge inkubacije, subakutnog toka i smrtnog ishoda.

Brojnost naziva, tokom vremena, u označavanju ovih oboljenja, pokazuje i sve naše nedoumice u vezi s njima, od prvih naziva spastična pseudoskleroza, presenilna demencija, kortiko-striato-spinalna degeneracija, preko prenosiva demencija, infektivna amiloidoza, te infekcije "sporim virusima", infekcije agensima "sličnim virusima", do izraza "bolesti izazvane nekonvencionalnim agensima" i danas sve više upotrebljavanom terminu, prionske bolesti. /Hauw et al. 1998/.

Prionske bolesti, u današnjem shvatanju tog pojma, bi bile bolesti sa infektivnim agensom, koji bi bio protein samog domaćina. PRION ili infektivni proteinski partikul ili PrP, postaje patogen preko određene modifikacije, a potom sposoban da se razmnožava u odsustvu nukleinskih kiselina /DNA i RNA/. Prionske bolesti se povezuju sa tačkastim mutacijama u određenim kodonima /koji su različiti za različite bolesti/ PRION GENA, što rezultira promjenom rasporeda pojedinih aminokiselina u polipeptidnim lancima prionskih proteina. Ovo podrazumijeva da postoje i normalni ćelijski oblici prionskih proteina koji se dovode u vezi sa formiranjem sinapsi. Prema prion hipotezi, bolest bi nastala konverzijom endogenih normalnih prionskih proteina u patološke oblike, a preduslov za konverziju je kataliziranje ove reakcije od strane patoloških oblika prionskih proteina prisutnih u inokulumu /Dormont 1998/.

Bolesti izazvane nekonvencionalnim agensima ili prionima su prisutne i kod ljudi i kod životinja. Kod ljudi su, do sada, poznate ove bolesti:

Morbus Creutzfeldt-Jacob / Creuzfeldt 1920, Jacob 1921/, koja je prvi put prenešena na primate u toku 1968 godine /Gibbs et al. 1968/.

Sindrom Gerstmann-Straussler-Scheinker /GSS/ /Gerstmann et al. 1936/, pri čemu je uspješna inokulacija urađena od strane Mastersa i sar. 1981 /Masters et al. 1981/.

Kuru, opisana od Gajduseka i Zigas 1957 /Gajdusek and Zigas 1957/, a dokazana prenosivost u toku 1966 godine /Gajdusek et al, 1966/.

Porodična fatalna insomnia /Lugaresi et al. 1986/, a dokazana prenosivost u toku 1995 godine /Collinge et al. 1995/.

Nova varijanta Morbus Creutzfeldt-Jacob /nv-MCJ/, opisana od Will i sar. 1996 godine /Will et al. 1996/, a naredne godine je nazvana Humani oblik bovine spongiformne encefalopatije /Almond and Patison 1997/. Tokom godina je dokazana prenosivost sa životinja na ljude.

Ovome će se možda pridružiti još dvije bolesti, ali to nije još do kraja dokazano i to: Subkortikalna glioza /Neumann/ /Neumann and Cohn 1967/, te Morbus Alpers.

Kriteriji koji bi zadovoljili mogućnost da se jedan određeni oblik spongiformne encefalopatije veže sa infekciju nekonvencionalnim infektivnim agensima ili prionima su različiti, i nemaju svi jednaku dijagnostičku težinu. Kriteriji bi bili slijedeći:

1. *Klinički kriterij.* Klinička slika sastavljena od neuroloških i psihijatrijskih simptoma i znakova; potom progresivno napredovanje bolesti; zatim dopunski nalazi /bilo da su pozitivni, kao EEG ili negativni kao CT, MR ili likvor/; odsustvo znakova druge moguće bolesti. Samo klinički podaci omogućavaju da se postavi moguća i vjerovatna dijagnoza bolesti, uz dopunske nalaze možemo govoriti i o vrlo vjerovatnoj dijagnozi, dok bi za sigurnu dijagnozu trebao i patohistološki ili imunohemijski nalaz zaraženog mozga, a najbolje po mogućnosti oba nalaza. /Hauw et al. 1998/
2. *Neuropatološki nalaz.* Karakteristična je pojava malih šupljina u nervnom tkivu, u prvom redu u području nervnih produžetaka /spongioza/, izražena glioza astrocita, propadanje ganglijskih ćelija, pojava ekstracelularnih amilodinih ostrvaca različite morfologije, te pojava ektracelularnih nakupina priona u nervnom tkivu, što se može dokazati imunohemijskim reakcijama i potvrđuje njihov patološki karakter.
3. *Biohemijski nalaz.* Prion /PrP/ može biti identifikovan imunohemijom /posebno u Western blot-u/ sa svojom otpornošću prema proteinazi K. Nijedan konvencionalan mikroorganizam, nijedan RNA ili DNA infektivni agens nije nađen u nervnom tkivu. Prisustvo priona je kriterij koji se sve više koristi i međusobno povezuje bolesti izazvane nekonvencionalnim agensima. Količina priona nađenih u nervnom tkivu je povezana sa intenzitetom glioze. Izgleda da se PrP može potvrditi imunoblotom i imunohistohemijom u tonzilama ždrijela /Hill et al.1997/.
4. *Genetske karakteristike.* Čini se da postoje izvjesne promjene gena PrP, koje su obično udružene sa infekcijama nekonvencionalnim agensima. To bi posebno bilo izraženo kod porodičnih oblika, koja slijede pravila dominantne autozomalne transmisije, sa čestom jakom penetracijom. Naravno da sve promjene gena PrP ne moraju biti patološke, kao što ni sve afekcije kod osobe koja ima genetske anomalije ne moraju biti prionske bolesti.
5. Bolest je prenosiva na određeni broj osjetljivih osoba. Ovoj poznatoj činjenici treba dodati i neke još uvijek prisutne nejasnoće. Postoji izvjesna, uslovna, "barijera vrste", izražena kao različitost proteina pojedinih vrsta, konkretno čovjeka i životinje. Ovome treba dodati i neobično

dugu inkubaciju, kada se prođe "barijera vrste", a koja traje od nekoliko mjeseci do više godina.

Morbus Creuztfeldt- Jacob (MCJ)

Do sada je najčešći i najbolje poznat oblik od svih bolesti izazvanih nekonvencionalnim agensima.

Oblici:

- sporadični oblik
- porodični oblik
- jatrogeni oblik

Epidemiologija (Alperovitch et al. 1998)

Incidenca sporadičnog oblika iznosi 1-2 oboljela na milion stanovnika. Ovaj oblik čini 85-90% svih oblika MCJ. Javlja se obično između 55 i 75 godina /najveći broj bolesnika između 6o i 65 godina/. Prosječno trajanje bolesti oko 6 mjeseci /za mali broj bolesnika je raspon od nekoliko mjeseci do jedne ili dvije godine/.

Porodični oblik je znatno rjeđi, izazvan genetskom mutacijom, pri čemu su opisane pojedine porodice u nekim zemljama, te dvije veće grupe, jedna u Izraelu, druga u Slovačkoj. Javlja se u 5-10% svih oblika MCJ /Mitrova et al. 1991, Zilber et al. 1991/.

Prava epidemiologija jatrogenog oblika je nepoznata, zna se za slučajeve oboljenja nakon rada sa kontaminiranim hirurškim instrumentima, nakon transplantacije kornee, transplantacije dure mater ili transplantacije hipofize sa kadavera radi korištenja hormona rasta, nakon transplantacije jetre. Misli se da ovi slučajevi iznose manje od 5% oblika MCJ. (Alperovitch et al. 1998).

Klinička slika

Početak: psihičke promjene tipa slabljenja pamćenja propadanja specifičnih, sposobnosti kao što su jezik i praksija, učenje i percepcija, usporenim shvatanjem, teškoće kod rješavanja kompleksnih intelektualnih zadataka, poremećaj prostorno-vremenske orijentacije, poremećaj raspoloženja i afekta.

Na ovakav uobičajen početak bolesti, ubrzo potom, a nekada i paralelno sa psihičkim promjenama se javljaju i neurološki ispadi.

Neurološki ispadi su raznoliki i sastoje se od kortikalne, subkortikalne, cerebelarne i spinalne simptomatologije. Obzirom na način početka bolesti bili su opisani: kortiko-striato-cerebelarni ili "klasični" oblik, oblik sa kortikalnom sljepoćom /okcipitalni oblik/, cerebelarni oblik, talamični oblik, paneencefalitični, te spinalni /amiotrofični/ oblik.

Bez obzira na način početka bolesti, a on može biti različit, sa trajanjem bolesti klinička slika postaje sve više uniformna, odnosno pokazalo se da manje ili više bivaju zahvaćene sve strukture centralnog nervnog sistema. Tako se došlo do podjele na stalne, nestalne i rijetke znake./Castan 1968, May 1968/./.

Stalni znaci: intelektualna deterioracija /"demencija"/ uz konfuzno stanje, do sopora i kome /kortikalno- subkortikalni tip demencije/

- mišićna hipertonija miješanog tipa, sa dominacijom rigiditeta, kao izrazom ekstrapiramidnog poremećaja
- težak poremećaj hoda, u prvom redu kao poremećaj koordinacije /ataksija/ a potom znacima piramidnog i ekstrapiramidnog sindroma
- poremećaj jezika i govora, kao kombinacija fokalnog kortikalnog oštećenja /afazija/ i opšte intelektualne deterioracije i gubitka poriva za govor /mutizam/
- mioklonizmi porijekla iz kortikalnih i subkortikalnih struktura

Nestalni znaci: fokalni deficit, piramidni sindrom, hiperkinezije /horeatični pokreti/ kortikalna sljepoća, cerebelarni ispadi sa dominacijom jake ataksije, aprakso-agnostički poremećaji, "hipertonične" krize

Rijetki znaci: mišićna atrofija, tonično-klonične konvulzije .

Dopunski nalazi:

Najvažniji dopunski nalaz, u početku netipičan, potom veoma karakterističan, posebno u terminalnoj fazi bolesti, je elektroencefalogram čije promjene možemo dati u tri faze:

- početna faza: poremećaj osnovnog ritma sa postepenim usporenjem istog do delta talasa obostrano, moguće više izraženo na jednoj strani,
- potom: znaci paroksizmalne aktivnosti u vidu šiljak-talasa i šiljak talas kompleksa, moguće više izraženo na jednoj strani, a potom te promjene postaju ritmične, i
- terminalno: ritmična paroksizmalna aktivnost uz supresiju osnovne aktivnosti /nalaz veoma karakterističan, pa i tipičan, za ovu bolest/ /Burger et al. 1972, Dimitrijević et al. 1988/

CT i MR: uredni ili pokazuju umjerenu kortikalnu atrofiju /Kovanen et al. 1985/

Likvor: uredan, neki put umjereno povišene ukupne bjelančevine, uz urednu elektroforezu i imunoelektroforezu likvora.

Diferencijalna dijagnoza je sa M. Alzheimer, ali demencija kod MCJ napreduje mnogo brže i i brzo dovodi do ekstremne demencije.

ANU BiH АНУ БиХ

Terapija : MCJ nije oboljenje gdje rana dijagnoza i terapija mogu bitno da promjene tok oboljenja, ali sa ranijim započinjanjem simptomatske terapije, olakšavamo svakodnevni život i bolesniku i njegovoj okolini. Medikamenti služe u prvom redu za kontrolu poremećaja ponašanja, kao jake agresivnosti, a sastoje se od sedativa, antipsihotika i drugih. Obzirom na karakter bolesti, u njenom liječenju, pored zdravstvenih radnika i članova obitelji bolesnika, moraju biti uključeni i socijalni radnici, kao i patronažna služba.

Prognoza bolesti: progresivno i brzo napredovanje demencije, te unutar šest mjeseci ili i manje, bolesna osoba postaje potpuno nesposobna za brigu oko sebe i sa vezanošću za postelju, uz sve veći i teži neurološki deficit.

Uzrok smrti: interkurentna infekcija, popuštanje srca ili respiratorni poremećaj

Način prenošenja: za sporadični oblik nemamo jasnih pokazatelja kako se prenosi. U jednoj skorašnjoj evropskoj studiji je pokazano da kod 14,5% bolesnika sa MCJ je nađena mutacija prion gen proteina, ali je samo 4o% njih imalo pozitivnu porodičnu anamnezu na MCJ. /The EUROCJD Group 2001/

porodični oblik - genetska predispozicija, odnosno redovno mutacija gena proteina priona /Tranchant C. et Warter JM 1998/.

jatrogeni oblik - transplantatom zaraženog materijala,

unosom zaražene krvi /vjerovatno/

Nova varijanta Creutzfeldt-Jacob bolesti /nv-MCJ/

Humani tip bovine spongiformne encefalopatije

Prvi bolesnik sa simptomima i znacima koji su se pokazali kao oblik nv-MCJ je bio u toku januara 1994. godine.

Prvi publikovani radovi o nv-MCJ su u toku 1996. godine /Will et al. 1996, Chazot et al. 1996/. Od juna 1996. godine do juna 2001. godine registrovano 1o1 bolesnik od nv-MCJ u Velikoj Britaniji, tri u Francuskoj i jedan u Irskoj.

Klinička slika

Početak bolesti je obično izražen sa psihičkim promjenama tipa depresije ili apatije, povučenošću u sebe, insomnije, emocionalnom labilnošću, neki put motornim nemirom i insomnijom, gubitkom na tjelesnoj težini, rjeđe promjenama tipa shizofrene psihoze sa halucinacijama. Ovom se redovno pridružuju smetnje senzibiliteta tipa bolova u stopalima, koljenima ili drugim dijelovima tijela, što može da upućuje na reumatološke smetnje, ili tipa disestezija u

rukama i/ili nogama, što može da upućuje na polineuropatske smetnje /pa je kod nekih pacijenata rađen i EMG/./Zeidler et al. 1997a/

Klinički tok. Jasni neurološki ispadi će se pojaviti tek za nekoliko mjeseci /u prosjeku za oko šest mjeseci/ po početku bolesti. Za čitavo vrijeme do tada su u prvom planu psihičke promjene i smetnje senzibiliteta. Od neuroloških disfunkcija se obično prva javlja ataksija cerebelarnopg tipa, potom bolest brzo napreduje sa globalnim kognitivnim oštećenjem, nevoljnim pokretima, urinarnom inkontinencijom, progresivnom sve manjom pokretnošću, do nepokretnosti, kao i gubitkom verbalnog kontakta sa okolinom /afazija,mutizam/. U terminalnoj fazi su bolesnici sa akinetskim mutizmom i kortikalnom sljepoćom. Ovaj drugi stadij, sa neurološkim znacima, traje u prosjeku oko 6-8 mjeseci do fatalnog završetka pacijenta. (Zeidler et al. 1997 b)

Terminalni stadij sa teškom intelektualnom pustoši i brojnim nevoljnim pokretima, tipa mioklonija, je sličan poslednjem stadiju sporadične MCJ.

Neurološki znaci se javljaju u različitom obliku i učestalosti. Ipak, možemo ih nabrojati po njihovoj učestalosti kod pacijenata: cerebelarni ispadi /prvom redu jaka ataksija/, znaci ekstrapiramidnog sistema sa mioklonizmima i/ili horeatičnim pokretima kao i rigiditetom, pojava znakova ispada piramidnog sistema sa smanjenjenjem grube motorne snage, ali uz jako izražene patološke reflekse, akinetski mutizam, paraliza pogleda prema gore i kortikalna sljepoća.

Dijagnoza: odgovarajuća klinička slika + dopunski nalazi /EEG, CT, MR, likvor/ + progresivno napredovanje bolesti + nemogućnost da se uspostavi dijagnoza neke druge bolesti. Kliničkom dijagnozom možemo doći do moguće i vjerovatne dijagnoze, za sigurnu dijagnozu nam treba patohistološki nalaz ili imunohemijski nalaz zaraženog tkiva, a po mogućnosti i oboje. /Hauw et al. 1998/.

Dopunski nalazi

EEG snimanja su pokazala patološke promjene kod velike većine bolesnika sa nv-MCJ, ali bez onih karakterističnih promjena kao kod klasičnog /sporadičnog/ oblika MCJ, čak i u terminalnoj fazi bolesti. /Zeidler et al. 1997b, Hauw et al. 1998/

CT i MR glave su u granicama normale ili ukazuju na blaže atrofične promjene. Nije nađen specifičan nalaz ni kod SPECT i PET pregleda. /Zeidler et al. 1997b/

Likvor pokazuje uredan nalaz ili blago povečane ukupne proteine.

Ne raspolažemo za sada nijednim dijagnostičkim testom koji bi bio potpuno siguran za dijagnozu, a prije pojave kliničkih znakova bolesti ili tokom

bolesti. Možda će se u budućnosti pokazati korisnim podaci dobijenim od snimanja MR-om, /kod dva bolesnika je nađen hipersignal u području talamusa obostrano- Zeidler et al. 1997/, biopsije tonzila ždrijela /Hill et al. 1997/ i ispitivanja likvora. Ipak, rutinska biopsija tonzila ždrijela za postavljanje dijagnoze nv-MCJ je osporavana od nekih autora /Zeidler et al. 1999/.

Neke karakteristike nv-MCJ u odnosu na klasičnu MCJ

Javlja se kod mlađe dobne skupine u odnosu na klasičnu MCJ /srednja životna dob 29 godina; raspon 16- 48 godina/.

Trajanje bolesti je duže nego kod klasične MCJ /srednje trajanje bolesti 14 mjeseci; raspon od 9-35 mjeseci/.

Odlike klinička slike: klasična MCJ i nv- MCJ se znatno razlikuju između sebe, posebno u početnoj fazi bolest.

Klinička slika klasične MCJ je raznovrsnija, posebno u načinu početka bolesti, nego što je to slučaj kod nv-MCJ, koja je više "uniformna". Kod klasične MCJ psihičke i neurološke promjene idu skoro paralelno, ili sa malom vremenskom distancom, dok je kod nv-MCJ razmak između psihičkih promjena i neuroloških ispada i do šest mjeseci.

EEG kod nv-MCJ može biti u početku bolesti uredan, potom se promjene jave praktično kod svih pacijenata u odmakloj fazi bolesti, ali nisu tako karakteristične kao kod klasične MCJ, čak ni u terminalnoj fazi bolesti.

Vjerovatno porijeklo /etiologija/ bolesti

Veoma se povezuju pojava nv-MCJ i agens koji dovodi do "kravljeg ludila", odnosno bovine spongifromne encefalopatije /BSE//prenosiva spongiformna encefalopatija bovinog tipa/. Ona je prvi put nađena kod krava u Velikoj Britaniji u toku 1986. godine i od tada je registrovano u toj zemlji, do juna 2001. godine 180.900 oboljelih životinja, sa vrhuncem u toku 1991. godine, da bi se se potom broj počeo smanjivati i taj trend nastavlja do danas. U toku 1989. godine se nalazi prvi slučaj bovine spongiformne encefalopatije izvan Velike Britanije i do juna 2001. godine je registrovano 1900 bolesnih životinja.

Najvjerovatnije da je hrana pripremljena od bolesnih životinja uzrok bolesti, pri čemu su najinfektivniji materijal mozak i kičmena moždina životinja starijih od dvije godine i manifestno klinički bolesnih.

Priroda agensa koji dovodi do bolesti nije sasvim rasvjetljena. Najveći je broj pristalica da se radi o izvjesnom proteinu sposobnom da se razmnožava /prion/. Po drugim, malobrojnijim, je uzročnik, ipak, agens virusnog tipa koji posjeduje nukleinsku kiselinu,nosioca genetskih informacija. /Hauw et al. 1998/

Dokazi o povezanosti nv-MCJ i bovine spongiformne encefalopatije /BSE/. [2)]

Prva sumnja, mada ne dokaz je bila u povezanosti pojave bolesti kod goveda i kod ljudi u istom geografskom području i u istom vremenu. Najveći broj bolesnika sa nv-MCJ je registrovan tamo gdje je i najveći broj oboljelih životinja, mnogo manji u Francuskoj, a bolesnik opažen u Irskoj je prije toga živio u Velikoj Britaniji.

Naredna povezanost je pokazana preko prenošenja bolesti makako majmunima, nakon inokulacije bolesnog tkiva krave u njihov mozak.

Potom su uslijedili podaci o prisustvu istog infektivnog agensa u mozgovima zaraženih miševa, kada je to bilo urađeno vještačkom infekcijom tkiva bolesnih goveda ili bolesnika sa nv-MCJ.

Konačno, najnoviji i vrlo uvjerljiv dokaz je nađen u činjenici da je način prenošenja BSE i nv-MCJ, na laboratorijske miševe praktično isti, što vrlo čvrsto ukazuje da se radi o istom uzročniku.

U zaključku se može reći da je izloženost agensu BSE najvjerovatniji uzrok nastanka nv-MCJ kod ljudi, nakon kontaminacije hranom, odnosno unosom hrane u digestivni trakt, u prvom redu zaraženog tkiva centralnog nervnog sistema.

Preduzete mjere za očuvanje zdravlja

Zbog velike vjerovatnoće o povezanosti BSE i nv-MCJ su britanske vlasti u junu 1988. godine uvele obavezno prijavljivanje svakog slučaja BSE. Potom je uslijedila zabrana hranjenja svih preživara sa proteinima koji potiču od drugih preživara /goveda, ovce, koze/. Potom je uvedena zabrana stvaranja prehrambenog lanca od životinje do čovjeka, sa proizvodima porijekla ubijenih životinja, koje su stvarno ili potencijalno opasne. Slične mjere su preduzele i druge zemlje.

Aktivnost Svjetske zdravstvene organizacije /SZO/

Od 1991. godine se organizuju konferencije organizovane od Svjetske zdravstvene organizacije, vezane za pojavu bovine spongiformne encefalopatije /BSE/ kod ljudi i životinja.

U maju 2000. je održan takav sastanak za zemlje Centralne i Istočne Evrope, a predviđen je sličan sastanak za Mediteranske zemlje.

[2)] Lasmezas et al. 1996, Bruce et al. 1997, Hauw et al. 1998.

Preporuke Svjetske zdravstvene organizacije /SZO/

Nijedan dio ili proizvod životinje bolesne od bovine spongiformne encefalopatije /BSE/ ne smije da uđe u prehrambeni lanac, bilo ljudi ili životinja

Vlade zemalja ne smiju da dozvole da tkiva sumnjiva da sadrže agens BSE uđu u prehrambeni lanac bilo ljudi ili životnja.

Sve zemlje moraju zabraniti upotrebu tkiva preživara za ishranu drugih preživara.

Postoji rizik prenošenja agensa BSE životinja na ljude preko humanih ili veterinatrskih vakcina spremljenih na bazi materijala goveda. Farmaceutska industrija bi trebala da izbjegne upotrebu goveđeg materijala ili materijala koji dolazi od drugih životinja kod kojih prirodnim putem može doći do BSE. Ako je to apsolutno neophodno, goveđi materijal treba da dolazi /da se koristi/ iz onih zemalja koje imaju kontrolu BSE i koji imaju ili nula slučajeva te bolesti ili sporadične slučajeve BSE. Ove se predostrožnosti odnose i na kozmetičku industriju.

Ostali oblici spongiformnih encefalopatija

Kuru, prva, sigurna, prenosiva bolest, opisana je na Novoj Gvineji i povezana je sa ritualnim kanibalizmom. Naime, mozak starih umrlih osoba bi bio ritualno pripremljen i konzumiran od strane žena i djece, rijetko i odraslih muških članova plemena.U tim populacijama se tako bolest i pretežno javljala. U doba kada je prvi put opisana, je incidenca bila oko 1% te populacije, da bi se nakon zabrane kanibalizma polako smanjivala te, kao bolest, skoro sasvim nestala. Javljala se sa progresivnom demencijom, ataksijom, dizartrijom, potom mutizmom, te progresivnim smanjenjem motiliteta do potpune nepokretnosti. Od početka bolesti do fatalnog kraja je obično trebalo oko 1 godina /Gajdusek i Zigas 1957, Gajdusek et al. 1966/.

Sindrom Gerstmann- Straussler-Scheinker /GSS/ može biti posljedica različitih mutacija gena PrP. Javlja se u raznim oblicima kod različitih porodica. Klasične forme su: cerebelarna forma sa dominacijom ataksije, telencefalična forma sa dominacijom demencije i kortikalna forma sa dominacijom znakova ispada piramidnog puta. Klinička slika je veoma slična onoj kod sporadičnog oblika MCJ, s time što se obično javlja nešto ranije, u prosjeku u 4-oj dekadi života i traje oko 5 godina. Oblik je puno rjeđi od sporadičnog oblika MCJ, sa 1 oboljelim na 10 miliona stanovnika. Može se smatrati nasljednim oblikom MCJ. Neki oblici nalikuju Alzheimerovoj demenciji. /Gerstmann et al. 1936, Tranchant and Warter 1998/.

Fatalna porodična insomnia je bolest obično povezana sa tačkastom mutacijom kodona 178 gena PrP. Bolest je ekstremno rijetka i otuda je

kasno i izdvojena. Javlja se u vidu insomnie, potom vegetativnih ispada, i kasnije, kognitivnih ispada, kao posljedica, u prvom redu, talamičnih oštećenja./Lugaresi et al. 1986/

Neke posebnosti bolesti izazvanih nekonvencionalnim agensima

Infekcije izazvane konvencionalnim agensima, tipa virusa, dovode u nervnom sistemu do reakcije tipa inflamacije, pojave imunog odgovora i demijelinizacije /na pr. subakutni sklerozirajući panencefalitis, progresivna multifokalna leukoencefalopatija itd./

Infekcije izazvane nekonvencionalnim agensima /prioni ili infektivni proteinski partikuli,/ kod kojih se ne može dokazati nukleinska kiselina, dovode do spongiformne degeneracije sive substance sa hipertrofijom astrocita, i propadanjem ganglijskih ćelija, a ne izazivaju niti imuni, niti upalni odgovor kod bolesne osobe.

Neke odlike priona važne za praksu

Prioni su veoma otporni prema velikom broju procedura, koje inače efikasno djeluju na druge infektivne agense. Tako su prioni rezistentni na ultraljubičaste zrake, kuhanje, jonizirajuće zračenje, etanol, etilen oksid, formadelhid, različite deterđente, K permaganat i jodne preparate.

Preporučuju se dva efikasna načina inaktivacije prionskih partikula - što znači dva načina sterilizacije, ako imamo posla sa zaraženim ili sumnjivim materijalom - i to:

sterilizacija u autoklavu pod pritiskom na 134- 138 stupnja Celzijusa u trajanju od jednog sata ili potapanje u l M NaOH4 na sobnoj temperaturi, takođe, u trajanju od jednog sata /Rosenberg al. 1986/.

Mjere predostrožnosti kod kontakata sa osobom koja je bolesna ili sumnjiva na prionsku bolest

U normalnim uslovima ovi bolesnici nisu zarazni po okolinu i dovoljne su mjere predostrožnosti: nošenje rukavica za tjelesnu njegu, posebno kod uzimanja krvi ; zabrana davanja krvi /davaoci krvi/; zabrana uzimanja transplantata.

Izuzetno velika otpornost ovih infektivnih agenasa na uobičajene postupke dezinfekcije i sterilizacije, nalaže posebne mjere u slučaju sumnje na ove bolesti, a u toku hirurških, posebno neurohirurških intervencija, ili tokom autopsija /najveća koncentracija priona je u nervnom tkivu/. /Collins et al. 1999/.

SUMMARY

Spongiform encephalopathies are transmissible neurological disorders, characterized by diffuse deterioration of nervous system, primarily the gray matter, long incubation period, subacute clinical course and fatal ending.

Spongiform encephalopathy is now known to encompass a group of five disorders: Creutzfeldt-Jakob disease (CJD), kuru, Gerstmann-Sträussler-Scheinker Syndrome (GSS), fatal familial insomnia (FFT) and new variant Creutzfeldt-Jakob disease (nvCJD).

Today, we have many reasons to believe that these disorders are associated with the prion infection (protein infectious agent or prion protein PrP). A very important fact is that the body doesn't recognize the infectious agent as such, and therefore its response is not immune nor inflammatory, as spongiform encephalopathies develop as the degenerative disorders.

After the evaluation of the prion infections, based on the clinical features and additional diagnostic tests, we can say that the infection is possible or probable (in case of CJD even very probable), but only after the neuropathological and/or immunochemical examination, we can confirm our diagnosis.

While the first four disorders are very rare, the fifth one, the new variant Creutzfeldt-Jakob disease (nvCJD) is transmissible from animals to humans, and it is potentialy very dangerous for great number of people, especially considering the fact that the incubation period is very long and that we don't know the number of possible patients in the future.

There is a possibility of disease transmission and there is no possibility of treating it, therefore the prevention of the future episodes is the only protection we have against it WHO made some recommendations regrading this issue and those recommendations should be followed in our community.

LITERATURA

1. **Almond J, Pattison J.:** *Human BSE,* Nature, 1997; 389: 437-438.
2. **Alperovitch A, Delasnerie-Laupretre N, Brandel J.Ph.:** *Le point sur epidemiologie de la maladie de Creutzfeldt-Jacob* Rev. Neurol./Paris/, 1998; 154, 2: 139-141.
3. **Bruce ME, Will RG, Inside JW, McConnell I, Drummond D. Suttie A. et al.:** *Transmission to mice indicate that "new variant" CJD is caused by the BSE agent,* Nature, 1997; 389: 498-501.
4. **Burger LJ, Rowan J, Goldensohn.:** *Creutzfeldt-Jacob Disease - An Electroencephalographic Study* Arch Neurol.,1972; 26, /5/: 428-433.

5. **Castan Ph.:** *Les encephalites subaigues dites preseniles,* Bruxelles, Imprimerie de science /un volume/, 1968, 1-190.
6. **Collinge J, Palmer MS, Sidle KCL, Gowland I, Medori R, Ironside J, Lantos P.:** *Transmission of fatal insomnia to laboratory animals,* Lancet, 1995; 346: 569-570.
7. **Collins S, Law MG, Fletcher A, Boyd A, Kaldor J, Masters Cl.:** *Surgical treatment and risk of sporadic Creutzfeldt-Jacob disease. A case control study,* Lancet l999, 20; 354 /9192/:1823.
8. **Creutzfeldt HG.:** *Uber eine eigenartige herdformige Erkrankung des Zentralvensystems* Z. Neurol.Psychiat.,l920; 57 /l/: 1-18.
9. **Dimitrijević J, Bratić M., Bokonjić R.:** *Morbus Creutzfeldt-Jacob,* Med. Arhiv/Sarajevo/, 1988; 42/1-2/: 61-66.
10. **Dormont D.:** *Biologie des agents transmissibles non conventionnels ou prions,* Rev. Neurol. /Paris/, 1998; 154 /2/: 142-151.
11. **Gajdusek DC, Zigas V.:** *Degenerative disease of the central nervous system in New Guinea,* N Engl J Med, 1957; 257: 974-978.
12. **Gajdasek DC, Gibbs CJ, Alpers M.:** *Experimental transmission of a kuru-like syndrome to chimpanzees,* Nature, 1966; 209: 794-796.
13. **Gerstmann J, Straussler E, Scheinker I.:** *Uber eine eigenartige hereditar-familiare Erkrankung des Zentralnervensystems zugleich ein Beitrag zur Frage des vorzeitigen lokalen Alterns,* Z Neurol., 1936; 154: 736-762.
14. **Gibbs CJ, Gajdusek DC, Asher D, Alpers MP et al.:** *Creutzfeldt-Jacob disease /spongiform encephalopathy/ transmission to chinpanzee,* Science, 1968; 161: 382-389.
15. **Hauw JJ, Lazarini F, Sazdovitch V, Seilhean D. et al.:** *Les maladies a agents transmissibles non conventionnels /"Prion"/: nosologie et diagnostic,* Rev. Neurol. /Paris/, 1998; 154 /2/: 131-137.
16. **Hill H, Zeidler M, Ironside J, Collinge J.:** *Diagnosis of new variant Creutzfeldt-Jacob disease by tonsil biopsy,* Lancet, 1997; 349: 99-100
17. **Jacob A.:** *Uber eigenartige Erkrankungen des Zentralnervensystems mit bemerkenswertem anatomischen Befunden Z.* Z. Neurol. Psychiat., 192l; 64 /2/: 147-228.
18. **Kovanen J, Erkinjuntti T, Ivanainen M, Ketonen M, et al.:** *Cerebral MR and CT imagining in Creutzfeldt-Jacob Disease,* Journ Computer Ass. Tomography /New York/, 1985; 9/1/: 125-128.
19. **Lasmezas CI, Deslys JP, Demaimay R., Adjou KT, Lamoury F.:** *BSE transmission to macaques,* Nature, 1996; 381: 743-744.
20. **Lugaresi R, Medori R, Montagna P, Baruzzi A, Cortelli P, Lugaresi A. et al.:** *Fatal familial insomnia and dysautonomia with selective degeneration of thalamic nuclei,* N Engl J Med, 1986; 315: 997-l003.

21. **Masters CL, Gajdusek DC, Gibbs CJ.:** *Creutzfeldt-Jacob disease virus isolations from the Gertsmann-Straussler syndrome,* Brain, 1981, 1o4: 559-588.
22. **May W.:** *Creutzfeldt-Jacob Disease,* Acta Neurol Scandinav, 1968; 44: 1-32.
23. **Mitrova E.:** *Some new aspects of CJD epidemiology in Slovakia,* European Journal of epidemiology, 1991; 7: 439-449.
24. **Neumann M, Cohn R.:** *Progressive subcortical gliosis: a rare form of presenile dementia,* Brain, 1967; 90: 405-418.
25. **Rosenberg RN, White CL, Brown P et al.:** *Precautions and handling tissues, fluids and other contaminated materials from patients with documented or suspected Creutzfeldt-Jacob disease,* Ann Neurol. 1986; 12: 75-77.
26. **Tranchant C, Warter JM.:** *Le syndrome de Gerstmann Straussler Scheinker,* Rev. Neurol.Paris/, 1998; 154 /2/:152-157.
27. **The EUROCJD Group.:** *Epidemiologie genetique de maladie Creutzfeldt-Jacob en Europe,* Rev. Neurol. /Paris/ 2001; 157 /6-7/: 633-637.
28. **Zeidler M., Johnstone EC, Bamber RWK, Dickens CM et al.:** *New variant Creutzfeldt-Jacob disease: psychiatric features,* Lancet, 1997a; 350:908-910.
29. **Zeidler M. Stewart GE, Barraclough CR, Bateman DE et al.:** *New variant Creutzfeldt-Jacob disease: neurological features and diagnostic test,* Lancet, 1997b; 350: 903: 907.
30. **Zeidler M, Knight R, Stewart G, Ironside JW, Will RG, Green AJ, Pocchiari M:** *Diagnosis of Creutzfeldt-Jacob disease. Routine tonsil biopsy for diagnosis of new variant Creutzfeldt-Jacob disease is not justified,* BMJ, 1999, 20; 318 /7182/: 538.
31. **Zilber N, Kahana E, Abraham M.:** *The Lybian Creutzfeldt-Jacob focus in Israel: an epidemiologic evaluation,* Neurology, 1991; 41: 1385-1391.
32. **Will RG, Ironside JW, Zeidler M, Cousens SN, Estibeira K, Alperovitch A.et al.:** *A new variant of Creutzfeldt-Jacob disease in the UK,* Lancet, 1996; 347: 921-925.

Transmisibilne spongiformne encefalopatije (TSE) životinja uzrokovane prionima

Hajrudin Beširović,[1] Senad Prašović,[1] Edin Šatrović[1]

Patohistološka karakteristika za bolesti i ljudi i životinja iz ove grupe oboljenja je izrazita vakuolizacija sive materije mozga (spužvast izgled). Zbog histopatološkog nalaza na mozgu te prenosive prirode sve se ove bolesti nazivaju jednim imenom "Transmisibilne spongiformne encefalopatije" (TSE). Uzročnik svih TSE je infektivni agens poznat pod imenom "Prion" ili "Prionski protein" - skraćeno "PrP" od proteinaceus infectious particle ili proteaza resistent protein. Zbog toga se bolesti iz ove skupine često nazivaju "prionske bolesti".

Prionski protein "PrP" spada u grupu proteina male molekularne težine, a javlja se u dvije isoforme istog aminokiselinskog sastava ali različitih biohemijskih karakteristika. Apatogeni ili celularni $PrP^{(c33-35kda)}$ se nalazi kao normalni membranski celularni protein, potpuno razgradiv deterdžentima i osjetljiv na djelovanje proteaze K. Patogeni ili koji uzrokuje oboljenje screpi $PrP^{(sc27-30kda)}$ je veoma otporan u deterdžentima kao i na djelovanje proteaza. Kada dođe do nervnog tkiva (ne zna se tačno na koji način) djeluje na normalni ili ćelijski PrP pretvarajući ga u abnormalni. To dovodi do lančane reakcije sa velikom akumulacijom abnormalnog PrP^{Sc} u mozgu koji izaziva nepopravljiva oštećenja mozga u vidu neuronalne degeneracije (vakuolizacije i glioze).

Veoma bitna karakteristika PrP^{Sc} je da ne stvara upalnu reakciju niti imuni odgovor organizma zbog čega je i dijagnostika svih TSE veoma otežana.

U spongiformne encefalopatije životinja ubrajaju se:

- Skrepi (Scrapie) kod ovaca, koza i muflona.
- Spongiformna encefalopatija goveda (Bovine spongiform encephalopaty - BSE).
- Spongiformna encefalopatija nerčeva javlja se sporadično i slična je screpiju ovaca.
- Hronična bolest mršavljenja (Chonic wasting disease - CWD) losova, jelena i mula u planinama Sjeverne Amerike.

[1] Katedra za patologiju, Veterinarski fakultet Univerzitet u Sarajevu.

- Spongiformna encefalopatija mačaka i drugih egzotičnih životinja držanih u u zoološkim vrtovima u Velikoj Britaniji.

Skrepi ovaca, koza i muflona

Oboljenje koje je poznato više od 250 godina. Klinički znaci se javljaju kod ovaca starosti od 2-5 godina i traju do 1 mjeseca sa letalnim ishodom. Životinje postaju toliko osjetljive i češu se da ponekad zgule ili sastružu vunu (odatle i naziv scrapie - zguliti).

Spongiformna encefalopatija goveda (BSE)

Prvi put je ustanovljena u Velikoj Britaniji 1985. god. Do 1997. ustanovljeno je oko 170000 oboljelih goveda. Zaražene životinje su nestabilne na nogama, gube na težini, nervozne su te zbog toga dobijaju ime "lude krave". Važno je napomenuti da sve oboljele životinje ne pokazuju sve kliničke simptome karakteristične za skrepi i BSE.

Zajedničko je bilo kod svih slučajeva BSE, ishrana sa mesno-koštanim brašnom kontaminiranim uzročnikom ovčijeg skrepija PrPSc.

Promjene u ponašanju i temperamentu su obično najraniji znaci bolesti koji se mogu uočiti i kod skrepija ovaca i BSE goveda.

Nakon infekcije goveda sa BSE, obično prođe 3-6 godina prije pojave prvih kliničkih simptoma, mada taj inkubacioni period se može protezati od najranije 20 mjeseci do 16 godina. Kao rezultat inkubacionog perioda, proizvodi od inficiranih goveda, ali bez kliničkih znakova oboljenja mogu završiti kao hrana za ljude. U prvoj fazi nakon infekcije infektivnost inficiranih životinja je veoma mala. Zvaničnici govore da nema opasnosti po ljudsko zdravlje u ovoj fazi bolesti, što opet potpuno ne isključuje potencijalni rizik.

U drugoj fazi, prije pojave prvih kliničkih simptoma infektivni agens se nalazi u visokoj koncentarciji, posebno u mozgu i kičmenoj moždini. Ova faza bolesti traje najmanje 6 mjeseci i tada goveda predstavljaju glavnu opasnost po ljudsko zdravlje, jer su isto toliko opasne kao i goveda koja klinički pokazuju znake bolesti.

U trećoj fazi bolesti nastaju klinički simptomi, a bolest obavezno završava smrću životinje.

Do sada nije dokazan horizontalni prenos bolesti (sa krave na kravu) te preko mlijeka i sjemena bikova, ali postoji sumnja o placentarnom prenosu.

Dijagnostički metodi koji se primjenjuju kod životinja oboljelih od TSE su:

- Klinički simptomi
- Histopatologija
- Imunohistohemija

- Transmisionoelektronska mikroskopija
- Imunohemija (Western blot, ELISA)

Moramo znati da ni jedan dijagnostički test nije 100% perfektan, ako gledamo na njegovu sposobnost da tačno ustanovi i odvoji inficiranu od neinficirane životinje. Svi dijagnostički testovi imaju nivo lažno pozitivnih i lažno negativnih reakcija. Iako su TSE, relativno rijetke kod većine populacija životinja, čak i mali nivo lažno pozitivnih reakcija može imati nesagledive posljedice gledajući uticaj takve informacije na javnost, te izazvati velike ekonomske gubitke. S druge strane, mala senzitivnost dijagnostičkog testa rezultira lažno negativnim reakcijama, pa se može desiti da bolesna životinja dođe u lanac ishrane ljudi sa nesagledivim posljedicama po njihovo zdravlje.

Zbog toga sve referentne laboratorije za dijagnostiku TSE životinja primjenjuju više različitih testova. Prema iskustvima drugih laboratorija neophodno je provesti histopatologiju, imunohistohemiju i imunohemiju, a po potrebi uključiti i elektronsku mikroskopiju.

Uz kliničke simptome dijagnostika je primarno bazirana na postmortalnim svjetlosnomikroskopskim istraživanjima mozga zasnovanim na standardnoj histopatološkoj proceduri. Vakuolarne promjene u mozgu, a posebno u produženoj moždini (obex) se koriste kao glavni indikator za histopatološku potvrdu oboljenja. Ciljno mjesto promjena u obex-u je siva materija neuropile sa sistemskom i bilateralnom distribucijom promjena.

Imunohistohemijskom metodom koristi se specifični PrP antiserum kojim se otkriva akumulacija abnormalnog $PrP^{(sc27-30kda)}$ u centralnom nervnom sistemu. Akumulacija abnormalnog PrP-a se podudara sa mjestima spongiformnih promjena. Nastojanja su da se usavrši specifičnost reakcije kako bi se isključila unakrsna reakcija sa normalnom isoformom $PrP^{(c33-35kda)}$ što zavisi od načina fiksiranja, izabranog antitjela, načina demaskiranja, imunohistohemijskog protokola, te interperetacije nalaza.

Transmisiona elektronska mikroskopija koristi se kao pomoćna metoda rutinskoj patohistološkoj dijagnostici za utvrđivanje prisustva abnormalnih PrP fibrila (ekvivalent scrapie associated fibrils (SAF)). Uzorci mozga i produžene moždine za TEM moraju biti nefiksirani.

Tehnika Western immunoblotting je ukratko imunohemijska detekcija abnormalnog PrP-a, koja se za sada pokazala kao najsigurnija metoda. Od svih imunohemijskih testova (brzih testova kao što su Enfer - test, Prionics - test, CEA - test) koji su primjenjivi u svrhu dijagnosticiranja TSE životinja, prema podacima Komisije EU Prionics - test (koristi Western-blot metodu) je jedini test koji je pokazao 100% senzitivnost i senzibilnost bez ponavljanja testiranja. Ova osobina je veoma bitna u razlikovanju bolesnih od zdravih životinja kao i diferencijalno dijagnostički odvajanje životinja sa drugim neurološkim bolestima. Sigurna je i u slučajevima uznapredovalih autolitičnih procesa.

Veoma važna napomena je da standardni postupci čišćenja i dekontaminacije koji se koriste u borbi protiv drugih infektivnih agensa ne daju zadovoljavajuće rezultate kada se radi sa patogenim prionskim proteinom. Prema tome, neučinkoviti je standardno autoklaviranje, te primjena sredstava kao što su: alkohol, formalin, aldehidi (glutaraldehid), hidrogen peroksid, acetatna kiselina, fenoli i sl. Zadovoljavajuća gasna dezinfekcija ne postoji.

Preporučuje se upotreba natrium hipohlorita 20,000 ppm tokom 1 sata. 2M natrium hidroksida tokom 1 sata. Za histološke uzorke 96% mravlja kiselina u trajanju od 1 sata. Sterilizacija na 1340C - 1370 C za 18 minuta, ili 6 uzastopnih ciklusa sa po 3 minuta.

Diskusija

Cilj našeg rada je pokušaj aktueliziranja ove problematike i donošenja odluke o neophodnosti dijagnostike TSE u našoj zemlji. Kod nas ne postoji niti jedan laboratorij sposoban da korektno dijagnosticira TSE životinja, koristeći se svim naprijed navedenim metodama. Uz adekvatnu opremu, Fakultet bi mogao postati referentna institucija za dijagnostiku TSE, a što je veoma značajno sa aspekta sigurnosti zdravlja građana. Katedra za patologiju Veterinarskog fakulteta u Sarajevu je djelimično osposobljena (postoji dio opreme za patohistološku i imunohistohemijsku dijagnostiku). Ne posjeduje *transmisionoelektronski mikroskop* kao ni *Opremu za izvođenje western imunoblotting metode*, koja je za sada i najpouzdanija metoda u dijagnostici TSE. Nema opremljenog prostora za rad sa veoma opasnim infektivnim agensima kakvi su prionski proteini.

Opremanje jednog laboratorija, koji bi između ostalih opasnih bolesti, bio u funkciji dijagnostike TSE životinja je prilično skupa investicija. Bez materijalne pomoći šire društvene zajednice (države) za sada nema mogućnosti dijagnosticiranja prionskih bolesti fatalnih i za ljude i životinje.

Literatura

1. **Austin A.R., Hawkins S.A.C., Kelay N.S., Simmons M.M.:** *New observation on the clinical sings of BSE and scrapie,* Proceedings of a Consultation with the Scientific Committee of the Commission of the European Communities., 277-287, September 1993, Brussels.
2. **Austin A.R., Simmons M.M., Wels G.A.H.:** *Pathological temperment changes in bovines,* Irish Veterinary Journal 50, 304-309, 1997.
3. **Scott A.C., Wells G.A.H., Stack M.J., White H. and Dawson M.:** *Bowine spongioform encephalopathy: detection and quantitation of fibrlis, fibril protein (PrP) and vaculation in brain,* Veterinary Microbiology 23, 295-304, (1990).

4. **Taylor D.M., Fraser H., McConell D.A., Brown D.A., Brown K.L Lmaza K.A. Smith G.R.A.:** *Decontamination studies with the agents of bovine spongiform encephalophaty and scrapie* Arch. Virol. 139; 313-326, 1994.
5. **Wells G.A.H., Hawkins S.A.C., Hadlow, W.J. and Spencer Y.I.:** *The discovery of bovine spongioform encephalopathy and observations on the vacuolar changes. In: Prion Disease of human and animals,* Eds. S.B. prusiner, J. Collinge, J, Powell and B. Anderton. Ellis Horwood limited, chichester, England p 256-274, 1992.
6. **Wells G.A.H. and Wells M.:** *Neuropil vacuolation in brain: a reproducible histological processing artefact,* Journal of Comparative Pathology 101, 355-362, 1989.

ANU
BiH
АНУ
БиХ

ANU
BiH
АНУ
БиХ

IMUNOTOLERANCIJA KOD PRIONSKIH BOLESTI

Tarik Bajrović[1)], Behija Dukić[1)]

Spužvaste encefalopatije su subakutne degenerativne bolesti izazvane sa "nekonvencionalnim" filtrabilnim agensom vrlo duge inkubacije i bez otkrivanja upalnih ili imunih odgovora.

U slučaju anti P^rP na transgeničnim miševima došlo se do spoznaje da se ukupna masa ćelijskog prion proteina (P^rP^c) ne razlikuje od one kod netransgenične braće i sestara ali nije isključeno da su P^rP^c "preslikani" sa površine ćelija zbog čega bi mogla biti uzaludna istraživanja patogeneze ove bolesti.

U "*in vivo*" eksperimentima sa anti P^rP na transgeničnim miševima je utvrđeno da na ćelijskim membranama vezani P^rP imunoglobulini (B ćelija) mogu krucijalno participirati u procesu prion patogeneze.

Naime, dokazano je da folikularne dendritične ćelije koje zaostaju u stromi limforetikularnih organa ostvaruju intiman kontakt sa B ćelijama tako da bi na mambranama - vezana anti PrP antitijela mogla interferirati sa prion replikacijama folikularnih dendritičnih ćelija.

"Transgenični miševi" su nastali metodom genetskog inžinjeringa gdje svaka ćelija sadrži polovinu vlastitog a polovinu genetskog materijala neke druge životinje (npr. sirijskog hrčka). Ovi miševi su poslužili za uklanjanje "barijera" koje postoje između životinjskih vrsta.

Slijedeći korak u radu sa transgeničnim miševima bio je učinjen na uklanjanju gena za prione nakon čega su se križanjem takva dva miša dobijali potomci (naizgled normalni) ali bez prionskih gena. Ovakvi miševi nisu imali PrP i bili su otporni na unešene infektivne prione čime je ukazano da su prionska oboljenja prije posljedica akumulacije infektivnih priona nego inhibicije normalne prion proteinske funkcije.

Na kraju treba reći da se ni do danas ne zna stvarna funkcija normalnog prion proteina.

[1)] Zavod za epizootiologiju, Veterinarski fakultet Univerzitet u Sarajevu

Diskusija

Cilj našeg rada i učešća na Workshop-u bio je poticaj imunološkim disciplinama radi moguće rane spoznaje postojanja imunog odgovora za ovu kao i većinu drugih oboljenja čiji etiološki agensi su mikrobi ili prioni. Mišljenja da se radi o autoimunim bolestima su za sada prihvatljiva iako su teorije o prenosu sa ovaca (scraepi) na goveda (BSE) i od goveda (BSE) na ljude (nv CJB) sve prihvatljivija. Zabranom upotrebe proteinskih komponenata animalnog porijekla u gotovim krmnim smjesama za ishranu krava kao i korištenjem najmanje dvije od OIE-a preporučene metode za kontrolu goveda nakon klanja ili uginuća su jedino za sada pouzdane metode borbe sa ovom bolešću kod životinja i sprečavanjem njenog prenošenja na ljude.

Literatura

1. **Diklić Vera:** *Prionska oboljenja centralnog nervnog sistema,* Medicinski fakultet Novi Sad, 1998.
2. **Heppner F.L i sar.:** *Prevention of scrapie pathogenesis by transgenic expression of anti-prion protein antibodies,* Science, Vol. 294, Issue 5540, 178-182, 2001.
3. **Jukić B.:** *Prionske bolesti - trajna opasnost, Znanstveno- stručno savjetovanje s međunarodnim sudjelovanjem,* Zagreb 2001.
4. **Moira E. Bruce:** *"New variant" Creutzfeldt - Jacob disease and bovine spongiform enephalopathy,* Natura medicine, Vol. 6, No 3, 2000.
5. **Naglić T., Hajsig D.:** *Veterinarska imunologija,* Školska knjiga Zagreb, 1993.

Kako izbjeći rizik od prionske bolesti

Faruk Čaklovica,[1] Davor Alagić,[2] Muhamed Smajlović,[1]
Ante Milanović,[1] Nihad Fejzić,[1] Jasmin Ferizbegović[3]

Uvod

Prionske bolesti danas su, pored stručnih i profesionalnih krugova aktuelna tema koja se u svijetu medijski veoma mnogo eksploatiše. Radi se o zasebnoj skupini bolesti ljudi i različitih vrsta domaćih i divljih životinja. Kod životinja do sada su poznate:

- skrepi ovaca i koza,
- spongiformna encefalopatija goveda
- spongioformne encefalopatije nekih egzotičnih životinja u zoološkim vrtovima,
- prenosiva encefalopatija vidrica (transmissable mink encephalopathy - TME),
- spongiformna encefalopatija jelena (chronic wasting disease of deers - CWD),
- mačja spongioformna encefalopatija (feline spongioform encephalophaty - FSE),

a kod ljudi :

- KURU - oboljenje urođenika sa Nove Gvineje,
- Creutzfeld-Jakobova bolest (CJB),
- Gerstmann-Strausslerov sindrom (GSS) i
- Fatalna familijarna insomnija (FFI).
- nova CJB.

Pored zajedničkog uzročnika (prion), bolesti imaju više zajedničkih karakteristika:

[1] Veterinarski fakultet Sarajevo
[2] Faculty of Veterinary Medicine Davis, USA
[3] Filozofski fakultet Tuzla

- inkubacija iznimno dugo traje
- tok bolesti je progresivan i završava smrću
- degenerativne spongiformne promjene u mozgu
- u napadnutom tkivu nema upalnih pomjena
- u napadnutom organizmu ne stvaraju se antitijela
- u mozgu je inducirano stvaranje fibrila vidljivih elektronskim mikroskopom.

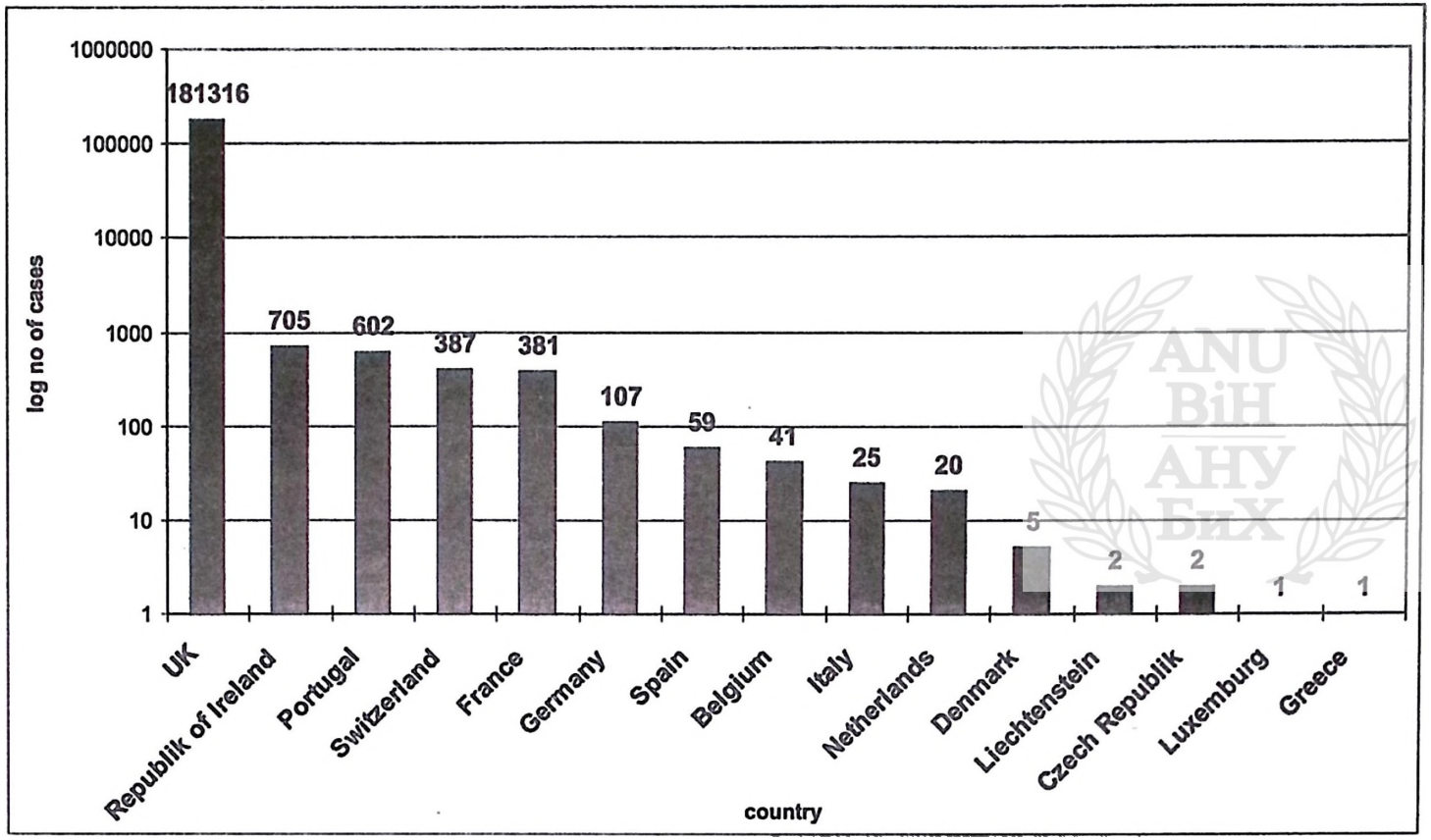
Ono što je bitno sa aspekta borbe protiv uzročnika (prion protein) i što je eksperimentalno dokazano jeste njegova visoka rezistentnost na mnoge konvencionalne procedure inaktivacije, uključujući ultravioletno i jonizirajuće zračenje, ekstremne temperature, etanol, formaldehid i standardno autoklaviranje.

Aktuelna situacija i osnovne epidemiološke karakteristike prionskih bolesti u zemljama EU

Prema najnovijim podacima OIE i EU, ukupan broj slučajeva BSE-a u svijetu od pojave bolesti do danas je 182 507. Od toga, samo u zemljama EU 180 851, odnosno samo u Ujedinjenom Kraljevstvu 179 441 slučaj. Najveći broj slučajeva u zemljama članicama EU, pored Ujedinjenog Kraljevstva, je u Irskoj (599), Portugalu (503) i Francuskoj (248). Dok se incidenca BSE-a smanjuje u Ujedinjenom Kraljevstvu, u nekim zemljama članicama EU je u porastu, što je uglavnom rezultat uvođenja sistematičnijeg testiranja životinja na prisustvo BSE-a. Bitno je istaći da najveći broj registrovanih slučajeva BSE-a u ostalim zemljama EU jeste kod životinja uvezenih iz Velike Britanije, ili je posljedica ishrane životinja stočnom hranom proizvedenoj u Velikoj Britaniji.

Prema opće prihvaćenom naučnom objašnjenju, epidemija BSE-a u Velikoj Britaniji je nastala kao poslijedica recikliranja kontaminiranih goveđih i ovčijih tkiva u proizvodnji mesnih koštanih stočnih hraniva, odnosno promjenama u režimu temperature i vremena termičkog tretmana u proizvodnji ovih hraniva u ranim 80-im godinama prošlog vijeka, što je rezultiralo preživljavanjem uzročnika skrepija kod ovaca i prenosom putem hraniva na goveda.

Ukoliko govorimo o ostalim mogućim načinima prenosa BSE-a, do danas nisu zvanično prihavaćene mogućnosti bilo horizontalnog (npr. sa jedne životinje na drugu) ili vertikalnog prenosa bolesti (sa krave na tele). Veliki broj višegodišnjih istraživanja je obavljen u Velikoj Britaniji u cilju istraživanja mogućnosti horizontalnog ili vertikalnog prenosa bolesti. Prema rezultatima istraživanja publikovanim avgusta 1996. godine vezano za jedinke rođene od strane inficiranih životinja, postoji mogućnost maternalne transmisije bolesti. Ona je izuzetno mala i nije još uvijek rasvijetljena.



Grafikon 1. Broj registrovanih slučajeva BSE u Europskim zemljama

Stav Naučnog upravnog komiteta evropske zajednice je da ne postoji mogućnost vertikalnog prenosa bolesti putem mlijeka, sperme ili embriotransfera. Ipak, eksperti navode da, kao mjeru predostrožnosti, treba uništavati mlijeko oboljelih životinja, iako nije dokazana infektivnost za mlijeko. Prenosivost između različitih životinjskih vrsta, u slučaju BSE-a, je predmet također brojnih istraživanja. Postoji mogućnost izazivanja spongioformne encefalopatije korištenjem kontaminiranog goveđeg materijala na svinje, nerčeve, ovce i majmune, ali u isključivo laboratorijskim uslovima, dok još uvijek ovakav prenos bolesti nije zabilježen van laboratorija, u prirodnim uslovima.

Kod velikih i malih preživara, u tkiva visokog rizika gdje je dokazana infektivnost, spadaju: mozak, kičmena moždina, oči, tonzile, grudna žlijezda, slezina i intestinalni trakt. Ono što je bitno istaći sa aspekta najvažnijih namirnica animalnog porijekla jeste to da nije dokazana infektivnost u ostalim organima i tjelesnim tečnostima, naročito mesu i mlijeku, kao i spermi.

Nova varijanta CJB, za koju se smatra da je humani ekvivalent BSE-i, prvi put je dijagnosticirana 1996. godine. Još 1995. godine je u Edinburgu identificirano 10 slučajeva klasične CJB opisanih kao nova varijanta. Svi pacijenti su bili mlađe dobi (od 19 do 41 godine) u prosjeku 29 godina. Bolest je relativno dugo trajala (prosječno 13 mjeseci) i imala je kliničku sliku koja je odstupala od klasične CJB, kao i određene različitosti u obdukcionom nalazu. Naučnici koji su istraživali ove slučajeve nisu magli pronaći ništa u medicinskom istorijatu ili genetskoj osnovi ovih pacijenata, ili bilo koji drugi faktor koji bi upućivao na objašnjenje ove bolesti. Savjetodavni Komitet o BSE-u Ujedinjenog Kraljevstva je 1996. godine zaključio da "iako nema direktnog dokaza povezanosti, na bazi današnjih podataka i u odsustvu bilo kakvih osnovanih alternativa, najprihvatljivije objašnjenje jeste to da su ti slučajevi povezani sa izlaganjem BSE-u prije uvođenja zabrane korištenja preciziranih goveđih nusproizvoda u 1989. godini." Prema ovome, naglašena je eventualna mogućnost prenosa BSE-a na ljude. Do danas je zabilježeno 99 potvrđenih i sumnjivih slučajeva ove bolesti u EU, gotovo svi u Ujedinjenom Kraljevstvu, izuzev 3 slučaja u Francuskoj i 1 slučaj u Irskoj.

Današnje pretpostavke o raširenosti nvCJB variraju od 100.000 do 500.000 potencijalnih bolesnika. Bolest od tog momenta postaje problem bez presedana u veterinarskoj medicini. S tom spoznajom, bolest izlazi iz okvira veterinarske medicine i postaje svjetski zdravstveni problem, koji će se vjerovatno odraziti i na svjetsku globalnu politiku. Ovakvo mišljenje potkrepljuje se i slijedećim:

- 1986: BSE kao problem u Velikoj Britaniji
- 1990: BSE problem nekih zemalja
- 2000: BSE problem Europe
- 200x: problem na drugim kontinentima

Zaključak je zajedničkog sastanka WHO/FAO/OIE koji je održan u junu 2001. godine: "potencijalno inficirani materijal je distribuiran širom svijeta".

Mjere i aktivnosti koje preduzimaju zemlje EU u cilju sprječavanja širenja i eradikacije BSE

Od prvog registrovanog slučaja BSE-a do danas, zakonodavna tijela EU su reagovala čitavim nizom odluka i regulativa u cilju što efikasnijeg sprječavanja širenja i eradiakcije BSE-a i zaštite zdravlja potrošača. Najvažnije od njih su:

- Odluka od 28. jula 1989. godine o zabrani izvoza živih goveda rođenih prije 18. jula 1988. godine ili rođenih od krava za koje se sumnja postojanje BSE-a. Dalje odluke modificiraju ili obezbjeđuju detaljniju implementaciju ovih mjera, što je kuliminiralo Odlukom od 27. marta 1996. godine kojom se naređuje zabrana izvoza živih goveda, govedine, teletine i proizvoda na bazi govedine iz Ujedinjenog Kraljevstva u druge zemlje članice i treće zemlje.
- Odluka od 9. aprila 1990. godine o odvojenom držanju i klanju sve stoke za koju se sumnja da je oboljela od BSE-a, kao i patohistološko ispitivanje njihovog moždanog tkiva u cilju dijagnosticiranja BSE-a, te u slučaju potvrde bolesti, uništavanja trupa i svih konfiskata. Ova Odluka također je regulirala izvoz ostalih tkiva i organa goveda starih 6 mjeseci i više iz Ujedinjenog Kraljevstva u druge zemlje članice.
- Odluka od 8. juna 1990. godine kojom se zahtijeva od Ujedinjenog Kraljevstva puna upotreba kompjuterskih zapisa u identifikaciji životinja.
- Odluka od 27. juna 1994. godine kojom se zabranjuje u svim zemljama članicama upotreba stočnih hraniva animalnog porijekla koja sadrže proteine porijeklom od tkiva preživara. U slučajevima gdje je teško identificirati tkivo, zabrana se proširuje na tkiva porijeklom od bilo kog sisara.
- Od 1. aprila 1997. godine su uvedeni viši standardi za tretman animalniog otpada i konfiskata (temperatura od 133C, pritisak od 3 bara i vrijeme od 20 minuta).
- Od 1. maja 1998. godine mjere nadzora u cilju detekcije, kontrole i eradikacije BSE-a.
- Od 1. oktobra 2000. godine neškodljivo uklanjanje specificiranog rizičnog materijala (mozak, kompletna kičma, oči, tonzile, grudna žlijezda i crijevni trakt) porijeklom od goveda (starijih od 12 mjeseci), ovaca i koza iz lanca ishrane ljudi i životinja širom EU. Ova mjera je obavezujuća i za sve uvoze mesa i mesnih proizvoda iz trećih zemalja u EU, izuzev Argentine, Australije, Bocvane, Brazila, Čilea, Namibije, Nikaragve, Norveške, Novog Zelanda, Paragvaja, Singapura, Svazilanda i Urugvaja počevši od 01. aprila 2001. godine.

- Od 01. januara 2001. godine uvođenje ciljanog testiranja na BSE-u, sa fokusom na visokorizične grupe životinja. Praktično to znači da pored obaveznog pregleda svih životinja koje pokazuju poremećaje koji ukazuju na BSE, uvodi se obavezno rapidno "screening" post mortem testiranje na:
  a) svim govedima preko 30 mjeseci starosti prinudno zaklanim koji su pokazivali znake bilo kakve bolesti u toku ante mortem pregleda u klaonicama;
  b) svim slučajnim uzorcima goveda koja su uginula na farmama;
  c) zdravim životinjama preko 30 (24) mjeseci starosti namijenjenim za ljudsku ishranu (sa izuzetkom Austrije, Švedske i Finske, gdje naučne procjene govore da je rizik od Bse-a vrlo nizak);
- Od 01. marta 2001. godine zabrana korištenja mrtvih životinja koje nisu bile podobne za ljudsku ishranu za proizvodnju stočne hrane.

Sve ove mjere EU, poduzete u cilju zaštite zdravlja potrošača i kontrole i eradikacije BSE-a su bazirane na stručnim mišljenjima neovisnih naučnih komiteta.

Pored ovih već postojećih mjera i aktivnosti, EU priprema niz novih zakonskih regulativa u cilju kako zaštite zdravlja i svih interesa potrošača, tako i eradikacije BSE, koje su u fazi ispitivanja ili usvajanja od strane Vijeća ministara ili Parlamenta Evrope. Najvažnije od njih su:

- prijedlog Regulative o prevenciji, eradikaciji i kontroli svih transmisivnih spongiformnih encefalopatija,
- prijedlog Regulative o animalnim nus-proizvodima, kojom bi se obezbijedilo da isključivo materijal porijeklom od životinja odgovarajućih za ishranu ljudi može biti korišten u ishrani životinja,
- prijedlog generalnog zakona o hrani i uspostavljanje vrhovnog evropskog tijela za sigurnu hranu,
- nastavak aktivnosti u okviru zakonskih odredbi Bijele knjige o sigurnosti hrane u cilju obezbjeđenja zdravstvene sigurnosti hrane od farme do trpeze.

Osim toga, u skladu sa činjenicom da su sve zemlje istočne, centralne i južne Evrope i mnoge zemlje svijeta uvezle značajne količine žive stoke i stočnih hraniva porijeklom od preživara iz zemalja EU kod kojih je potvrđeno postojanje BSE-a i predpostavke da je stoka ovih zemalja izložena potencijalnom riziku pojave i širenja BSE-a, a u cilju efikasnijeg sprječavanja širenja i eradikacije bolesti, Vrhovni naučni komitet EU je 02. aprila 2001. godine objavio novu geografsku procjenu rizika postojanja BSE-a u trećim zemljama i podjelu trećih zemalja na 4 kategorije rizika. Naime, činjenica je da ukoliko nije zabilježena pojava BSE u nekoj zemlji to ne znači automatski da je i

nema. Preduslov za utvrdjivanje statusa zemlje u pogledu BSE je rezultat procjene rizika. Važna komponenta procjene rizika na BSE je da se izvrši ocjena da li je materijal koji je uvezen mogao biti inficiran i, ukoliko jeste, da li su uslovi u toj zemlji bili dovoljni za rješavanje tog problema s materijalom, tj. da li su uslovi bili adekvatni za sprečavanje širenja bolesti. Na osnovu toga Naucni komitet Evropske unije je izvršio procjenu rizika na BSE u mnogim zemljama:

- I grupa su treće zemlje u kojima gotovo ne postoji rizik od postojanja BSE-a i tu se ubrajaju: Argentina, Australija, Bocvana, Brazil, Čile, Namibija, Nikaragva, Norveška, Novi Zeland, Paragvaj, Singapur, Svaziland i Urugvaj.
- II grupa su treće zemlje u kojima rizik od BSE-a ne može biti isključen: Kanada, Kolumbija, Indija, Mauritanija, Pakistan i SAD.
- III grupa trećih zemalja za koje je izvjesno da postoji rizik od BSE-a, bilo nepotvrđenog ili potvrđenog na niskom nivou: Albanija, Cipar, Češka Republika, Estonija, Mađarska, Litvanija, Poljska, Slovačka Republika i Švicarska.
- IV grupa obuhvata treće zemlje u kojima je potvrđen visok rizik od BSE-a, u koju do sada nije svrstana niti jedna treća zemlja.

Procjena rizika je urađena na istim osnovama kao i za sve zemlje članice EU. Praktičan efekat ovakve podjele jeste da je od 01. aprila ove godine zabranjen uvoz na teritoriju EU specificiranog rizičnog materijala i svih proizvoda koji sadrže isti iz svih trećih zemalja, izuzev zemalja iz I grupe. Ovakva podjela trećih zemalja na rizične grupe ima praktičnu implikaciju da zemlje koje su svrstane u II i III grupu rizika moraju provesti neškodljivo uklanjanje svih rizičnih organa i tkiva prije izvoza na tržište EU u skladu sa propisanim operacijama od strane EU, dok zemlje EU to nisu obavezne činiti.

Ovakvo pooštravanje sigurnosnih i preventivnih mjera se svakako negativno odražava na ekonomski interes potrošača i samih trećih zemalja s jedne strane, ali s druge ima izuzetno pozitivan efekat na unaprjeđenje veterinarsko - sanitarnih mjera i kontrole u borbi protiv BSE-a, u smislu primoravanja trećih zemalja na kreiranje vlastite strategije u vezi sa problemom BSE-a, kao i implementaciji svih mjera koje su na snazi u EU unutar vlastitog tržišta.

Kako spriječiti pojavu BSE u Bosni i Hercegovini i šta uraditi kada se pojavi

Da li postoje razlozi za zabrinutost

Potencijalni rizik od prionskih bolesti u BiH je značajan imajući u vidu da se cijelokupna mesoprerađivačka industrija u BiH dugoročno bazira na mesu iz uvoza. Sadašnje stanje u BiH u pogledu borbe protiv BSE-a je

gotovo poražavajuće. Osim nekoliko zakonskih akata u smislu zabrana uvoza i prevoza malih i velikih preživara, kao i mesnih proizvoda i stočne hrane iz određenih zemalja EU, nikakve konkretnije mjere niti aktivnosti nisu do sada poduzete. U posljednjih nekoliko godina, ponavljaju se izjave da u nekim zemljama nije bilo prijavljenih slučajeva BSE zbog toga što nije bila uspješno provedena opservacija. To što nije bilo prijavljenih slučajeva sve do danas se automatski povezivalo s tim da nije bilo ni bolesti BSE. Ovo može biti značajan problem: u zemlji ima slučajeva BSE, ali nisu dijagnosticirani ili prijavljeni, a izvozne/uvozne aktivnosti se nastavljaju pod pretpostavkom da u zemlji nema slucajeva BSE-a zatim se zaraza pojavljuje u drugim zemljama.

U mnogim zemljama Evrope sistem aktivnog nadgledanja je sada uspostavljen; testovi na BSE se vrše u rizičnim populacijama od 1999/2000. Testiranje životinja obuhvata i umrle krave, odnosno hitno klanje zdravih životinja ili hitno zaklanih životinja. Prvi rezultati jasno ukazuju da je aktivno nadgledanje objektivniji pristup i da može pomoći u procjeni stvarne situacije u pogledu BSE u zemlji. Shodno tome, u nekim zemljama Evrope, za koje se smatralo da već godinama nema pojave BSE sada se pokazalo da ima slučajeva BSE.

U Bosni i Hercegovini, nažalost, ne postoji nikakva dijagnostička aktivnost, niti ozbiljniji planiran i ciljan pristup rješavanju ovog možda najaktuelnijeg pitanja iz domena bolesti prenosivih sa životinja na ljude. Ovo je svakako samo jedan u nizu mnogobrojnih problema u domenu veterinarske medicine i javnog zdravstva, odnosno odraz sveukupne zakonodavne, političke i ekonomske situacije u BiH. Konkretno je to i pitanje konačnog formiranja Veterinarskog instituta, koji je jedna od osnovnih obilježja svake normalne države i predstavlja polaznu instituciju zaštite zdravlja ljudi i životinja. Korjenit i efikasan početak rješavanja ovakvih problema bi bilo stvarno i puno zaživljavanje Veterinarskog instituta, što podrazumjeva znantna ulaganja u opremu i stručnjake i formiranje Centra za praćenje prionskih bolesti.

Nadgledanje/monitoring BSE

Važan ključ za ocjenjivanje stvarne situacije u pogledu BSE u našoj zemlji moze biti sistem nadgledanja. Sve do prije nekoliko godina, monitoring BSE je zavisio samo od prijavljivanja klinički sumnjivih slučajeva. Pretpostavljalo se da se na taj način omogućava pravovremeno utvrdjivanje pojave bolesti i da je taj način mnogo djelotvorniji od metoda slučajnog uzorka svih zaklanih zivotinja. Medjutim, sitem ovakve vrste zavisi od mnogih faktora poput saznanja o bolesti, efikasnoj veterinarskoj infrastrukturi i motivacije za prijavljivanje. U posljednje vrijeme postalo je sasvim jasno da sam sistem pasivnog nadgledanja koji se zasniva na prijavljivanju sumnjivih slučajeva nije dovoljan da pruži dokaze o nepostojanju BSE. Dostupnost brzih testova BSE omogućava brzo testiranje u velikom omjeru tkiva mozga koje nije

komplikovano i identificiranju inficiranih životinja u posljednjoj fazi perioda inkubacije. Time se omogućava da se provedu programi aktivnog nadgledanja u rizicnim populacijama. Švicarska je bila prva zemlja na svijetu koja je uvela metod aktivnog nadgledanja BSE 1999. godine. Od januara 2001. godine implementirano je aktivno nadgledanje u svim zemljama koje su clanice EU.

Mjere za eradikaciju BSE

Najvažnija akcija za eradikaciju BSE kod goveda je uvodjenje zabrane na MBM za korištenje kod preživara. Mada je ova mjera prilično djelotvorna, ipak nije dovoljno djelotvorna da svede nivo infekcija kod goveda na nulu. Drugi bitan elemenat da se sirovine obradjuju procesom u peći na temperaturi od 133 C, pod pritiskom od 3 bara, u periodu od 20 minuta, mada čak i ovakav tretman inficiranog materijala ne može u potpunosti reaktivirati uzročnike ukoliko je početni nivo inficiranosti bio previsok. Drugo važno pitanje je uklanjanje i spaljivanje odredjenog rizičnog materijala.

Neophodne mjere za umanjenje rizika

Vezano za mjere koje treba poduzeti u cilju sprječavanja rizika za prionske bolesti u našoj zemlji, najinterventnije što se mora poduzeti jeste:

- formiranje i opremanje Centra za prionske bolesti pri Veterinarskom institutu Veterinarskog fakulteta Sarajevo za aktivno nadgledanje bolesti,
- uspješna implementacija EU/PHARE projekta: Identifikacija i kotrola kretanja goveda u Bosni i Hercegovini koji će uključiti permanentno praćenje populacije goveda, naročito onih iz uvoza, utvrditi identitet životinja, te uspostaviti i koristiti datoteku svih životinja sa mogućnošću praćenja svake jedinke od rođenja do kraja života;
- utvrditi broj i identificirati sva uvezena grla, naročito goveda, kao i stvarno uvezene količine stočne hrane i njihove uvoznike;
- spriječiti ilegalan uvoz stoke i sve granične prijelaze staviti pod strogu državnu kontrolu;
- revidirati sve male i neodgovarajuće objekte za klanje stoke, zabraniti klanje goveda rizičnih kategorija starijih od 30 (24) mjeseci u svim objektima koji nemaju stalnu veterinarsko-sanitarnu kontrolu;
- prilikom uvoza mesa malih i velikih preživara tražiti od zemlje isporučioca čvrste garancije da meso potiče od zdravih životinja koje su u toku klanja pregledane na uzročnika BSE-a;
- zabrana ishrane preživara bjelančevinama porijeklom od preživara i kontrola provodjenja;
- usaglašavanje postojećih i donošenje novih normativnih akata koji tretiraju ukupnu problematiku vezanu za pojavu, sprečavanje širenja i iskorjenjivanja bolesti;

- zabrana uvoza krmiva animalnog porijekla i tkiva visokog rizika;
- zabrana uvoza mesa iz zemalja s pojavom govedje spongiformne encefalopatije;
- permanentna edukacija veterinara, farmera, mesara, prevoznika, trgovaca i gradjana.

Umjesto zaključka

OIE i Evropska unija donijeli su kriterije po kojima će svrstavati zemlje, odnosno dodjeljivati svakoj od njih tzv. GSE status, što je ključno za učešće svake zemlje u medjunarodnoj trgovini. Ukoliko želimo BiH kao zemlju slobodnu od BSE i da bi bili ravnopravni partneri u medjunarodnoj trgovinu moramo ispoštovati i ispuniti sve propozicije OIE i EU u cilju sprečavanja pojave bolesti . Mislimo da mi to možemo, da imamo solidan stručni i naučni potencijal i ostaje nažalost konstatacija da su odluke i odgovornosti u rukama domaćih političara. Političari pazite, u vašim rukama je sudbina zdravlja, građana Bosne i Hercegovine i ekonomski prosperitet društva u cjelini.

Literatura

1. **Bajrović T., Šerić K.:** *Goveđa spongiformna encefalopatija,* Zbornik radova Prvog savjetovanja veterinara F BiH, 139 - 141, Neum 1977.
2. **Bruce, M.E.,R.G. Will, J.W. Ironside, Mc Connel, D. drumond, A. Suttie, L. Mc Cardie, A. Chree, J. Hope, C. Birkett, S. Cousens, H. Frazer, C.J. Bostock (1997.):** *T* ransmissions to mice indicate the "new variant" CJD is caused by the BSE agents; Nature 389, 498 - 501.
3. **Cvetnić S. (1991):** *Goveđa spongiformna encefalopatija;* Praxis vet. 39, 57-67.
4. **Jukić B., Brstilo M., Lojkić M., Šoštarić B., Njari B.:** *Prionske bolesti - trajna opasnost;* Veterinarski dani 2001, Opatija, Hrvatska, Zbornik radova 13 - 25, Septembar 2001.
5. **Khim U.:** *Kontrola BSE-bovine spongiformne encefalopatije u Evropi,* EU/PHARE Međunarodni seminar o planiranju kontrole i eradikacije bolesti u BiH, Jahorina, 27/28 septembar 2001.
6. **Milanović A.:** *Goveđa spongiformna encefalopatija (BSE) - Veterinaski, javnozdravstveni i gospodarstveni problem,* Veterinaria, Vol. 49, Sv. No. 1 - 2, Sarajevo 2000.
7. **Prusiner S.B.(1995):** *The Prion Diseases;* Scien. American, January , 30 - 37.
8. **Prusiner S.B.:** *Prions causing degenerative neurogical diseases,* Annual review of medicine: selected topics in the clinical sciences, 38, 381 - 389, 1987.
9. **Smajlović M., Čaklovica F., Smajlović A., Bajrović T., Alagić D.:** *Mogući prenos spongiformne encefalopatije goveda (BSE) na ljude,* Ref. Prvi Kongres veterinara BiH, Tuzla 1999.
10. **Zepeda C., Salman M.D., Ruppanner R.:** *International Trade, animal health, and veterinary epidemiology: challenge and opportunities,* J.Pre.Vet. Med. (48):261-272, 2001.

IDEJNI PROJEKTI

IZLAGANI NA PLENUMU CENTRA ZA MEDICINSKA ISTRAŽIVANJA ANUBiH KOJI SU NAKON OPSEŽNE DISKUSIJE DOBILI SAGLASNOST ZA IZRADU IZVEDBENIH PROJEKATA

ANU BiH АНУ БиХ

ANU
BiH
АНУ
БиХ

Fitofarmaka za 21. stoljeće - teorijski i praktični aspekti

Jela Grujić-Vasić[1], Sulejman Redžić[2]

Istraživački projekat "Fitofarmaka za 21. stoljeće - teorijski i praktični aspekti" po svom problemu predstavlja megaprojekat koji je struktuiran u više funkcionalnih segmenata od kojih svaki može biti i zaseban projekat. Svaki od dijelova će biti realiziran od strane eksperata u tim naučnim oblčastima, a dobijeni rezultati će poslužiti za formiranje jedinstvene naučne baze podataka u ovoj oblasti, ukoliko dozvole odobrena financijska sredstva.

Naučne oblasti i učesnici u projektu:

Resursi viših biljaka, algi, gljiva i lišajeva

Prof. dr Sulejman Redžić, redovni profesor
Mr. sc. Senka Barudanović, viši asistent
Mr. sc. Samir Đug, viši asistent
Tatjana Kapetanović, dipl. biolog, asistent

Genetika resursa

Akademik Ljubomir Berberović, redovni profesor

Farmakognozija i hemija droga

Akademik Jela Grujić-Vasić, redovni profesor
Doc. dr. sc. Elvira Kovač, docent
Dr. sc. Tamara Bosnić, docent

Biohemija i radiohemija biljnih resursa

Dopisni član ANUBiH Zdravko Pujić, redovni profesor

ANU BiH АНУ БиХ

[1] Akademija nauka i umjetnosti BiH

[2] Centar za medicinska istraživanja ANUBiH u Sarajevu i Centar za ekologiju i prirodne resurse Prirodno-matematičkog fakulteta Univerziteta u Sarajevu

Farmakologija i toksikologija

Prof. dr. sc. Irfan Zulić, redovni profesor

Farmaceutsko oblikovanje

Prof. dr sc. Sabira Hadžović, redovni profesor

Marketing

Prof. dr Boris Tihi, redovni profesor
Mr pharm Mr sci Sejfudin Tokić
Mr pharm Mijat Tuka

Farmaceutska biologija, Farmakologija, Fitohemija

Doktoranti i magistranti (2+2)

Opravdanost projekta

Fitofarmaka su biljni medicinski produkti koji se proizvode i koriste u svim evropskim državama kao i u mnogim drugim dijelovima svijeta. Imajući u vidu činjenicu da su ljekovite biljke glavni resursi za fitofarmaka i da se predviđa da će u 21. stoljeću proizvodnja i upotreba biljnih medicinskih produkata biti u velikom porastu smatramo da ovaj projekat ima punu aktuelnost za budućnost.

U BiH obrada ljekovitog bilja nije dostigla nivo razvitka koji bi mogla i trebala, pa i dalje, obrada ljekovitog bilja kao glavnog resursa u ovom projektu predstavlja doprinos kako nauci tako i ekonomiji BiH i zdravstvu. Postoji velika opravdanost prihvaćanja ljekovitog bilja kao opšte priznatog prirodnog resursa u bosanskohercegovačkoj obnovi kao i rekonstrukciji društvene, ekonomske i naučno-istraživačke infrastrukture.

Sama tehnologija biljnih medicinskih produkata - fitofarmaka predstavlja i unapređenje male privrede a, uz dobro izabrane kvalitetne resurse, i povećanje obima farmaceutske industrije.

Biljni resursi

U procesima obnove i rekonstrukcije bosansko-hercegovačke društvene, ekonomske i naučno-istraživačke infrastrukture, značajno mjesto mogu imati i prirodni resursi sadržani u autohtonim ljekovitim, jestivim, aromatičnim i vitaminskim biljnim vrstama. Do sada ova mogućnost je veoma malo korištena u Bosni i Hercegovini (BiH).

Bosna i Hercegovina, u svojoj flori viših biljaka broji oko 5000 vrsta, podvrsta i varijeteta, oko 3000 vrsta cijanobakterija ili modrozelenih algi i algi, te oko 3000-5000 vrsta gljiva i lišajeva. To čini Bosnu i Hercegovinu među najbogatijim zemljama u Evropi. Ako se uzme broj vrsta i relativno mala površina, tada BiH spada u red zemalja sa najvišim nivoom specijske

raznolikosti ili biodiverziteta. Biljne vrste, pored primarnih (ugljični hidrati, bjelančevine, masti) sadrže i širok spektar sekundarnih metabolita (alkaloidi, heterozidi, tanini, eterična ulja, gorke materije, steroidi, vitamini, minerali i sl.). Sve ove materije imaju visok nivo primjene u savremenoj farmaciji, medicini i tehnologiji.

Osim toga, BiH je jedna od najbogatihjih zemalja po broju endemičnih vrsta. Smatra se da ih ima oko 500 u kategoriji viših biljaka, znatno više u kategoriji algi i cijanobakterija.

Stepen njihove istraženosti je izuzetno nizak. Prema zvaničnim podacima, u BiH se kao oficijelne ljekovite biljke koristi samo oko 40 vrsta viših biljaka, skoro niti jedna alga. Slična praksa je i sa gljivama. Prema etnobotaničkim i etnofarmaceutskim izvorima, u prošlosti se koristilo nešto oko 600 vrsta biljaka. Istraživanja koja su vršena u posljednjih 20 godina na flori Bosne i Hercegovine, pokazuju da je broj potencijalno ljekovitih, jestivih, vitaminskih i aromatičnih vrsta biljaka i gljiva znatno veći. Medjutim, mnoge od njih treba sistematski istražiti, uz upotrebu savremenih metoda i dostignuća instrumentalne tehnike. Također, iz nekih naših endemičnih biljka izolirani su potpuno novi spojevi.

Biljni genofond kakav ima BiH pruža neslućene mogućnosti u dobijanju jedinstvenih organskih i anorganskih spojeva sa širokim spektrom farmakološkog i fiziološkog djelovanja. Među biljkama koje danas važe kao oficijelni antikancerogeni, u BiH postoje njihovi veoma bliski srodnici, koji sigurno imaju slična svojstva, samo ih je neophodno istražiti. S druge strane, originalnost u genetičkoj strukturi i ekološkoj determinaciji područja, biljke čini strateškim resursima na kojima tek treba da se temelje komparativne prednosti u projektovanju razvoja BiH, te novih naučno-istraživačkih pravaca.

Galenski oblici fitofarmaka

Kao ljekoviti pripravci i njihovi galenski oblici u ovom projektu prema rezultatima ispitivanih biljnih resursa bili bi izabrani uzorci koji se danas najčešće pominju i koriste, a to su: kapi, tablete, dražeje, prašci, granule i čajne smjese, a kao alkoholni ekstrakti tinkture.

Tehnologija dobivanja fitofarmaka i ispitivanje kvaliteta

Tehnologija dobivanja fitofarmaka zavisit će od izabranog galenskog oblika, uz puno poštovanje modernih naučnih dostignuća, imajući u vidu metode prireñivanja ekstrakata iz biljnih droga.

Ispitivanje kvalitete fitofarmaka bit će provedeno prema propisima ispitivanja kvaliteta ljekovitih pripravaka. Mora se napomenuti da će izbor galenskog oblika fitofarmaka, tehnologije, kao i ispitivanje kvaliteta gotovog produkta ovisiti o dodjeljenim financijskim sredstvima. S tim u vezi, napominjemo da bi projekt trebao imati dva dijela:

1. Ispitivanje kvaliteta i rasprostranjenosti ljekovitoh biljaka u odabranim regionima. Ovaj dio projekta mogao bi nositi podnaslov: Ispitivanje resursa za dobivanje biljnih medicinskih produkata - fitofarmaka.
2. Proizvodnja odabranih biljnih produkata - fitofarmaka i ispitivanje njihovog kvaliteta.

LITERATURA

1. Wichtl, M (1997): *Teedrogen und Phytopharmaka 3.* Aufl. Wissenschaftliche Verlagegesellschaff, Stuttgart.
2. Martindale: *The Extra Pharmacopoea.* Thirty - first Edition.
3. *European Pharamacopeia 2.* Edition.
4. Dr. Konstantin Keller (1998): *Herbal Medicinal Products in the Europaean Unior - Legal status and critaria for Assasment.* Phytopharmaka - forschung 2000, Bonn.
5. Redžić S., Čerkez F., Grujić-Vasić J., Ibrulj A. (1997): *Abstrakt.* Simpozij "Farmacija u ratu", Sarajevo 13/12
6. Redžić S., Grujić - Vasić J., Čerkez F., Mulabegović V., Jakšić D., Ibrulj A.: *Collection and utilisation of medicinal plants during the war in Sarajevo, Leitschrift fur Phytotherapie.* 8. Kongress der Gesellschaft fur Phytotherapie, Wiirzburg 27-28. November, abstracts, p. 4, Hippokrates Verlag GMBH, Stuttgart.
7. Jaksić D., Grujić - Vasić J., Ibrulj A.: *Study of tannins and mucilage of Anchusa officinalis L.* Congress International European Society of Ethnopharmacology. Resumes, Medicines of the XXI th centurv, Metz, France, Metz, 2000 p. 59.
8. Grujić-Vasić J. et al (1991): Academy of Sciences and Arts of Bosnia and Herzegovina, Works, 25, 261-269.
9. *WHO Drag Information.* World Health Organization, Geneva: Herbal Medicines, Vol. 14, No. 4, 2000, p. 237-249.

Imunohistohemijska studija epitelne displazije u ravnoj upalno promijenjenoj sluznici debelog crijeva

Aleksandar Nikulin[1)], Svjetlana Radović[2)], Ivan Selak [2)]

Epitelna displazija (ED) je prekancerozna lezija jednorednog i višeslojnog epitela. Radi se o specifičnom stanju epitela, čija pojava povećava rizik od nastanka karcinoma. Kod ED javlja se pojačana proliferacija i dediferencijacija stanica, koje vode razvoju epitelnih abnormalnosti. ED je dobro diferenciran skup morfoloških entiteta i predstavlja morfološku ekspresiju jednog stepena zbivanja koji nastaju na putu formiranja karcinoma. Dinamika progredirajućih promjena u ED koja nastaje u ravnoj mukozi kolona, poznata je samo na osnovu morfoloških zbivanja, dok su zbivanja koja nastaju na molekularnom nivou uglavnom nepoznata. Molekularna odstupanja prethode i diktiraju stanični fenotip, ali nisu primjetna pri svjetlosnoj mikroskopiji preparata bojenih standardnom hematoksilin-eozin metodom. Imunohistohemijska bojenja omogućavaju detekciju dijagnostički vrijednih antigena, na osnovu čije količine i načina prezentiranja se može suditi o procesima preobrazbe koji nastupaju u tkivu. U transformišućim stanicama dolazi do promjena u čitavom nizu antigena, čijim se ispitivanjem, na posredan način, mogu dobiti informacije o funkcionalnim zbivanjima unutar stanica.

Cilj

Cilj rada je da se primjenom široke palete antitijela za različite antigene rezidentnih stanica, dođe do saznanja o biološkom karakteru ED koja je nastala u ravnoj sluznici kolona. Ispitat će se: u kom stepenu ED, koji je određen na osnovu tradicionalnih morfoloških kriterija, dolazi do promjene u načinu prikazivanja pojedinih antigena (pojave ili gubitka antigena, povećanja ili smanjenja njihove količine, promjene lokacije antigena, promjene intenziteta obojenosti antigena); za koji su stepen intenziteta ED vezane ove promjene; da se ispita obim stanične proliferacije koji određuje stepen agresivnosti lezije; da li je ED praćena promjenom u brojnosti neuroendokrinih

1) Akademija nauka i umjetnosti Bosne i Hercegovine

2) Institut za patologiju Medicinskog fakulteta u Sarajevu

stanica, na osnovu čega se može indirektno suditi o količini prisutnih hormona koje one stvaraju, a koji imaju upliva na održanje i ponašanje populacije epitelnih stanica; da se odredi brojnost perikriptalnih fibroblasta, stanica mezenhimalnog porijekla, koji učestvuju u regulaciji rasta i diferencijacije epitelnih stanica; da se odrede eventualne promjene u bazalnim membranama žljezdanih kripti, na osnovu čega se mogu dobiti informacije o zbivanjima na nivou ekstracelularnog matriksa, u kojem su BM jedna od osnovnih komponenti; odrediti ulogu celularnog imunološkog odbrambenog sustava u nastanku i progresiji ED, kao i to da li se na osnovu karaktera mononuklearne stanične reakcije može predvidjeti dalje ponašanje ispitivane lezije; sagledavanjem dobijenih relevantnih podataka odrediti eventualnu inicijalnu tačku maligne transformacije, odnosno njenu vezanost za određeni stadij ED.

Materijal i metode

Pregledat će se biopsijski uzorci ravne sluznice kolona najmanje 250 pacijenata, kod kojih se pri rutinskom endoskopskom pregledu postavi dijagnoza upalnog procesa bilo koje etiologije. Iz tekućeg obdukcionog materijala, uzet će se biopsijski uzorci sluznice debelog crijeva 40 pacijenata, kod kojih niti makroskopskim, a potom, niti mikroskopskim pregledom ne bude nađeno oboljenje debelog crijeva. Također, iz rutinskog obdukcionog materijala uzet će se biopsijski uzorci tkiva adenokarcinoma kolona 40 pacijenata, kod kojih se bude radilo o tzv. karcinomu de novo. Biopsijski uzorci normalne sluznice kolona i tkiva adenokarcinoma kolona poslužit će kao kontrola. Svi biopsijski uzorci bit će bojeni standardnom hematoksilin-eozin metodom. Uzorci 250 pacijenata će na osnovu karaktera morfološke lezije biti razvrstani u jednu od dvije kategorije promjena: kategoriju upalno-regenerativnih i kategoriju displastičnih lezija. Za svaki slučaj upalno-regenerirajućih promjena i ED, izvršit će se numerička procijenjena intenziteta lezije (1,2). Svi biopsijski uzorci će potom biti imunihostohemijski bojeni u cilju identifikacije čitavog niza antigena: za epitelne stanice (CK klon 116, CK 7, CK LMW 8, CK HMW 34 E 12, CK 10/13, CK 18, CK 19, CK 20, EMA); za sekrecijske produkte epitelnih stanica (CEA i SC); za neuroendokrine stanice (chromogranin A); za antigene koji su pokazatelji dinamike stvaranja novih (proteini Bcl-2 i Ki-67) i izumiranja starih epitelnih stanica (protein p53); antigene miofibrilarnih perikriptalnih stanica koje su mezenhimalnog porijekla (alfa-aktin glatkih mišićnih stanica, mišićno-specifični aktin, vimentim i dezmin); za kolagen tipa IV, koji je jedna od sastavnih komponenti bazalne membrane žljezdanih kripti; za antigene imunokompetentnih stanica lamine proprie -T limfocite (CD 45 RO), B limfocite (CD 20) i makrofage (CD 68). Za svaki ispitivani antigen, zavisno od njegove vrste, sačinjen je imunohistohemijski status koji je obuhvatio procjenu: brojnosti imunoreaktivnih stanica, koja je određena semikvantitativnom metodom; intenziteta obojenosti antigena;

lokaciju antigena unutar stanica (apsorptivnih, peharastih i nediferenciranih) odnosno unutar kripti; načina prikazivanja kolagena tipa IV oko žljezdanih kripti; tipizacije stanica lokalnog imunološkog odgovora i određivanje njihovog položaja u odnosu na leziju i same epitelne stanice. Pri mikroskopskoj evaluaciji imunohistohemijski bojenih preparata bit će korištena opće prihvaćena semikvantitativna metoda procjene antigen pozitivnih stanica. Za svako primijenjeno antitijelo bit će urađen odgovorajući protokol verifikacije i kvantifikacije nađenih promjena.

Očekivani rezultati

Nakon patohistološke evaluacije prisustva upalno-regenerativnih i displastičnih lezija, kao i procjene njihovog intenziteta, pristupilo bi se analizi istih tih tkivnih uzoraka bojenih imunohistohemijskom metodom sa čitavim nizom različitih antitijela.

U toku nastanka i daljeg razvoja ED u ravnoj mukozi kolona, nastaju promjene u sintezi staničnih proteina, bilo da se radi o onima koji su sastavni dijelovi citoskeletona, stanične membrane ili da su produkti stanične sekrecije (3, 4, 5, 6, 7). Keratinski polipeptidi (citokeratini, CK) se u epitelnim stanicama mukoze kolona zapažaju u vidu difuznog citoplazmatskog bojenja, koje je različitog intenziteta i količine, u ovisnosti od tipa epitelnih stanica i od oblika epitelne lezije. Očekuju se promjene u načinu njihove ekspresije u sklopu displastičnih lezija.

Promjene u načinu prikazivanja bcl-2 proteina (8,9) i proteina p53 (10, 11) u ED ravne mukoze kolona, ukazivat će na to da je došlo do mutacija gena bcl-2 i p53 i da je mutacija uključena u genezu ED.

U procesu razvoja ED, pored niza staničnih poremećaja, dolazi i do pojačane stanične proliferaciie, koja se može pratiti kroz ekspresiju proteina Ki-67 (12).

Bit će ispitivano ponašanje endokrinih stanica mukoze kolona (13), koje se nalaze unutar kripti, ali i u perikriptalnoj zoni.

U toku nastanka i razvoja ED u ravnoj mukozi kolona, očekuje se da promjenama nisu zahvaćene samo epitelne, već i mezenhimalne stanice, kao i neke strukture ECM. Ispitivanja razvoja PKF (14, 15) u svjetlu njihove diferencijacije, proliferacije i genetskih zbivanja, mogu biti od velike pomoći u razumijevanju odnosa između fenotipa i genotipa ovih stanica, što će, nedvojbeno, omogućiti još bolje definisanje rizika od nastanka karcinoma kod pacijenata sa tipom morfoloških lezija koje su u ovoj studiji i istraživane.

Kolagen tipa IV, kao sastavna komponenta BM, u displastično izmijenjenoj ravnoj mukozi kolona vierovatno će u načinu prikazivanja pokazivati stanovit stepen anomalija, čiji će obim i način korelacije sa jačinom ED biti istražen. Modifikacija u prikazivanju BM uvijek je ekspresija poremećene interakcije na relaciji stanica-BM, koja mora da je uključena u proces razvoja ED (16).

Pokušat će se odrediti uloga celularnog imunološkog odgovora unutar premaligne lezije, te utvrditi da li se na osnovu karaktera stromalne mononuklearne stanične reakcije može napraviti razlika između lezije koja ima bolju, odnosno goru prognozu, tj. koja progredira u karcinom.

Zaključak

A propos promjena na molekularnom nivou, sumiranjem svih dobijenih rezultata, pokušat će se odrediti inicijalna tačka maligne transformacije u višestepenom procesu maligne preobrazbe epitela sluznice kolona. Spoznajom promjena na metaboličkom nivou, dobit će se precizniji podaci o kvantumu malignog potencijala pojedinih stepena ED. Kako promjene na morfološkom nivou zaostaju za promjenama na molekularnom nivou, a koje se daleko ranije pojavljuju, imunohistohemijska metoda je veoma pogodna za ovu vrstu istraživanja. Istraživanje je od praktičnog značaja i važnosti i za kliničare gastroenterologe, jer bolje poznavanje prirode ED ima uticaja na terapeutski tretman, koji nije jednak za sve stepene ED.

Literatura

1. **Nikulin A, Radović S.:** *Razrada morfoloških kriterija za dijagnosticiranje displastičnih promjena u sluznici debelog crijeva (Analysis of morphological criteria for the diagnosis of dysplastic changes in the colon mucosa).* Radovi ANUBiH, Odjeljenje medicinskih nauka 1991; 25: 33-43.
2. **Radović S.:** *Definicija morfoloških kriterija za dijagnosticiranje displastičnih promjena u sluznici debelog crijeva.* Magistarski rad 1989; Sarajevo.
3. **Heatley MK.:** *Cytokeratins and cytokeratin staining in diagnostic histopathology.* Histopathology 1996; 28: 479-483.
4. **Sloane JP, Ormerod MG.:** *Distribution of epithelial membrane antigen in normal and neoplastic tissues and its value in diagnostic tumor pathology.* Cancerl981; 47: 1789-1793.
5. **Haynes WDG, Shertock KL, Skinner JM, Whitehead R.:** *The ultrastructural immunohistochemistry of oncofetal antigens in large bowel carcinomas.* Virchows Arch A Pathol Anat Histopath 1985; 405: 263-275.
6. **Vogel CA, Galmiche MC, Westermann P, Sun LQ, Plegrin A, Folli S. et al.:** *Carcinoembryonic antigen expression, antibody localization and immunophotodetection of human colon cancer liver metastases in nude miče: a model for radioimmunotherapy.* Int J Cancer 1996; 67: 294-302.
7. **Weisz-Carrington P, Poger ME, Lamm PE.:** *Secretory immunoglobulins in colonic neoplasm.* Am J Pathol 1976; 85: 303-316.

8. **Bronner PM, Culin C, Reed JC, Furth EE.:** *The bcl-2 roto-oncogene and the gastrointestinal epithelial tumor progression model.* Am J Pathol 1995; 146; 20-26.
9. **Joensuu H, Pylkkanen L, Toikkanen S.:** *Bcl-2 protein expression and long term survival in breast cancer.* Am J Pathol 1994; 145: 1191-1198.
10. **Friedrich K, Dimmer V, Haroske G, Meyer W, Theissig F, Thieme B, Kunze KD.:** *Morphological heterogeneitv of p53 positive and p53 negative nuclei in breast cancers stratified by clinicopathological variables.* Analytical Cellular Pathology 1997; 14: 111-123.
11. **Leonardi E, Cristofori A, Caffo O, Dalla Palma P.:** *Cytometric DNA analysis and prognostic bioniarkers in breast carcinoma, Expression of p53 product in the different ploidv classes.* Analytical Cellular Pathology 1997; 15: 31-45.
12. **Linden MD, Ma CK, Kubus J, Brown RD, Zarbo RJ.:** *Ki-67 and proliferating celi nuclear antigen tumor proliferative indices in DNA diploid colorectal adenocarcinomas.* Am J Clin Pathol 1993; 100: 206-212.
13. **Van den Ingh H, Van den Broek L, Verthofstad A.:** *Neuroendocrine cells in colorectal adenomas.* J Pathol 1986; 148: 231-237.
14. **Yao T, Tada S, Tsuneyoshi M.:** *Colorectal counterpart of gastric depressed adenoma with special reference to the development of pericriptal fibroblasts.* Am J Surg Pathol 1994; 18: 559-568.
15. **Yao T, Talbot IC.:** *The demonstration of pericriptal fibroblasts in background mucosa and dysplasia complicating ulcerative colitis.* Histopathology 1996; 28: 325-3.
16. **Visser R, Van der Beek JMH, Havenith MG, Cleutjens J, M Bosman FT.:** *Immunocytochemical detection of basement membrane antigens in the histopathological evaluation of laryngeal dysplasia and neoplasia.* Histopathology 1986; 10: 171-180.

ANU
BiH
АНУ
БиХ

Fenotipska i genotipska istraživanja epidemiologije, faktora rizika i terapije bolničkih pacijenata kod sistemne kandidijaze i aspergiloze

Ladislav Ožegović,[1] Mirela Babić[2] i Đemo Subašić[2]

Kandidijaze i aspergiloze predstavljaju veliki problem u izabranim skupinama bolesnika koji su zbog raznih primarnih bolesti dovedeni u stanje smanjene imunokompetentnosti, bilo pod djelovanjem kortikosteroida, citostatika, antibiotika ili drugih jatrogenih faktora, često uz istovremeno prisutne primarne bolesti koje traže veoma složene zahvate i liječenje. Takva stanja su opažena kod niza kirurških zahvata (posebno transplantacija), u jedinicama intenzivne njege (posebno nedonoščadi i bolesnika sa primjenom katetera u svrhu ishrane ili stalne aplikacije lijekova), te je kasna dijagnostika uzrok velikog broja latentnih slučajeva, koji su kod tih pacijenata od sistemne kadidijaze i aspergiloze, ukoliko se ne utvrde na vrijeme uzročni agensi i izvrši testiranje tih uzročnika na prikladne fungicide, veoma visoki (od 50% do 60%), tako da sav utrošeni trud, znanje i velika finansijska sredstva ostaju izgubljeni i pacijenti umiru, jer se dijagnoza ne utvrdi na vrijeme i liječenje ne usmjeri prema najefikasnijem fungicidu uz otklanjanje izvora infekcije.

U priloženom popisu navoda iz literature, koji su citirani kao aktualni problemi koje razmatra Europska konferencija medicinske mikologije (ECMM), vidi se važnost problema.

U nas do sada nije vršeno istraživanje takvih slučajeva, pa ne postoje naučno zasnovana saznanja ni o frekvenciji uzročnih agenasa u takvim infekcijama, kao ni o njihovom porijeklu, izvoru infekcije, koji bi za kandide mogao biti i endogene (ali i egzogene) prirode, a za aspergile prema našem saznanju nije ništa poduzimano da se već u početku eliminira mogućnost infekcije iz okoline pacijenta, bilo u toku primarnog zahvata (kirurški pacijenti) ili sekundarno iz okoline pacijenta.

[1] Akademija nauka i umjetnosti BiH

[2] Institut za mikrobiologiju, imunologiju i parazitologiju KCU Sarajevo

Dokazivanje povezanosti oboljenja s infekcijom kandidama i aspergilima, utvrđivanje njihove prisutnosti u krvi, determinacija vrsta i određivanje pripadnosti izolirane vrste metodom molekularne biologije, te utvrđivanje osjetljivosti - rezistencije na fungicide, otvara realnu pretpostavku, da se pravilnim postupkom i na vrijeme reagira i smanji ili otkloni veliki broj letalnih završetaka kod svih skupina ugroženih pacijenata.

U Bosni i Hercegovini nije poznato šta se događa sa bolesnicima koji u toku liječenja primaju kortikosteroide, antibiotike, citostatike ili boluju od neishranjenosti (nedonoščad i starije osobe, posebno one sa kateterima), te se očekuje da veliki dio tih bolesnika zbog izostanka prave dijagnoze uza svu prethodno pravilno usmjerenu terapiju umire od kandidijaze ili aspergiloze. Postoji mogućnost da jedan manji dio takvih pacijenata bude inficiran i nekim drugim fungalnim agensom, kao što je slučaj kod "importiranih" slučajeva histoplazmoze, penicilioze (marneffei), kokcidioidomikoze, parakokcidioidomikoze ili koje druge endemske sistemne mikoze, ali i nekim od "običnh" oportunističkih funga, koji su neobično česti uzročnici utvrđeni nakon pojave HIV pozitivnih pacijenata, ali i kod takvih pacijenata kandidijaze i kriptokokoze su najčešći uzrok komplikacija i letalnih egzitusa, kad uz sve ostale sistemne mikoze kandidijaze i kriptokokoze (u svijetu) predstavljaju više od 80% tih infekcija u imunokompromitiranih pacijenata.

Pretpostavka je da će se u toku istraživanja kandidijaze i aspergiloze naići i na pojedinačne slučajeve ovakvih sistemnih mikoza, i na taj način utvrditi da li i kod nas ima tih "importitanih" mikoza, kao što je to utvrđeno u više zemalja Europe.

Istraživanje treba usmjeriti u prvom redu na bolesnike od leukoza (djeca i odrasli), na nedonoščad, bolesnike od malignih oboljenja pod djelovanjem citostatika, bolesnike težih kirurških zahvata, dijabetičare, kao i sve pacijente u intenzivnoj njegi i one koji zbog niza razloga imaju stalno ili povremeno implantirane katetere, kao i one koji primaju kortikosteroide i antibiotike kroz dulji period i u kojih se pojave znakovi nepoznate septikemične infekcije, koja ne reagira na uobičajenu terapiju.

Svaki od takvih bolesnika koji su naprijed spomenuti, uz redovitu kontrolu hematoloških parametara, posebno leukocita i CD+ 4 stanica, treba biti podvrgnut sljedećem postupku:

1. Dokaz uzročnog agensa kulturom iz krvi, urina ili katetera-rane;
2. Kod utvrđivanja agensa u pacijenata odrediti metodom ELISA korelaciju sa stanjem pacijenata;
3. Kod svakog izolata odrediti porijeklo fungalnog agensa, endogenog ili egzogenog izvora, metodom uspoređivanja izolata iz pacijenta i okoline metodama molekularne biologije (PCR) i time isključiti eventualnu daljnu kontaminaciju pacijenata. U slučaju kontaminacije iz okoline lokalizirati izvor infekcije (humani ili iz sredine - predmeti - zrak u neposrednoj okolini pacijenta);

4. Svaki izolat uz standardnu determinaciju vrste treba podvrgnut metodi istraživanja osjetljivosti - rezistencije na pristupačne fungicide metodom National Committee for laboratory standards (NCCL), Standford (USA), protokol 28. Ovo je posebno važno kako zbog reagiranja izolata na fungicide, tako i zbog toksičnih efekata pojedinih fungicida

Na osnovu svih prikupljenih pojedinačnih podataka može se uspješno liječiti i izliječiti pacijenti rizičnih skupina i time smanjiti veliku smrtnost.

LITERATURA

1. **Grillot Renée:** *Epidemiological survey on candidemia in Europe.* Mycology Newsletter 1998, 2, 11-12.
2. **Grillot Renée:** *Consensus conference on prevention of aspergillosis in immunocompromised patients.* Mycology Newsletter 2000, 1, 7-8.
3. **Berenguer L.:** *Candidosis.* Revista Iberoam Micol 17, 109, 2000. abstract.
4. **Bernhardt H. et all:** *Different risk factors of fungal infections in patients of ICU.* Revista Iberoam Micol 17, 111, 2000. abstract.
5. **Rantala A.:** *Candidosis in the critical surgical patient.* Ibid, 111, abstract.
6. **Nolard Nicole, Heinemann Suzanne:** *Environmental samplings in the hospital: when, how i where?* Ibid, 112, abstract.
7. **Warris Adilia:** *Hospital water as a source of filamentous fungi: A new route of transmission?* Ibid, 112, abstract.
8. **Derouin F.:** *Relationship between recovery of filamentous fungi and nosoconial aspergillosis.* Ibid, 112, abstract.
9. **Ponton J. et all:** *Molecular epidemiology of candidiasis.* Ibid, 116, abstract.
10. **Palomar M. et all:** *Reasons for the use of antifungal agents in patients admitted in the intensive care unit.* Ibid, 136, abstract.
11. **Dimoupoulos G. et all:** *Evaluation of PCR and Platelia Candida antigen and antibody in early detection of candidaemia in ICU patients.* Ibid, 129, abstract.
12. **Rodriguez H. et all:** *Study of candidaemias in a cancer hospital.* Ibid, 138, abstract.
13. **Faure O. et all:** *Fungal risk in the hospital environment: A 8 years study.* Ibid, 138, abstract.
14. **Lopes M.M. et all:** *Nosocomial yeast infections in neonatal care unit.* Ibid, 141, abstract.
15. **Guiot H.Fl. et all:** *Intensive rebuilding of a BMT ward and the risk of infection of fungal spores to patients with compromised host defence.* Ibid, 141, abstract.
16. **Ainscough S. et all:** *Blood stream infections due to Candida species in England and Wales: Data from ECMM epidemiology survey of candidaemia in Europe.* Ibid, 142, abstract.

17. **Peman J. et all:** *Epidemiological survey of candidaemia in Spain.* Ibid, 142, abstract.
18. **Viviani MA. et all:** *ECMM Survey of candidaemia in Europe. Report from Italy.* Ibid, 143, abstract.
19. **Grillot R. et all:** *Workig group of ECMM candidaemia. ECMM prospectiv epidemiology survey of candidaemia in Europe. Report from France.* Ibid, 144, abstract.
20. **Bernhardt H. et all:** *Epidemiological survey of candidaemia in Europe: Results of Germany and Austria.* Ibid, 146, abstract.
21. **Klingspur Lena et all:** *ECMM's survey of candidaemia in Europe: Report from Sweden.* Ibid, 147, abstract.
22. **Amorim Cledja et all:** *Central venous catheter colonization by Candida spp in intensive care units patients.* Ibid, 149, abstract.
23. **Cardema I. et all:** *Candida spp. colonizations and infections in intensive care unit.* Ibid, 151, abstract.
24. **Vargas C. et all:** *Incidence of isolation for Candida spp in critical patients admitted into a medical-surgical ICU.* Ibid, 153, abstract.
25. **Grillot Renée et all:** *It is possible to demonstrate a link between nosocomial fungal infections and contamination of the hospital environment at last?* Mycoses, 44, Suppl. 1, 25-26, 2001, apstract.
26. **Klimko N. et all:** *ECMM survey of candidaemia in Europe. Report from Saint Petersburg, Rusia.* Mycoses, 44, Suppl. 1, 27, 2001, apstract.
27. **Leibowitz E.:** *Candidosis in neonatology the Israeli experience.* Mycoses, 44, Suppl. 1, 41, 2001, apstract.
28. **Müller E.M.C. et all:** *Systemic fungal infections in German neonatal intensive care units (NICUs)-ESPED survey.* Mycoses, 44, Suppl. 1, 52, 2001, apstract.
29. **Paniara O. et all:** *Mixed fungal infections in bone marrow transplant recipients.* Mycoses, 44, Suppl. 1, 57-58, 2001, apstract.
30. **Petrikos G. et all:** *National surveillance of systemic infections due to Aspergillus species: frequency of occurrence and antifungal susceptibility of isolates collected in 2000.* Mycoses, 44, Suppl. 1, 59, 2001, apstract.
31. **Tortorano A.M. et all:** *Candidaemia in prematures neonates. Report of 123 episodes from ECMM working group.* Mycoses, 44, Suppl. 1, 76, 2001, apstract.

Retrospektivno-prospektivna pilot studija praćenja rezistentnih sojeva mikroorganizama kao uzročnika intrahospitalnih infekcija u bolničkim odjeljenjima

Sabira Hadžović[1)]

Uvod

Intrahospitalne infekcije (nozokomijalne infekcije) kao infekcije izazvane rezistentnim sojevima mikroorganizama se pojavljuju u raspoloživoj literaturi istovremeno sa primjenom antimikrobika u terapiji infektivnih oboljenja. Usljed brzog razvoja otpornosti mikroorganizama na određene antimikrobike liječenje ovakvih infekcija je vrlo teško i neophodna je saradnja jednog tima u kojem je važno da su uključeni: kliničari, mikrobiolozi, infektolozi i magistri farmacije koji usko sarađuju u cilju smanjivanja mogućnosti razvoja ovih infekcija u takvom obimu da se više ne mogu kontrolirati raspoloživim antimikrobicima.

Protokol istraživanja

Metod rada

U ovoj studiji uradit ćemo analizu pojave rezistentnih mikroorganizama u bolničkim uslovima i naše istraživanje ćemo usmjeriti u nekoliko pravaca:

1. Analiza pojave rezistentnih mikroorganizama u retrospektivnom i prospektivnom dijelu istraživanja:
   a) rezistentni sojevi mikroorganizama,
   b) koliko često se javljaju,
   c) na kojim odjeljenjima,
   d) poslije kojih operativnih zahvata i
   e) nakon primjene kojih antimikrobika (veličina doze, dužina primjene) i dezinfekcionih sredstava.
2. Kolika je uspješnost liječenja takvih infekcija, koliko traje liječenje, koji tretmani su primijenjeni i koji antimikrobici (doziranje, interval doziranja) - prospektivni dio istrživanja.

[1)] Farmaceutski fakultet Univerziteta u Sarajevu

3. Nakon obavljene analize u dogovoru sa hirurgom predložiti odgovarajuće antimikrobike (kao lijek izbora) odgovarajuću shemu doziranja antibiotika da bi se postigla eradikacija odredjenih sojeva mikroorganizama.

Dizajn studije

Otvorena, retrospektivno-prospektivna, jednocentrična analiza razvoja rezistentnih sojeva mikroorganizama u bolničkim odjeljenjima.

Pilot studiju koju predlažemo proveli bismo u Općoj kantonalnoj bolnici u Sarajevu i predmet našeg ispitivanja je incidenca rezistentnih sojeva mikroorganizama u bolničkim uslovima.

Predmeti ispitivanja

1. Racionalna farmakoterapija infekcija u bolničkim uslovima,
2. Incidenca intrahospitalnih infekcija,
3. Farmakoterapija intrahospitalnih infekcija,

Cilj ispitivanja

Sprječavanje nekontroliranog širenja rezistentnih sojeva mikroorganizama u bolničkim uslovima.

Mjesto provođenja ispitivanja

Opća kantonalna bolnica Sarajevo, Mikrobiološki laboratorij.

Studija bi se sastojala iz dvije faze:

I faza:

U prvom dijelu istraživanja (retrospektivna faza) naša analiza bi bila usmjerena u dva pravca:

1. Incidenca rezistentnih mikroorganizama u proteklom periodu od pet godina. *Analizirali bismo rezultate bakterijskih kultura i antibiograma u proteklom periodu od 5 godina i pažnja bi bila usmjerena samo na dobro poznate rezistentne sojeve mikroorganizama (Methicilin rezistentni Staphylococcus aureus (MRSA), Vancomycin rezistentni enterococci (VER), rezistentni sojevi Psudomonas aeruginosa, Acinetobacter, Klebsiella, Serratia itd).*
2. Potrošnja antimikrobika po grupama na osnovu analize iz bolničke apoteke. *U ovom dijelu istraživanja analizirali bismo potrošnju antimikrobika u periodu od 5 godina. Nakon provedene analize dobili bismo podatke o potrošnji antimikrobika po grupama i u ukupnoj količini u Općoj kantonalnoj bolnici.*

Sve dobijene podatke učesnici u projektu obradili bi statistički i procijenili bismo godišnja povećanja i incidencu ovakvih mikroorganizama, te povezanost incidence mikroorganizama sa potrošnjom antimikrobika u bolničkim uslovima.

Na osnovu statističke obrade napravili bismo plan rada u prospektivnom dijelu studije (vrste mikroorganizama, osjetljivost mikroorganizama na standardne antimikrobike i procjena rezultata na osnovu dobijenih podataka od Svjetske zdravstvene organizacije).

II faza:

U drugoj fazi istraživanja pratili bismo pojavu rezistentnih sojeva mikroorganizama i racionalnom terapijom antimikrobicima pokušali bismo da smanjimo pojavu ovakvih mikroorganizama.

U drugoj fazi (prospektivna u trajanju od 24 mjeseca) formirali bismo komisiju unutar bolnice koja bi se bavila isključivo nozokomijalnim (bolničkim) infekcijama i bila bi zadužena za redovno izvještavanje o pojavi ovih mikroorganizama na odjeljenjima (svaki liječnik u bolnici morao bi biti obaviješten o pojavi rezistentnih mikroorganizama) i o primjeni rezervnih antimikrobika, te da provede analizu uzroka pojave ovakvih mikroorganizama (npr. higijenski uslovi u bolnici i u operativnim salama, skrining osoblja i neodgovarajuća primjena dezinfekcionih sredstava i antimikrobika, izolacija bolesnika sa ovakvim infekcijama) i uz određeni oblik edukacije (jednom u dva mjeseca organizirala bi se predavanja o rezistentnim mikroorganizmima i pravilnoj primjeni antimikrobika) da utječe na zaposlene u bolnici da bi bolje razumjeli ozbiljnost problema.

Svi dobijeni podaci o rezistentnim sojevima mikroorganizama bili bi upisivani u posebne formulare koji bi kasnije bili obrađivani statistički i na osnovu ovoga mogli bismo na kraju istraživanja da uporedimo dobijene rezultate u prospektivnom dijelu istraživanja sa rezultatima dobijenim u retrospektivnom dijelu istraživanja. Ovakvim analizama procijenili bismo efikasnost provedenih mjera i pokušali bismo da napravimo jedan standard koji bi bio dobra osnova za racionalnu primjenu antimikrobika i sprječavanje pojave rezistentnih sojeva mikroorganizama.

Provođenje ovakvog tipa studije je neophodno da bismo spriječili razvoj ovakvih infekcija i da bi se racionalizirala primjena antimikrobika.

Oprema

Neophodna oprema za provođenje istraživanja nalazi se u Mikrobiološkoj laboratoriji Opće kantonalne bolnice i osoblje koje rukuje opremom je adekvatno educirano za provođenje istraživanja.

U prospektivnom dijelu istraživanja koristit ćemo WHONET software koji je odobrila Svjetska zdravstvena organizacija u provođenju istraživanja ovakvog tipa.

Datum početka istraživanja: 01. 11. 2001.

Datum završetka istraživanja:

Faza I – Retrospektivna faza do 01. 03. 2002.

Faza II – Prospektivna faza 01. 11. 2003.

Rezultati retrospektivne faze: Izvještaj 01. 05. 2002.

Rezultati prospektivne faze: Završni izvještaj 01. 03. 2004. godine.

Monitor istraživanja: Bolnička komisija za lijekove Opće kantonalne bolnice u Sarajevu.

ANU BiH АНУ БиХ

Hantavirus u Bosni i Hercegovini – mikrobiološki, epidemiološki i klinički aspekti

Mirsada Hukić[1)]

Saradnici u projektu

Mikrobiolozi: Ake Lundkvist[2)], Paul Heilman[3)], Nijaz Tihić[1)], Zineta Delibegović[1)], Mahmud Nurkić[1)], Aida Nurikić[1)]; *Internisti:* Džemal Rezaković[4)], Denijal Tulumović[5)], Enisa Mešić[5)], Hajrija Selesković[5)], Muradif Šarić[6)]; *Infektolozi:* Sana Šabović[7)], Ekrem Jusufović[7)], Lejla Čalkić[8)]; *Neurolog:* Osman Sinanović[9)]; *Okulisti:* Kemija Slanjankić[10)], Dževdet Sarajlić[10)], *Patolozi:* Elmir Čičkušić[11)], Zinaida Karasalihović[11)]; *Transfuziolog:* Slavica Mott-Divković[12)]; *Biohemičari:* Mirjana Uzejrbegović[13)], Lejla Begić[14)]; Senada Sarihodžić[15)]; *Epidemiolozi:* Zlatko Puvačić[16)], Fahrudin Čamdžić[6)], Sead Karakaš[17)], Amer Čustović[1)], *Biolog:* Muhamed Ćurić[18)].

1) Bosna i Hercegovina: Univerzitetski klinički centar Tuzla, Zavod za mikrobiologiju
2) Švedska: Swedish institute for Infectious Disease Control, Stockholm
3) Belgija: Research Laboratory for vector-borne diseases, National reference centre for Hantavirus infections, Queen Astred military Hospital/MBTC, Brussels
4) Akademija nauka i umjetnosti Bosne i Hercegovine
5) Bosna i Hercegovina: Univerzitetski klinički centar Tuzla, Interna klinika
6) Dom zdravlja Kladanj
7) Bosna i Hercegovina: Univerzitetski klinički centar Tuzla, Klinika za zarazne bolesti
8) Kantonalna bolnica Zenica
9) Bosna i Hercegovina: Univerzitetski klinički centar Tuzla, Neurološka klinika
10) Bosna i Hercegovina: Univerzitetski klinički centar Tuzla, Klinika za očne bolesti
11) Bosna i Hercegovina: Univerzitetski klinički centar Tuzla, Zavod za patologiju
12) Bosna i Hercegovina: Univerzitetski klinički centar Tuzla, Zavod za transfuziologiju
13) Bosna i Hercegovina: Univerzitetski klinički centar Tuzla, Zavod za biohemiju
14) Katedra za biohemiju Medicinskog fakulteta u Tuzli
15) Bosna i Hercegovina: Univerzitetski klinički centar Tuzla, Zavod za radiologiju
16) Institut za epidemiologiju Medicinskog fakulteta u Sarajevu
17) Kantonalni zavod za javno zdravstvo Travnik
18) Dom zdravlja Travnik

Uvod

Hantavirus (HTV) je zaseban rod u porodici Bunyaviridae. Do danas je izolirano i okarakterisano 30 različitih HTV vrsta, od kojih samo 13 ima patogeno značenje za čovjeka[1]. Svaki hantavirus primarno je vezan za jednu vrstu divljih glodara, uzrokujući kod njih perzistentnu, asimptomatsku, doživotnu infekciju. Životinje luče virus mjesecima preko urina, stolice i salivom. Čovjek se zarazi inhalacijom virusa i preko kontaminirane hrane. Klinički najvažnije vrste su: Sin Nombre (SNV) u Americi, Hantaan (HTN) i Seoul (SEO) u Aziji, te Puumala (PUU) i Dobrava (DOB) u Evropi[2]. Hantavirusi su uzročnici akutne virusne bolesti koja se karakteriše pojavom opštih simptoma i znakova, kolapsom, šokom i hemoragičnom dijatezom. HTN, PUU i DOB imaju kao glavni ciljni organ bubrege, a SNV i SNV-srodni agensi oštećuju prije svega pluća. U zavisnosti od mjesta djelovanja HTV-infekcija se može manifestovati kao akutna renalna insuficijencija, ili akutni plućni edem. HTN-infekcije, a posebno DOB infekcije mogu biti uzrok teških, pa i fatalnih krvarenja. Ključni faktor u patognezi bolesti je kapilarna propustljivost, koja dovodi do intersticijalnog edema (bubrega, pluća), akumulacije tekućine (pleura, peritoneum), hemokoncentracije i eventualno do multiplog oštećenja organa. Mehanizmi koji dovode do oštećenja endotela i kapilarne propustljivosti su nejasni, a pretpostavlja se da su uslovljeni reakcijom raznih medijatora inflamacije (NO, citokini i hemokini), ili HTV-indukovanom apoptozom[1,2,3].

Bosna i Hercegovina je od 1952. god., kada je opisan prvi slučaj hemoragične groznice sa bubrežnim sindromom (HFRS), poznata kao endemsko područje za ovu bolest[4]. Pored brojnih sporadičnih slučajeva obolijevanja na ovom području opisano je više velikih epidemija HFRS i to: 1967. [5,6], 1989. [7] i 1995. [8] godine. Epidemija HFRS u tuzlanskoj regiji u 1995. godini je prva epidemija u kojoj su dokazana dva tipa HTV: PUU sa blagim kliničkim tokom i DOB sa teškom kliničkom slikom[9,10,11]. Kliničke analize, serološka ispitivanja i izolacija virusa, jasno su pokazali da na ovom području kruže najmanje dva (PUU i DOB), a prema nekima četiri različita hantavirusa (PUU, DOB, HTN i SEO)[12,13,14,15]

Problem

Područje Bosne i Hercegovine je ostalo neispitano u pogledu zastupljenosti različitih tipova hantavirusa, njihovih genetskih osobitosti, njihovih prirodnih rezervoara i geografske distribucije. Za HFRS vezane su i druge nepoznanice, kao što su: patogenetski mehanizmi nastanka bolesti, karakteristike kliničke slike u odnosu na uzročnike, funkcionalni i morfološki poremećaji na bubrezima i drugim organima nakon prebolovane HTV-infekcije.

Ciljevi ove studije

a. Istražiti prisustvo hantavirusa u različitim regijama Federacije BiH (Tuzlanski kanton; Zenički kanton i Srednjebosanski kanton);
b. Procijeniti zastupljenost glodara: Clethrionimus glareolus, Apodemus flavicolis, Apodemus sylvaticus, Microtus arvalis, Microtus agrestis, Sorex species i Mus species, u regionu;
c. Izvršiti detekciju i procjenu seroprevalence na hantaviruse u različitih vrsta glodara;
d. Procijeniti prisustvo i genetičku heterolognost hantavirusa kod Cl. glareolus. i A. flavicolis;
e. Napraviti kartu ispitivane regije sa: naseljima, klimatskim karakteristikama, karakteristikama tla, osobinama vegetacije, distribucijom ispitivanih glodara i distribucijom hantavirusa;
f. Ispitati kliničke karakteristike infekcija uzrokovanih sa PUU i DOB;
g. Ispitati funkcionalne i morfološke promjene na bubrezima u akutnoj fazi HFRS;
h. Prospektivno pratiti pojavu funkcionalnih i morfoloških poremećaja na bubrezima nakon prebolovane HFRS;
i. Ispitati neke od patogenetskih mehanizama nastanka oboljenja;
j. Istražiti prisustvo sekvela nakon preboljele HFRS.

Materijal i metode rada

Ispitivanje će biti sprovedeno u tri kantona Federacije BiH: Tuzlanskom kantonu, Zeničko-dobojskom kantonu i Srednjebosanskom kantonu, na već definisanim endemskim žarištima HFRS. Izvršiće se epidemiološko izviđanje regiona. U mapu će se unijeti geografske karakteristike područja: klima, nadmorska visina, sastav tla, rijeke i potoci, karakteristike vegetacije (polje, šuma, vrste šume itd) i urbana područja.

Ispitivanjem će se obuhvatiti

a. 300 divljih glodara vrsta: Clethrionimus glareolus, Apodemus flavicolis, Apodemus sylvaticus, Microtus arvalis, Microtusagrestis, Sorex species, Mus species.
b. Osobe koje obole sa znacima i simptomima hemoragične groznice u naredne 3 godine.
c. 100 osoba koje su prebolovale HFRS prije 5-7 godina, a u kojih je bolest potvrđena serološkim testovima i određena vrsta uzročnika.

U svakom od kantona odabrat će se po 5 mjesta hvatanja glodara (sa oko 75 lokacija), u različitim biotopima. Glodari će se hvatati zamkama (Tomahawk ili Sherman) postavljenim u linije. Zamke će se držati 3 dana na mjestu

ANU BiH АНУ БиХ

lova i pregledati 2x dnevno. Identifikacija životinja će se vršiti morfološkim pregledom i genetskim analizama. Clethrionimus glareolus, Apodemus flavicolis, Apodemus sylvaticus, Microtus arvalis, Microtus agrestis, Sorex species i Mus species će se uzeti u dalji postupak.

Postupak obrade životinja

Nakon duboke anestezije sa eterom, životinjama će se uzimati krv iz orbitalnog plexusa. Izdvojeni serum će se do daljnje obrade držati na -20°C. Serum životinja će se ispitati testovima indirektne imunoflorescencije i ELISA na prisustvo antitijela klasa IgM i IgG na viruse: Hantaan (HTN), Dobrava (DOB), Puumala (PUU) i Seoul (SEO).

Nakon žrtvovanja životinje ekstenzijom vratne kičme uzeće se organi: pluća i bubrezi. Uzorci tkiva će se do dalje obrade držati na -70°C. Iz bubrežnog tkiva seropozitivnih glodara izvršiće se ekstrakcija RNK, koja će poslužiti za izvođenje RT-PCR uz upotrebu genus specifičnih primera za segment M.

Nakon toga će se izvesti PCR sa species specifičnim primerima. Amplificirani fragmenti biće sekvencionirani na ABI 310 Genetic Analyser. Upotrebom PHYLIP ili PAUP softverskog programa izvršiće se analiza homologije nukleotidnih sekvenci ispitivanih fragmenata i utvrditi filogenetska povezanost.

Obrada oboljelih od HFRS i osoba koje su preboljele HFRS

Klinička i laboratorijska obrada oboljelih od HFRS i osoba koje su preboljele HFRS biće usmjerena na otkrivanje morfoloških i funkcionalnih oštećenja svih organa, kao i na razjašnjavanje nekih patogenetskih mehanizama nastanka bolesti. Obrada će biti provođena prema utvrđenim protokolima za prospektivno i retrospektivno istraživanje: protokol I (za akutnu fazu bolesti), protokol II (za rekonvalescentnu fazu bolesti) i protokol III (za osobe koje su preboljele HFRS prije 5-7 godina). Svi predviđeni parametri biće mjereni i izražavani u standardnim mjernim jedinicama. Dobijeni podaci biće statistički obrađeni i evaluirani.

Protokol I.

a. Svim oboljelim uzeće se detaljna anamneza i uraditi fizikalni pregled. Za vrijeme trajanja bolesti pratit će se 24 časovna diureza, krvni tlak i puls. Svim ispitanicima će se uraditi virusološke, imunološke, biohemijske, a prema mogućnostima i patohistološke i imonohistohemijske pretrage. Etiološka dijagnoza postaviće se ili izolacijom virusa iz krvi i urina ili serološkim testovima za dokazivanje specifičnih imunoglobulina za HTV. Detekcija virusa u krvi i urinu vršiće se već navedenom RT-PCR metodom. Metodama indirektne imunoflorescencije i ELISA određivaće

se titrovi specifičnih antitijela, klasa IgM i IgG, na Hantaviruse: HTN, DOB, PUU i SEO. Takođe će se odrediti ukupni imunoglobulini, komplement, IL-1β, IL-6, IL-10, IL-12, TNF-a i IFN-γ. Radi eventualne dijalize uradiće se markeri virus hepatitisa B i virus hepatitisa C.

b. Biohemijske pretrage iz krvi i urina uključuju: SE, KKS, broj trombocita, retrakciju koaguluma, vrijeme krvarenja, protrombinsko vrijeme, aktivirano parcijalno tromboplastinsko vrijeme, trombinsko vrijeme, nivo fibrinogena, fibrinolizu, pojedinačne faktore koagulacije, protein C i protein S, glikemiju, acidobazni status, osmolalnost krvi i urina, urea, kreatinin, mokraćnu kiselinu, ukupne proteine, albumine, globuline, kalijum, natrijum, kalcijum, magnezijum, fosfor, bilirubin, transaminaze, urin, kvantitativnu (biuret) i kvalitativnu proteinurija (elektroforeza proteina u urinu), urea i kreatinin u urinu, elektrolite u urinu.

c. Morfološka i imunohistohemijska ispitivanja bubrega će se uraditi u onih bolesnika sa lezijom renalne funkcije, ukoliko nema kontraindikacija. Za analizu morfoloških promjena koristiće se tkivni uzorci fiksirani u formalinu i ukalupljeni u parafin. Histološki rezovi će se bojiti: hematoksilin eozinom, PAS metodom, Masson trichrom bojenjem, impregnacijom sa srebrom i Van Gieson-Weighert metodom. Za prikazivanje imunih depozita IgA, IgG, IgM, Clq i C3c koristiće se metoda direktne imunofluorescencije na tkivu smrznutom tečnim azotom. Fenotipizacija limfocita u intersticijalnom infiltratu vršila bi se metodom trostepene imunoperoksidaze sa streptavidinom uz upotrebu primarnih antitijela CD3, CD4, CD8, CD20, te upotrebom granzima i perforina za vizualiziranje aktiviranih citotoksičnih T limfocita. Istom metodom, uz upotrebu monoklonalnih antitijela na G1 i G2 glikoproteine virusne ovojnice, dokazivalo bi se prisustvo virusa u citoplazmi tubularnih epitelnih ćelija. Ekspresija adhezivnih endotelnih molekula ICAM-1 i VCAM određivala bi se imunohistohemijski na smrznutim rezovima metodom trostepene iminoperoksidaze.

d. Praćenje morfoloških i funkcionalnih promjena na organima vršiće se metodama: ultrazvučni pregled bubrega, jetre, žučne kese i slezene (sa fotografijama), EEG, vizuelni i auditivni evocirani potencijali, EMNG, pregled očnog dna metodom trozrncalne lupe, ispitivanje centralne vidne oštrine, vidnog polja vizusa i kolornog vida, kompjuterizovana tomografija mozga, RTG pluća i spirometrija.

Protokol II.

Prospektivno praćenje funkcionalnih i morfoloških poremećaja na bubrezima nakon prebolovane HFRS vršiće se u toku 3 godine. U tom periodu uradiće se 6 kontrolnih pregleda, i to: nakon 30 dana, 3 mjeseca, 6 mjeseci, godinu dana, dvije godine, tri godine.

Kontrolni pregledi će se sastojati od pažljivo uzete anamneze, fizikalnog pregleda, izmjerene 24 časovne diureze, krvnog tlaka, pulsa i nalaza: SE, KKS, trombociti, glikemija, acidobazni status, osmolalnost krvi i urina, urea, kreatinin, mokraćna kiselina, ukupni proteini, albumini, globulini, kalijum, natrijum, kalcijum, magnezijum, fosfor, bilirubini, transaminaze, urin, kvantitativna (biuret) i kvalitativna proteinurija (elektroforeza proteina u urinu), urinokultura, urea i kreatinin u urinu, elektroliti u urinu, ultrazvučni pregled, glomerularna filtracija (EDTA) i efektivni protok plazme kroz bubreg (klirens I-hipurata), renin, aldosteron, određivanja titra antitijela za HTV. Ponovno morfološko ispitivanje bubrega uradiće se u bolesnika sa značajnom lezijom bubrežne funkcije, bez obzira na to koliko je vremena proteklo od akutne faze bolesti.

Protokol III.

Retrospektivna analiza bubrežne funkcije u osoba koje su prebolovale HFRS prije 5 godina baziraće se na: pažljivo uzetoj anamnezi, fizikalnom pregledu sa posebnim osvrtom na uropoetski sistem, izmjerenoj 24 časovnoj diurezi, krvnom tlaku, ultrazvučnom pregledu bubrega sa fotografijom; biohemijskim pretragama iz krvi i urina kao za kontrolni pregled, radiološkim pretragama u onim slučajevima gdje je to potrebno za razjašnjavanje patološkog stanja; glomerularnoj filtraciji (klirens EDTA) i efektivnom renalnom protoku plazme (klirens I-hipurata); morfološkom ispitivanju bubrega u slučajevima prisustva značajne lezije renalne funkcije (ne može se predvidjeti tačan broj takvih bolesnika, pretpostavljamo da ih neće biti više od 20-30); određivanjem titra antitijela za HTV.

Trajanje i dinamika istraživanja

Trajanje projekta je 36 mjeseci (od 01. 11. 2001. god. do 01. 11. 2004. god.).

U prvoj godini obradiće se sve osobe koje su prebolovale HFRS prije 5-7 godina po predviđenoj proceduri. Svi oboljeli u toj godini biće obuhvaćeni ispitivanjem. Uhvatiće se i obraditi 100 glodara. Izvršiće se analiza i evaluacija rezultata dobijenih u prvoj godini ispitivanja.

Svi oboljeli u drugoj godini biće obuhvaćeni ispitivanjem i vršiće se kontrolni pregledi oboljelih u prvoj godini. Uhvatiće se i obraditi 100 glodara. Izvršiće se analiza i evaluacija rezultata dobijenih u prvoj i drugoj godini ispitivanja.

Svi oboljeli u trećoj godini biće obuhvaćeni ispitivanjem i vršiće se kontrolni pregledi oboljelih u prvoj i drugoj godini. Uhvatiće se i obraditi 100 glodara. Izvršiće se analiza i evaluacija svih dobijenih rezultata.

Očekivani rezultati i njihov značaj

Predviđenim istraživanjima će se jasno identifikovati vrste HTV koje kruže na području tri kantona Federacije BiH: Tuzlanskom kantonu, Zeničko-dobojskom kantonu i Srednjebosanskom kantonu.

Definisat će se prirodni rezervoari pojedinih vrsta HTV i odrediti njihova geografska distribucija.

Utvrdit će se dominantni putevi prenošenja virusa, a time i postaviti nove mjere prevencije, koje će imati za cilj smanjenje rizika zaražavanja ljudi u endemskim područjima HFRS.

Utvrdit će se uloga imunoloških mehanizama u nastanku oštećenja bubrega.

Jasno će se definisati klinička slika DOB-infekcije i PUU-infekcije.

Očekuju se funkcionalni i morfološki poremećaji na bubrezima nakon prebolovane DOB-infekcije, a ne i nakon prebolovane PUU-infekcije.

Rezultati predviđenih istraživanja olakšaće prepoznavanje i dijagnostiku HFRS.

Utvrđivanje zona sa visokim rizikom od infekcije sa HTV ima veliki značaj u prevenciji infekcije, kao i vojnomedicinski značaj u planiranju vojnih vježbi i odbrane zemlje.

АНУ БиХ АНУ БиХ

Literatura

1. **Specter S., Hodinka L.R., Young A.S.:** *Clinical Virology Manual. 3rd. Ed. Washington, D.C.* ASM Press. 2000.
2. **Clement J., Hukić M., Colson P., Lundkvist A., Niklasson B., Van Ranst M.:** *Hantaviruses: Old and New.* Inf Dis Rev 1999; 1: 57-58.
3. **Suša S.:** *Hemoragična groznica s bubrežnim sindromom.* Savremena administracija, Beograd, 1997.
4. **Simić M., Mirić V.:** *Success of application of peritoneal dialysis in a case of renal insufficiency.* Vojnosant Pregl 1952; 9: 285-290.
5. **Đorđević B.:** *Haemorrhagic fever with renal syndrome in Bosnia (Yugoslavia).* Folia Medica Facultatis Medicinae, Universitatis Saraeviensis, Sarajevo 1968; 3: 9-22.
6. **Rezaković Dž., Vojvodić Z., Ibrahimbegović F.:** *Study of the haemostatic defect and corpuscular element rate in the peripheral blood.* Folia Medica Facultatis Medicinae Universitatis Saraeviensis, Sarajevo 1968; 3: (3): 69-83.

7. **Gligić A., Stojanović R., Obradović M., Hlaća D., Dimković N., Diglišić G., Lukać V., Ler Z., Bogdanović R., Antonijević B., Ropac D., Avsić-Zupanić T., Leduc J.W., Ksiazek T., Yanagihara R., Gajdusek D.C.:** *Hemorrhagic fever with renal syndrome in Yugoslavia: epidemiologic and epizootiologic fetures of a nationalwide outbreak in 1989.* Eur. J. Epidemiol, 1992; 8: 816-825.
8. **Hukić M., Kurt A., Torstensson S., Ludkvist A., Wiger D., Niklasson B.:** *Outbreak of haemorrhagic fever with renal syndrome in north eastern Bosnia.* Lancet 1996; 347: 56-57.
9. **Lundkvist A., Hukić M., Hörling J., Gilljam M., Nichol S., Niklasson B.:** *Puumala and Dobrava virusses cause hemorrhagic fever with renal syndrome in Bosnia-Herzegovina: Evidence of higly cross-neutralizing antibody responses in early patient sera.* J Med Virol 1997; 53: 51-59.
10. **Clement J., Hukić M., Lundkvist A., Niklasson B.:** *Concomitant outbreak of two different Hantaviruses (HTV) in Bosnia: Abstracts.* The fourth International Conference on HFRS and Hantaviruses, March 5-7, 1998, Atlanta, Georgia USA, 105.
11. **Hukić M., Nurkić M., Niklasson B., Lundkvist A., Šabović S., Čamdžić F., Mešić E., Tihić N.:** *Mogućnost i osobitost serološke dijagnostike hemoragične groznice sa renalnim sindromom (HFRS) - hantanvirusna infekcija u sjeveroistočnoj Bosni.* Acta Medica Saliniana 1996; 25: (l-2): 43-48.
12. **Mešić E., Hukić M., Šabović S., Trnačević S., Halilbašić A.** *Renal syndrome in haemorrhagic fever in north eastern Bosnia.* Abstracts. XXXIIIrd Congresses of the European Renal Association, European Dialysis and Transplant Associacion. Amsterdam 1996; 110.
13. **Hukić M., Nurkić M.:** *Some epidemiological characteristics of epidemic of hemorrhagic fever with renal syndrome in north eastern Bosnia in 1995.* Proceedings of the 2nd Congress of Slovenian Microbiologists with International Participation, Portorož 1998: 392.
14. **Hukić M., Šabić S., Mešić E., Nurkić M.:** *Korelacija seološkog tipa hantanvirusa i stepena oštećenja bubrežne funkcije.* Zbornik sažetaka prvog bosansko-hercegovačkog simpozija nefrologa sa međunarodnim učešćem. Sarajevo, Bosna i Hercegovina, 1997: 14.
15. **Hukić M., Nurkić M.:** *Hantanvirus-infekcije, leptospiroze i tularemija, bolesti prirodnog žarišta među vojnicima u toku rata na području sjeveroistočne Bosne.* Zbornik sažetaka I kongres infektologa, epidemiologa i mikrobiologa BiH sa međunarodnim učešćem, Sarajevo 1997: 133.

Djelovanje zearalenona na timus štakora: svjetlosno-mikroskopske i imunohistohemijske promjene

Ivan Selak[1)], Mirsad Dorić [1)]

Uvod

Mikotoksin zearalenon (F-2), produkt je različitih vrsta gljivica roda Fusarija. On je nesteroidni mikotoksin sa estrogen-sličnim djelovanjem, koje je 80-160 puta slabije u poređenju s estrogenom, čija je tumor-promocijska aktivnost dokazana slično estrogen-induciranoj proliferaciji i karcinogenozi u estrogen-zavisnom tkivu humanog endometrija. Izolirane i u tkivu dojke u područjima sa bolesti endemskog povećanja grudi. Osim estrogenog djelovanja pokazuje i anaboličku aktivnost.

Općenito je aktivnost zearalenona posredovana estrogenim receptorima u konačnom ciljnom tkivu, kao i kod estradiola, te je i većina dosadašnjih istraživanja bila usmjerena prema estrogen ovisnim tkivima. Malo je radova koji izvještavaju o efektima zearalenona na limfoidno tkivo. Većina dosadašnjih zapažanja upućuje na poremećaje parametara periferne krvi raznih, uglavnom životinjskih vrsta. Ove promjene kod svinja koincidiraju sa porastom albuminskog nivoa, padom nivoa alfa-globulina, te opštim porastom u albuminsko/globulinskom odnosu, saobrazno nivou kontaminacije.

U toku eksperimentalnog trovanja štakora zearalenonom u našem materijalu, utvrđene su promjene na slezini u obliku hiperemije, ekstravazacije eritrocita, umnožavanje vezivnog tkiva i nestajanje limfocita, što kod visokih doza protrahiranog djelovanja konačno rezultira uznapredovalom fibrozom i nestankom bijele puple. Efekti ovakvog djelovanja upućuju na mogućnost djelovanja i na druge limfoidne organe što bi rezultiralo imunosupresijom.

Prema podacima iz 1979. godine zearalenon kod glodara uzrokuje pad imunološkog odgovora, uključujući i alergijski. Isti izvori ukazuju na povećanje težine timusa, što se tumači endokrinim efektima.

Timus je primarni limfoidni organ odgovoran za celularni imunitet, u kome sazrijevaju T limfociti i odatle odlaze na periferiju (krv, limfoidni

[1)] Institut za patologiju Medicinskog fakulteta u Sarajevu

organi, limfa) i postaju subpopulacija cirkulirajućih induktorskih ili citotoksično/supresorskih T stanica. Induktorski T limfociti potrebni su da bi B-limfociti i drugi T-limfociti ili makrofazi mogli u potpunosti reagirati na antigen. Supresorski T-limfociti suprimiraju reakciju B-limfocita i drugih T-limfocita na antigen. Citotoksični T-limfociti mogu ubiti druge (najčešće tumorske) stanice.(5)

Ovim eksperimentom se žele ispitati efekti pretpostavljene imunosupresije zearalenona na pojedine stanice imunokompetentnog sustava timusa.

Materijal i metode

Za eksperiment ćemo koristiti 44 štakora Wistar pasmine, istog legla, oba spola, spolno zrele, prosječne težine 200gr, (5-10%) dobrog zdravstvenog stanja, (36 tretiranih, 6 kontrolnih i 2 intaktna).

U pokusu će biti korišten toksin zearalenon, visokog stepena čistoće, poznatog (američkog) proizvođača i čije je LD 50 16 gr/kg tjelesne težine za štakore.

U toku eksperimenta koji će trajati 30 dana, svakodnevno će se vršiti aplikacija miko-toksina u otopini suncokretovog ulja, u dozama 0,5 mg/kg, 2 mg/kg i 4 mg/kg tjelesne težine, ili pak samo suncokretovo ulje (kontrolna skupina), putem gastrične sonde u tačno određeno vrijeme (24 satni ciklus).

Svaka od ove tri grupe biće podijeljena u tri podgrupe označene rimskim brojevima a koje će predstavljati vrijeme aplikacije toksina (I=10 dana, II=20 dana, III= 30 dana).

Svakih deset dana žrtvovat će se četrnaest štakora (12 tretiranih i 2 kontrolna - po 7 mužijaka i ženki). Žrtvovanje će se vršiti u eterskoj narkozi. Nakon seciranja uzet će se uzorci tkiva timusa.

Uzorci za svjetlosnu mikroskopiju primarno će biti obrađeni standardnom tehnologijom i bojeni sa hematoksilin-eozinom (H. E.). Mikroskopski pregled bit će fokusiran na sljedeće aspekte:

Arhitekturalnost. Malim uvećanjem bit će observirana arhitekturalnost, koja načelno može biti režnjevita (lobulirana) ili trakasta (girlande).

Prisustvo limfoidnih stanica će se semikvantitativno graduirati kao odsutne ili prisutne u niskoj ili visokoj gustoći. Naročita pažnja će biti usmjerena na identifikaciju plazma-stanica.

Epitelni parenhim, diferenciran na kortikalni i medularni. Sa velikim povećanjem pratit će se diferencijacija normalnih stanica timusa i eventualno prisustvo novoformiranih Hassall-ovih tjelašaca, te moguća keratinizacija ili mikrocistična degeneracija sa akumulacijom staničnog debrisa, infiltracja limfocitima, pjenušavim makrofagima ili eozinofilima. Eventualna "rosettlike"

organizacija epitela, njegova perivaskularna distribucija ili pak hijalinizacija krvnih žila bit će zabilježeni.

Limfociti će biti fenotipizirani upotrebom anti-T staničnih reagenata: (CD5, pan-T marker), (CD8, supresor/citotoksični fenotip), (CD4, pomoćničko/induktorski fenotip), (CDl, prisutan u limfocitima timusnog korteksa, Langerhansovim stanicama i interdigitirajućim retikularnim stanicama).(6)

Upotreba drugih markera kao i specijalnih histohemijskih metoda zavisiće od rezultata svjetlosno-mikroskopske i imunohistohemijeske obrade.

Očekivani rezultati

Mikotoksin zearalenon nalazi se u širokom spektru životnih namirnica u različitim koncentracijama, koje obično ne izazivaju klinički manifestne simptome (računa se da je približno 20% hrane kontaminirano) (1) te bi se već manje ili više dobro poznatim efektima na estrogen-ovisna tkiva mogli pridodati efekti imunosupresije. Dokažu li se kvantitativne ili kvalitativne promjene u nekoj subpopulaciji T limfocita indirektno će se dovesti u vezu prisustvo estrogenih receptora, a time eventualno i pokrenuti cijeli niz pitanja vezanih za djelovanje estrogena na imunološki sistem organizma.

Efekti imunosupresije hipotetski mogli bi biti konsekvenca:

1) Porasta broja supresorskih T limfocita,
2) Pada broja induktorskih T limfocita,
3) Rezultat nekog drugog mehanizma koji nije vezan niti za jednu od pobrojanih.

ANU BiH АНУ БиХ

Literatura

1. **Abrmson D., Milles J. T. Marpuardt R. R. et al:** *Mycotoxins in fungal contaminated samples of animal feed from western Canada, 1982-1994.* CanJ. Vet, Res. 1997, Jan., 61 (1) 49-52.
2. **Atkinson HA, Miller K:** *Inhibitory effect ofdeoxynivalenol, 3 acetyldeoxynivalenol and zearalenone on induction of rat and human lymphocyte proliferation.* Toxicol. Lett 1984; Nov; 23 (2): 215-21.
3. **Babić Lj., Dorić M., Ožegović L. et al:** *Djelovanje zearalenona na štitnu žlijezdu štakora, 1999.* Acta Veterinaria, rad u štampi.
4. **Babić Lj., Ožegović L., Dorić M. et al:** *Djelovanje mikotoksina zearalenona na slezenu štakora, 1999.* Acta Veterinaria, rad u štampi.
5. **Dekaris D.:** *Temeljna alergologija.* Zagreb, Školska knjiga, 1988, 6-13.

6. **Henk-Jan S, Willy J. A. K, Roel B.:** *The thymus in acquired immunodeficiency syndrome.* Amer Journ of Pathol., 1989, June, 134 (6) 1329-38.
7. **Huković S.:** *Neuromišićna transmisija i uticaj mikotoksina.* Simpozij o mikotoksinima, Zbronik radova, Sarajevo 1982; 101-108.
8. **Kimbrough T. D., Weekley LB.:** *Effects of trichothecene mycotoxins on the ex vivo vascular smooth muscule responses to beta-adrenergic agonists.* Toxicol Lett 1994 Feb 1; 70 (2): 165-70.
9. **Kuiper-Goodman T., Scott PM., Watanabe H.:** *Risk assessment of the mycotoxin zearalenone.* Regul Toxicol Pharmacol 1987, Sep, 7 (3): 253-306.
10. **Long G. G., Diekman, M. A.:** *Characterization of effects of zearalenone in swine during early pregnancy.* Am. J. Vet. Res., 1986; 47: 184-187.
11. **Lončarević A., Jovanović MJ., Šamanc H. et all.:** *Uticaj zearalenon (F-2) mikotoksina na proteinemiju, frakcije bjelančevina, aminokiselinski azot i koloido-osmotski pritisak bjelančevina krvnog seruma prasadi.* Simpozij o mikotoksinima, Zbornik radova, Sarajevo 1982; 87-99.
12. **Maaroufi K., Chekir L., Creppy E. E., et all:** *Zearalenone induces modifications of haematological and biochemical parameters in rats.* Toxicon 1996 may, 34 (5)535-40.
13. **S. Ožegović L, Pepeljnjak S:** *Mikotoksikoze.* Zagreb: Školska knjiga, 1995; 115-124.
14. **Rotter B. A. Jhompson B. K., Lessard M.:** *Influence of low-level exposure to Fusarium mycotoxins on selected imunologocal and hematological parametersin young swine.* Fundam Appl Toxicol 1994; Vol 23, ISS 1; 117-124.
15. **Ruh M. F., Bi Y., Cox L., et al:** *Effect of environmental estrogens on IL-1 beta promoter activity in a macrophage ćeli line.* Endocrine 1998 Oct; 9 (2) 207-11.
16. **Tomaszewski J., Miturski R., Semczuk et al.:** *Tissue zeralenone concetration in normal, hyperplastic and neoplastic human endometrium.* Ginekologia Polska, May 1998, 69 (5) 36S6.
17. **Ueno Y.:** *The toxicology of mycotoxins.* CRC Critical Reviews in Toxicology. 1988, 14: 99-113.
18. **Zhang Y,. Zhu S,. Tong W.:** *lsolation of fusarium and extration of toxin from buckwheat grown in an area with "endemic breast enlargement" disease.* Chinese Journal of preventive Medicine, sep, 1995; 29 (5) 273-5.

Korelacija između nivoa prognostičkih markera B stadija (po Dukesovoj klasifikaciji) karcinoma kolona i pojave mikrometastaza u perikoličnim limfnim čvorovima

Ivan Selak[1)], Svjetlana Radović [1)]

Uvod

Karcinomi debelog crijeva predstavljaju 95% svih primarnih kolorektalnih malignoma i drugi su najčešći uzročnik smrti od malignoma. U procjeni biološkog potencijala ove vrste tumora, isključivo su se do danas koristili opće prihvaćeni kliničko-patološki parametri. Klinički parametri obuhvataju procjenu: veličine primarnog netretiranog tumora, prisustva metastaza u regionalnim limfnim čvorovima i udaljenim organima. Patološkim parametrima obuhvaćeni su: histološki tip i histološki gradus tumora, mitotski indeks, prisustvo angiolimfatične invazije, način invadiranja okolnog zdravog tkiva i limfocitarni odgovor domaćina.

Potencijalno subjektivna priroda patohistoloških observacija, kao prognostičkog indikatora tumorskog ponašanja, zahtijeva traganje za objektivnijim prognostičkim markerima. Premda klasični prognostički činioci pokazuju dobar stepen korelacije sa prognozom bolesti, u posljednje vrijeme ukazuje se potreba za određivanjem novijih prognostičkih faktora, na osnovu kojih je moguće odabirati bolesnike za dodatne vidove terapije. Novi prognostički markeri su pokazatelji: diobenog potencijala stanica, obima apoptoze, promjena na supresorskim genima i onkogenima, angiogeneze, otpornosti stanica na djelovanje farmaka, prisustva mikrometastaza u regionalnim limfnim čvorovima i koštanoj srži. Studije ovoga tipa, koje su najdetaljnije urađene kod karcinoma dojke (1, 2) i koje su pokazale visok stepen korelacije između ispitivanih prognostičkih faktora i daljeg ponašanja tumora, mogu da posluže kao prototip za izučavanje karcinoma debelog crijeva. U prognozi karcinoma dojke, pored hormonalnih receptora (estrogena i progesterona) i čitave palete antitijela (13 antitijela) procjenjuje se i prisusutvo mikrometastaza, kako u limfnim čvorovima, tako i u koštanoj srži (3).

[1)] Medicinski fakultet Univerziteta u Sarajevu, Institut za patologiju

Ispitivanja novih prognostičkih faktora u karcinomima debelog crijeva, omogućavaju bolje upoznavanje biološke prirode lezije, čime se otvaraju i nove mogućnosti njegovog liječenja. Značenje nastanka okultnih mikrometastaza u regionalnim limfnim čvorovima za sada je uglavnom poznat samo za karcinome dojke, gdje je pokazano postojanje statistički signifikantne korelacije između njihove pojave i ponovnog javljanja karcinoma (4, 5, 6). Slične studije su rađene u malim serijama kod melanoma (7), kod karcinoma prostate (8) i kolona (9), ali dobijeni rezultati su veoma oprečni.

Cilj istraživanja je da se imunohistohemijskom metodom, koja identifikujući stanične proteine kao indirektne pokazatelje promjena na nivou gena, kao i one koji su pokazatelji diobenog potencijala stanica, odredi potentnost karcinoma kolona u B stadiju (po Dukesovoj klasifikaciji) za davanje mikrometastaza u perikolične limfne čvorove.

Materijal i metode

Predviđeno je da se makroskopski, a potom i mikroskopski pregleda 100 resektata kolona, načinjenih zbog postojanja karcinoma koji se širi kroz zid crijeva i dalje u perikolično masno tkivo, ali koji nije dao metastaze u perikolične limfne čvorove. To su karcinomi kolona u B stadiju po Dukesovoj, odnosno u B1 i B2 stadiju po Astor-Collerovoj modifikaciji Dukesove klasifikacije dubine invazije karcinoma. Pri makroskopskom pregledu resektata bit će utvrđen način rasta tumorskog tkiva (egzofitičan, ulcerozni, infiltrativni ili kombinacija nekih od ova tri osnovna oblika). Svjetlosnom mikrokopijom odredit će se histološki oblik karcinoma, način njegovog rasta u odnosu na okolno zdravo tkivo, stepen diferenciranosti tumora, broj mitoza (u 10 vidnih polja velikog uvećanja), stepen upalnog odgovora domaćina. Okultno sistemsko širenje karcinoma nije detektabilno niti pažljivim kliničkim, radiološkim, biohemijskim, niti standardnim patohistološkim pregledom. U masnom tkivu oko kolona, svakom nađenom perikoličnom limfnom čvoru (najmanje ih mora biti 3) bit će izmjeren najduži promjer. Svi tkivni uzorci tumora i limfni čvorovi u cijelosti, nakon fiksacije u puferovanom 10% neutralnom formalinu, bit će uklopljeni u parafin. Tkivni rezovi debljine 3-5 mikrona prvo će se obojiti standardnom hematoksilin-eozin metodom, a potom i imunohistohemijskom metodom za detekciju tkivnih, odnosno staničnih antigena. U tumorskom tkivu će se primjenom različitih antitijela ići na utvrđivanje genetskog statusa tumora (bcl-2, c-myc, p53, protein nm23, p-125, pS2,), kao i diobenog potencijala tumorskih stanica (Ki-67, EGFR). U limfnim čvorovima će se aplikacijom antitijela za detekciju epitelnih stanica (CK 18, CK 19, CK 20, EMA, LIMA, CEA, SEMA) utvrditi eventualno postojanje okultnih mikrometastaza. Upotreba većeg broja antitijela za detekciju

epitelnih stanica je preporučljiva, jer se na ovaj način minimizira mogućnost maskiranja tumorskih stanica među stanicama normalnog limfatičnog tkiva i dobijanja lažno negativnih nalaza. Imunohistohemija je izuzetno senzitivna metoda kojom može da se među hiljadama stanica limfatičnog tkiva otkrije i jedna jedina epitelna stanica, što nije moguće u standardno bojenim tkivnim uzorcima. Antitijela koja će se koristiti za detekciju tumorskih stanica su visoko specifična za epitelije i ne reaguju sa stanicama normalnog limfatičnog tkiva. Ona reaguju sa antigenima stanične površine, kao i sa citostrukturalnim antigenima. Za svako primijenjeno antitijelo bit će urađeni protokoli za evidentiranje imunohistohemijskih osobitosti antigena, koji će se bazirati na rutinski najviše korištenoj i najjednostavnijoj semikvantitativnoj metodi, čija su testiranja pokazala da daje približno jednake rezultatate kao i neke druge metode koje su daleko sofisticiranije. Također će se određivati broj malignih stanica u mikrometastazama.

Svako korišteno antitijelo bit će komparirano sa njegovom pozitivnom kontrolom. Sva antitijela koja će biti korištena u istraživanju su proizvod kuće DAKO (Kopenhagen) i primjenjuju se isključivo na parafinskim preparatima. Za analizu dobijenih rezultata koristit će se matematičko-statističke metode: procenti, K-kvadrat test, aritmetička sredina i standardna devijacija.

Očekivani rezultati

Kod postojanja malignih oboljenja najvažnije pitanje, na koje se još uvijek ne može dati siguran odgovor, je mogućnost i vremenski period u kojem dolazi do ponovnog javljanja, odnosno daljeg širenja bolesti. Dosadašnje dijagnostičke metode nisu u mogućnosti da sa velikom sigurnošću predvide biološko ponašanje malignih tumora, što se posebno odnosi na njihovu ranu fazu, kada su tumori ograničeni na organ, odnosno tkivo iz kojeg potječu i kada nema metastaza u regionalnim limfnim čvorovima i udaljenim organima. Zato se traga i za iznalaženjem markera koji bi bili dodatni i sigurniji predskazatelji budućeg ponašanja malignoma.

Na osnovu dobijenih rezultata bit će utvrđeno da li postoji i kakve je prirode povezanost između genskog i proliferativnog statusa tumora i prisustva mikrometastaza u perikoličnim limfnim čvorovima. Sam značaj pojave okultnih mikrometastaza, koji je ispitivan za mali broj tumora, nije dovoljno poznat. Mada svaka metastatska stanica nema i potencijal da formira metastatsku leziju na mjestu svog zaustavljanja, mišljenje je da su ove stanice prije preteča metastatskih lezija, nego da se radi samo o njihovom tranzitu kroz limfatično tkivo. Utvrđivanjem proliferativnog i/ili genetskog statusa B stadija karcinoma kolona, koji bi bio u statistički značajnoj korelaciji sa

pojavom mikrometastaza, identifikovala bi se populacija pacijenata visokog rizika za ponovno javljanje bolesti, što bi uvjetovalo i dodatne vidove terapije.

Literatura

1. **Neville AM.:** *Breast cancer micrometastases in lymph nodes and bone marrow are prognostically important.* Ann Oncol 1991 ; 2: 13.
2. **Neville AM, Priče KN, Gelber RD, et al.:** *Axillary node micrometastaes and breast cancer.* Lancet 1991; 337: 110.
3. **Schlimok G, Funke I, Bock B, et al.:** *Epithelial tumor cells in bone marrow of patients with colorectal cancer: Immunocytochemical detection, phemotypic characterisation, and prognostic significance.* J Clin Oncol 1990; 8: 831.
4. **Cote RJ, Chaiwun B, Qu J, et al.:** *Prognostic importance of occult lymph node metastases in patients with breast cancer.* Proc Am Assoc Cancer Res 1992; 33: 202.
5. **Cote RJ, Rosen PP, Hakes TB, et al.:** *Monoclonal antibodies detect occult breast carcinoma metastases in bone marrow of patients with early stage disease.* Am J Surg Pathol 1988; 12: 33.
6. **Cote RJ, Rosen PP, Lesser ML, at al.:** *Prediction of early relapse in patients with operable breast cancer by detection of occult bone marrow micrometastases.* J Clin Oncol 1991; 9: 1749.
7. **Cochran AJ, Wen DR, Morton DL.:** *Occult tumor cells in the lymph nodes of patients with pathological stage I malignant melanoma.* Am J Surg Pathol 1988; 12: 612.
8. **Hering F, Rist M, Roth J, et al.:** *Does microinvasion of the capsulke and/or micrometastases in regional lymph nodes influence dissease-free survival after radical prostactectomy?* Br J Urol 1990; 66: 177.
9. **Isenhart C, Greenson JK, Riče R, et al.:** *Cytokeratin and CC49 staining in pericolic lymph nodes of Duke" s B colon cancer patinets.* Am J din Pathol 1992: 98: 346.

ANU BiH БиХ

Istraživanje i edukacija o upravljanju (Menangment) zdravstvenim sistemom u katastrofama

Arif Smajkić[1)]

Ustanove gdje će se obavljati istraživanje:

Zavod za zdravstvenu zaštitu Bosne i Hercegovine
Odjeljenje Medicinskih nauka ANUBiH, Centar za medicinska istraživanja
Novi partneri

1. Problem

Bosna i Hercegovina ima izražen visok stepen izloženosti različitim katastrofama. U prvom redu ratovima, poplavama, zemljotresu a zatim manjim katastrofama i akcidentima radnika u rudnicima, industrijskim postrojenjima, saobraćajnim nesrećama i, na kraju, masovnim zaraznim i nezaraznim oboljenjima.

Identičan problem rizika za katastrofe posjeduju i neke zemlje bivše Jugoslavije, kao što je Hrvatska i Makedonija, a u Evropi još Italija, Austrija, Švicarska, Bugarska i Turska. Različitim katastrofama posebno za izložene zemlje azijskog kontinenta, kao što su Iran, Pakistan, Indonezija i Malezija, koje bi mogle biti zainteresirane za ulogu u rješavanju ovog problema.

1.1. Specifični problemi su:

1. Zakonitost u nastanku katastrofa,
2. Preveniranost katastrofa,
3. Osposobljenost kadra da upravlja zdravstvenim sistemom u katastrofama,
4. Upravljanje sanacijom katastrofa.

Ciljevi istraživanja:

1. Utvrditi stepen korelacije i zakonitosti međusobne ovisnosti evidentnih društvenih i privrednih rizika jedne sredine i obim katastrofe,

[1)] Zavod za zdravstvenu zaštitu BiH

2. Utvrditi moguće preventivne mjere u kontroli ili eliminaciji rizika da se ublaži ili onemogući katastrofa,
3. Osposobiti rukovodni kadar zdravstvenog sistema za upravljanje sistemom i podsistemima u katastrofama,
4. Modelirati dinamiku i cijenu sanacionih programa.

Sadržaj istraživanja:

1. Interakcija, korelacija i naučne zakonitosti u funkcionisanju sistema i podsistema zdravstva u mirnim i vanrednim uvjetima,
2. Normativno tehnička priprema za katastrofe i masovna oboljenja,
3. Masovno zbrinjavanje povrijeđenih, oboljelih i prognanih,
4. Zdravstvene posljedice migracije stanovništva,
5. Upravljanje tehnološko-organizacijskim alternativnim oblicima intervencija u katastrofama,
6. Epidemiološka kontrola u katastrofama,
7. Lijekovi, sanitetski materijal, ishrana i energetici,
8. Upravljanje sanacionim programima i ekonomska analiza koštanja,
9. Ljudska prava na zdravlje i život, sa socijalnom egzistencijom u katastrofama,
10. Evaluacija modela za sanaciju sa ulogom međunarodne zajednice SZO, UN, UNICEF i dr.

2. Hipoteze:

U prikazanom problemu nalazimo međusobnu ovisnost i varijabilnost faktora rizika za nastanak velikog broja katastrofa i posljedica u ljudskim životima, zdravlju i materijalnim gubicima i postavljamo slijedeće hipoteze:

I Osnovna hipoteza

Utvrđivanje korelacije i zakonitosti između riziko faktora i katastrofa OMOGUĆUJE:

- Pripremljenost zdravstvenog sistema za odgovarajuću efikasnost u katastrofama,
- Edukaciju i osposobljavanje kadra za upravljanje,
- Pripremu simulacije modela za djelovanje i preveniranje katastrofa,
- Efikasnu sanaciju katastrofa.

II Nulta hipoteza

Utvrđivanje korelacije riziko faktora i zakonitosti u uslovima katastrofa NE OMOGUĆUJE:

- Pripremljenost zdravstvenog sistema za odgovarajuću efikasnost u katastrofama,
- Edukaciju i osposobljavanje kadra za upravljanje,
- Pripremu simulacije modela za djelovanje i preveniranje katastrofa,
- Efikasnu sanaciju katastrofa,

3. Predmet i sadržaj istraživanja

U radu ćemo istraživati prirodne, društvene, radne i prometne sisteme sa njihovim podsistemima i rizicima koji su povod ljudskim i prirodnim katastrofama u našoj sredini.

3.1. Subjekt istraživanja

To će prvenstveno biti ljudi, njihovo ponašanje i upravljanje životnim aktivnostima.

3.2. Objekt istraživanja

U užem smislu objekat istraživanja će biti sva prirodna i stečena bogatstva društva, arhivska građa i dokumenti sa raspoloživim podacima u toku i poslije poslije katastrofe.

4. Tretmani

Analiza sistema, intervjui, anketa i cenzusi, edukacija.

5. Okolnosti

Studija će imati retrospektivno prospektivni karakter sa objektivnom procjenom uzročnih rizika i posljedica načina nastanka i toka trajanja rizika katastrofe sa procjenom ishoda.

6. Mjerenja

Mjerenja svih obuhvaćenih varijabli u istraživanju bit će obavljena objektivnim odgovarajućim statističkim metodom, obrađena i izražena apsolutnim i relativnim vrijednostima.

ANU BiH АНУ

7. Trajanje i dinamika istraživanja

Istraživanje i sertifikatna edukacija će biti kontinuirani, zavisno od interesa finansijera, a trajat će najmanje 5 godina.

8. Suradnici

Istraživanje posljedica i edukaciju će izvršiti multidisciplinirani tim ljekara, tehnologa, pravnika, ekonomista, sociologa, psihologa, inženjera kibernetike u minimalnom sastavu, i to:

Doktor nauka	6
Magistar nauka	6
Asistent specijalista	6
Pomoćno tehničko osoblje	6
UKUPNO	**24**

Svi učesnici istraživanja će biti samo dijelom radnog vremena angažovani u istraživanju.

9. Predračun godišnjih troškova

Glavni istraživač	115.200,00 KM
Naučni suradnik	155.600,00 KM
Ostali saradnici	76.000,00 KM
Oprema	35.000,00 KM
Materijalni troškovi	74.000,00 KM
Putni troškovi i kom.	50.000,00 KM
Troškovi usluga	20.000,00 KM
Troškovi ustanova	52.580,00 KM
UKUPNO	**578.380,00 KM**

Finansijer: Zavod za zdravstvenu zaštitu BiH	Zamjenik direktora Zavoda za zdravstvenu zaštitu BiH	Glavni istraživač
Mr sci. Velija Sabljić	Bahtijarević dr Rankica	Prof. dr Arif Smajkić

ANU BiH АНУ БиХ

Istraživanje genetičkog rizika u porodicama studenata Univerziteta u Sarajevu

Amira Pekuša-Redžić[1)]

Među najaktuelnije probleme savremene medicine spada razvoj akcija i metoda koji će omogućiti rađanje željenog i zdravog potomstva, potomstva koje neće biti opterećeno poremećajima determinisanim prije začeća i/ili - u raznim fazama embriogeneze.

Prema zvaničnim podacima, otprilike svakih 30 sekundi, negdje u svijetu se rodi po jedno dijete sa zdravstvenim problemima nastalim prije rođenja. McKusic (1986) navodi više od 3500 različitih patoloških stanja koja su u osnovi genetičke, odnosno nasljedne prirode. Učestalost genetičkih poremećaja u populaciji novorođenih dostiže i 7%. Malformacije, patomorfološke promjene nastale tokom embriogeneze pod uticajem spoljašnjih (ekoloških) i nasljednih (genetičkih) faktora, rezultat su procesa teratogeneza, a ispoljavaju širok spektar varijabilnosti. Zavisno od izražajnosti, malformacije se klasificiraju kao monstruoznosti, abnormalnosti i anomalije. Prema podacima Svjetske zdravstvene organizacije (WHO) svakodnevno pogoršanje ekoloških prilika uvjetuje porast hereditarnog morbiditeta u humanoj populaciji. Tako se danas prema istim izvorima čak 10% ambulantnih pregleda obavlja zbog nasljednih bolesti, 30% bolesničkih kreveta zauzimaju bolesnici sa pojedinim nasljednim poremećajima, a 40-50% djece umire ranije zbog kongenitalnih malformacija. Prema Robertsu i saradnicima (ex Zergollern & Kurjak, 1984) proporcije morbiditeta uzrokovanog genetičkim faktorima su sljedeće:

Oblik morbiditeta	Zastupljenost u %
Genski defekti	8,5
Hromosomske aberacije	2,5
Kompleksniji genetički razlozi	31,0
Vanjski uzroci uključujući infekcije i traumatizam	41,0
Bolesti sa nerazjašnjenim etiopatogenetičkim mehanizmima	17,0

1) Medicinski fakultet Univerziteta u Sarajevu, Institut za biologiju i humanu genetiku

Istraživanja malformacija u pojedinim uzorima stanovništva Bosne i Hercegovine i Sarajeva (Grujić & al. 1990; Berberović & Redžić 1996) ukazuju na visoku učestalost kongenitalnih opterećenja. To se naročito odnosi na novorođenčad iz ratnog i poslijeratnog perioda kada su vanjski činioci bili izrazito negativni po zdravlje potomstva (Redžić & Berberović, 1996; Redžić, 1998).

Sve izrazitija briga modernog svijeta za osiguranje kvalitetnijeg ljudskog života nameće urgentnu potrebu za razvojem prikladnih oblika prosvjećivanja i informiranja u oblasti reproduktivne biologije, naročito kada se radi o reproduktivno aktivnom dijelu humane populacije. Pri tome je neophodno imati u vidu objektivno nepovoljne ekološke i socijalne prilike u zemlji, kao i kulturno-tradicijska obilježja stanovništva BiH.

U tu svrhu potrebno je razviti posebne oblike zdravstvene zaštite, koji bi omogućavali pravovremenu identifikaciju rizika urođenih (kogenitalnih) malformacija i istovremeno - sistem adekvatnog obavještavanja (potencijalnih) roditelja o preventivnim mjerama koje treba poduzeti i prije planiranog začeća. Savremena organizaciona forma koja objedinjuje ove dvije značajne funkcije medicine je genetičko savjetovanje (genetic consulting). Iskustva razvijenih dijelova današnjeg svijeta govore da genetičko savjetovanje može u značajnoj mjeri uticati na incidenciju neželjenih zdravstvenih pojava kod potomstva, te doprinijeti ne samo životnoj sreći i blagostanju pojedinaca i familije već i značajnom smanjenju troškova zdravstvene zaštite i medicinskog tretmana.

U novije vrijeme se pojam genetičkog savjetovanja često zamjenjuje pojmom "genetička informacija", budući da, prema mišljenjima etičara, medicinski genetičar nije pozvan da samo savjetuje, već prvenstveno da informira, te da i na taj način pravovremeno upozori na postojeće nasljedne rizike jedinke, bračnog para ili čitavih familija u procesu biološke reprodukcije.

Prema meritornoj literaturi (Zergollern & Kurjak, 1986) nasljedni poremećaji zbog kojih se traži, odnosno zbog kojih je neophodna pravovremena genetička informacija klasifikuju se po genetičkoj etiologiji u tri osnovne grupe:

1. Hromosomske aberacije
2. Monofaktorske bolesti
3. Multifaktorska stanja

Genetička informacija može služiti u upravljanju zdravljem u svim fazama života, a posebno u prenatalnom kada se, uz upotrebu raspoloživih tehnika, može upravljati ustanovljenom malformacijom. Međutim, posebno su složena etička pitanja u ovoj oblasti (Kurjak & Zergollern 1982). Tu dolazi do simultanog posmatranja - prava na život, prava izbora partnera, prava na potomstvo, pa i malformirano, prava nekoga da oduzme život (malformiranom

djetetu), ili pravo samog malformiranog djeteta na vlastiti život. U takvom problemskom kompleksu teško je nalaziti prave i jedine odgovore. Međutim, uvažavajući medicinske, humane, društveno-ekonomske, tradicijske i druge razloge, nesumnjiva je vrijednost u poduzimanju svih raspoloživih mjera prevencije. Narod je davno kazao "bolje spriječiti nego liječiti". Upravo ova sintagma može biti poziv na uspostavu genetičkog informacionog sistema, osnove za savremenu eugeniku.

Osnovni ciljevi predloženog istraživanja su:

1) Ispitivanje učestalosti pojave odabranih faktora genetičkog rizika u porodicama studenata Medicinskog, Stomatološkog i Fakulteta kriminalističkih nauka Univerziteta u Sarajevu i pacijenata Pedijatrijske i Neuropsihijatrijske klinike KCU Sarajevo,
2) Formiranje baze podataka o genetičkim malformacijama dobivenim od ispitanika kao osnove za dalja istraživanja,
3) Uspostavljanje (obnova) sistema genetičkog savjetovanja populacije ugrožene visokim rizicima pojave nasljednih malformacija u potomstvu.

Ova istraživanja će se obaviti na Medicinskom, Stomatološkom i Fakultetu kriminalističkih nauka Univerziteta u Sarajevu.

Reprezentativni uzorak šire populacije biće u ovom projektu formiran od 150 studenata Medicinskog, 100 studenata Stomatološkog i 100 studenata Fakulteta kriminalističkih nauka Univerziteta u Sarajevu, 30-50 pacijenata Pedijatrijske i 30-50 pacijenata Neuropsihijatrijske klinike Kliničkog centra Univerziteta u Sarajevu.

Traženi podaci će biti sakupljeni putem odgovarajućih upitnika, adekvatnim pregledom i anketiranjem pacijenata pomenutih klinika i studenata pomenutih fakulteta.

Za realizaciju projekta uglavnom postoje pripremljeni šifrirani anketni upitnici i potreban instrumentarij. Istraživanje je epidemiološkog, kliničkog i laboratorijskog karaktera.

Svi prikupljeni podaci biće obrađeni uz primjenu odgovarajućih programskih paketa i savremene kompjuterske tehnike. Utvrđeni slučajevi malformacija će se evaluirati i uz primjenu kompleksnih genetičkih i kliničkih metoda.

U dosadašnjem periodu kod nas je pažnja posvećivana uglavnom kvantitativnim aspektima planiranja porodice. Planirana istraživanja imaju za cilj stvaranje osnove za kvalitativno planiranje potomstva (Berberović, 1980), odnosno za široku primjenu metoda prevencije rađanja genetički opterećenih potomaka, što predstavlja jedan od važnih razvojnih pravaca i ambicija moderne medicine.

U daljoj realizaciji projekta se predviđa formiranje Laboratorije za genetičko savjetovanje. Pouzdane su procjene da postoje velike potrebe, ali i neophodni uslovi za ustanovljenje jedne ovakve institucije.

LITERATURA

1. **Berberović Lj. (1980):** *The expansion of Familiy Planing - targets and results.* Survey, 7 (1): 66-74.
2. **Berberović Lj., Redžić A. (1996):** *Krvne grupe ABO sistema u uzorku trudnica sa indikacijama za genetičko savjetovanje.* Radovi ANUBiH, knj. 26: 119-126.
3. **Grujić S., Mehmedbašić S., Todorović G., Nikulin B. (1990):** *Rana amniocenteza na ginekološko-akušerskoj klinici u Sarajevu. Dvogodišnje iskustvo.* Medicinski arhiv 44 (3-4): 159-161.
4. **Kurjak A., Zergollern Lj., eds. (1882):** *Pravo na život i pravo na smrt.* JUMENA, Zagreb.
5. **McKusick V. A. (1986):** *Mendelian inheritance in man. Catalogus of autosomal dominant, autosomal recesive and X linked phenotypes. 7th ed.* Baltimore: Johns Hopkins University Press.
6. **Redžić A. (1996):** *Rezultati i rizik amniocenteze (analiza 409 slučajeva genetičkog savjetovanja).* Radovi ANUBiH, knj. 26: 125-135.
7. **Redžić A. (1998):** *Trudnoće sa nepovoljnim ishodom - bioreprodukcijske i populacijsko-genetičke osobenosti.* Doktorska disertacija. Univerzitet u Sarajevu.
8. **Zergollern Lj., Kurjak A. (1984):** *Prenatalna dijagnostika.* JUMENA, Zagreb.

ANU BiH АНУ БиХ

Istraživanje humanog prion proteina (PrP) i PrP gena

Đemo Subašić[1)], Faruk Konjhodžić[2)], Džemal Rezaković [2)], Kemal Šerić [1)], Irma Salimović[1)], Rijad Konjhodžić[1)] i Faris Gavrankapetanović[1)].

Prion protein (PrP) imaju svi sisari, uključujući i čovjeka. Molekulska masa ovoga proteina je 27 - 30 kDa (kilodaltona) pa je zbog toga označen kao PrP27-30. Normalni prion proteini (PrPn) nađeni su u neuronima (ćelije mozga). Njihova funkcija ni do danas nije razjašnjena. Elektronskomikroskopskim studijama ustanovljeno je da su PrP molekule veličine 5-9 nm, što je nekoliko puta manje od najmanjih virusa. Jedna PrP molekula je izgrađena od 253 aminokiseline čiji je slijed određen sekvencom PrP gena koji se nalazi na 20 p humanom kromozomu.

PrPn molekule mogu, pod do danas nepoznatim okolnostima, promijeniti svoju trodimenzionalnu strukturu (konformaciju) te preći u tzv. maligne forme označene kao PrPm. Posljedica toga je nastanak tzv. prion bolesti kod ljudi: Kuru, nasljedna i sporadična Creutzfeldt-Jakobova bolest (fCJB i sCJB), Gerstmann-Strussler-Scheinker sindrom ili GSS, nova varijanta CJB ili nvCJB, Fatal familial insomnia ili FFI) i životinja (scrapie bolest kod ovaca i kravlje ludilo ili mad cow disease). Biokemijska karakteristika ove bolesti se ogleda u akumulaciji velikog broja PrPm molekula u centralnom nervnom sistemu oboljelog organizma, a osnovna klinička karakteristika prion bolesti je spongioformna encefalopatija. PrPm molekule su pokazale ekstremnu rezistentnost na temperaturu, formaledehid, etanol, proteaze, deoksihalat i jonizirajuće zračenje. Senzitivne su na 90% fenol, eter, aceton, ureu, 10% SDS, te autoklaviranje (Prusiner et al., 1992). Za dekontaminaciju medicinskih pomagala i instrumenata koristi se guanidin tiocianat. Visok titar PrPm molekula prije pojave neuroloških simptoma utvrđen je u mozgu, limfnim čvorovima, koštanoj srži i oku kod oboljelih organizama.

Ni do danas nije poznato kako prioni uzrokuju tako destruktivnu bolest mozga. Usprkos intenzivnim istraživanjima u posljednjih dvadeset godina,

[1)] Klinički centar Univerziteta u Sarajevu, Institut za mikrobiologiju, imunologiju i parazitologiju

[2)] Akademija nauka i umjetnosti Bosne i Hercegovine

nije utvrđena etiologija, niti način prevencije prion bolesti. Sve poznate prion bolesti su fatalne. Maligne PrP molekule (PrPm) nemaju svojstvo samoreplikacije, ali kontaktom sa PrPn molekulama mijenjaju ih u maligne forme, na čudesan i do danas neobjašnjiv način. Najveća zagonetka je kako, na koji način i pod kojim uslovima dolazi do pojave PRVIH malignih formi PrP molekula?

Američki naučnik Prusiner je prije dvadeset godina drsko i heretički ustvrdio da je degenerativni poremećej CNS- a kod životinja uzrokovan proteinom i ničim više. Neobična svojstva malignih PrP molekula koja su bila toliko različita u odnosu na PrPn molekule, te viruse i viroide, navela su ga da 1982. godine uvede za njih sasvim nov termin PRIONI (proteinaceous infective particle). Označeni su, dakle, kao proteinski infektivni agensi koji nisu imali nukleinsku kiselinu, nasuprot svim ostalim poznatim infektivnim agensima (Prusiner et al., 1992.; Prusiner, 1991.).

Danas se ipak smatra da prion bolesti nastaju kao posljedica mutacija PrP gena i pojave PrPm molekula odgovornih za transfer bolesti. Neosporna je krucijalna uloga PrP gena kako kod nasljednih, tako i sporadičnih humanih prion bolesti. Zbog toga se danas kod svih pacijenata sa neobičnim psihijatrijskim i neurološkim poremećajima, ozbiljno uzima u razmatranje diferencijalna molekularna dijagnostika, odnosno istraživanje PrP gena (Goldfarb et al., 1991.; Goldfarb et al., 1991K; Goldfarb et al., 1991c., Mastriani et al., 1996.; La planche et al., 1994.; Kretzschmar et al., 1996.).

Prvi slučajevi tzv. nove varijante CJB (nvCJB) ustanovljeni su 1996. godine. Oboljele osobe su bile mnogo mladje u odnosu na one oboljele od fCJB ili sCJB. Također su se razlikovali klinički fenotipovi po primarnim simptomima i patološkim karakteristikama. Smatra se da se nvCJB pojavila kod ljudi koji su konzumirali bolesno govođe meso. NvCJB se prenosi transfuzijom tako da je neobično važno sprovesti kontroliranje svih suspektnih slučajeva molekularno biološkim analizama.

U Njemačkoj i Engleskoj je ustanovljen veliki broj suspektnih slučajeva nvCJB. Zbog toga se u tim zemljama čine ogromni napori za realizaciju istraživačkih projekata sa ciljem detekcije specifičnih poznatih i nepoznatih PrP gena, te kliničke klasifikacije pacijenata na osnovu toga.

Patologija i istraživanje nvCJB

Creutzfeldt i Jakob su 1920. i 1921. godine prvi put opisali slučajeve spongioformne encefalopatije kod ljudi, te je po njima ova bolest nazvana Creutzfeldt-Jakobova bolest (CJB). Od pedesetih godina XX vijeka pa do danas, znanje o ovoj bolesti je znatno uznapredovalo, osobito uvođenjem u

istraživanje molekularno-bioloških metoda. Međutim, mnoge dileme su ostale nerazjašnjene.

Prion bolesti se prenose nasljedno fCJB a također i na mnoge životinje u eksperimentalnim uslovima (nvCJB). Otkriveni slučajevi nvCJB kod ljudi u Engleskoj skoro sigurno su nastali konzumiranjem mesa goveda oboljelih od spongioformne encefalopatije. Prion bolest je uspješno prenijet na miša, kada su mu injektirali infektivni ekstrakt (inokulum) ovaca i goveda. Prion bolest se može prenijeti sa oboljelih na zdrave ljude transfuzijom krvi i derivata plazme.

Uobičajna patološka osobenost kod svih vrsta CJB, uočljiva pregledom tkiva mozga oboljelih osoba (post mortem) svjetlosnim mikroskopom je vakualizacija sive mase zbog čega ona poprima spužvasti izgled. Sve ove činjenice navele su naučnike da uvedu termin za ovu bolest *prenosiva spongioformna encofalopatija* (Bruce et al., 1997.; Collinge et al., 1996.; GibbsetaL, 1968.)

Danas su istraživački napor evropskih naučnih centara orijentirani na slijedeće "kritične tačke":

- Razvoj metoda za prečišćavanje krvi u transfuziološkim ustanovama. Naime, smatra se da je "infektivnost" PrPm molekula vezana za leukocite (najvjerovatnije je da se radi o B - limfocitima) te da su limfni čvorovi i slezina krucijalni u nastanku PrPm molekula.
- Razvoj dijagnostičkih metoda za utvrđivanje nv CJB iz uzoraka krvi.
- Praćenje incidence i potencijalnih uzroka prion bolesti. Intezivno se molekularnim metodama istražuje PrP gen kod svih suspektnih slučajeva nv CJB.
- Razvoj metoda eliminacije malignih PrP molekula po osnovi njihove interakcije sa plazminogenom.
- Ispitivanje inicijacije i kliničkog toka prenosive spongioformne encefalopatije.
- Ispitivanje trodimenzionalne strukture (konformacije) PrP molekula u cilju pronalaženja medikamenata koji bi spriječili PrPn → PrPm pretvorbu.
- Gen terapija (Fisher et al., 2000.; Brown et al., 1999.; Bayer et al., 1998).

Metodologija istraživanja PrP gena i PrP proteina

Elektronsko-mikroskopska istraživanja uzoraka mozga, uzetih post mortem, amiloidnih vlakana plakova u slučajevima prion bolesti kod ljudi u cilju definisanja kriterija za detekciju i razdvajanje nv CJB od ostalih tipova humanih prion bolesti (Streichenberger et al., 2000.).

Uzimanje uzorka krvi kod svih slučajeva odnosno suspektnih CJB slučajeva sa neuobičajenim psihijatrijskim i neurološkim simptomima, korištenjem specifičnih neuropatoloških kriterija.

DNA ekstrakcija

- QIAamp Blood Kit (Qiagen, Hilden, Germany) - za uzorke krvi.
- QIAamp Tissue Kit (Qiagen) - za uzorke tkiva.

Sve ekstrakcione procedure se izvode prema uputstvu firme proizvođača.

Detekcija mutacija

- PCR amplifikacija kodirajuće oblasti PrP gena uz korištenje specifičnih detekcionih primera.
- Detekcija PCR produkata vrši se u 1% agaroznom gelu za identifikaciju insercionih i delecionih mutacija.
- SSCP - Single Strand Conformational Polymorphism.

Elucija PCR produkata iz gela QIAEX II procedurom, reamplifikacuja 4 overlapping fragmenta korištenjem slijedećih primera:

Fragment 1.

5' - CTGACATTCTCCTCTTC - 3'
5' - CGGGTTGCCTCCAGGGCT - 3'

Fragment 2.

5' - CCTGGAGGATGGAACAC - 3'
5' - GTAGCCGCCAAGGCCCC - 3'

Fragment 3.

5' - TGGCACCCACAGTCAGT - 3'
5' - TTCTCCCCCTTGGTGGT. - 3'

Fragment 4.

5' - CGTGAAAACATGCACCG - 3'
5' - CCTCAAGCTGGAAAAG - 3'

Primeri za amplifikaciju fragmenata PrP gena 1 i 2 su neradioaktivno obilježeni sa fluorescirajućim bojama IRD - 41 dok su primeri za 3 i 4 fragment obilježeni sa digoksigeninom (DIG). Detekcija fragmenata 1 i 2 se vrši digitalnim vizueliziranjem pomoću automatskog sistema za sekvenciranje tokom elektroforeze. DIG - obilježeni produkti se blotiraju nylon membrane (kontakt bloting) i vizueliziraju pomoću anti-DIG antitijela konjugiranih sa alkalnom fosfatazom i odgovarajućeg supstrata.

ANU BiH АНУ БиХ

Analize mutacija

Kada se pomoću SSCP tehnike utvrdi prisustvo mutacija onda se te mutacije i analiziraju da bi se tačno vidjelo o kakvim se promjenama radi. To se može vršiti na slijedeće načine:

1. RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism-Polimorfizam restrikcionih fragmenata DNA). PCR produkti se analiziraju digestijom sa restrikcionim enzimima specifičnim za pojedine kodone PrP gena (Wu et al., 1987.).

2. Direktno sekvenciranje

Kompletna PrP kodirajuća oblast se sekvencira na slijedeći način:

Purificirani PCR produkti se reamplificiraju korištenjem 895 Wta primera (5' - TGTAAAACGACGGCCAGTTCTCCTCTTCATTTTGCAGAG - 3') i 896 Wta primera (5' - CAGGAAACAGCTATGACCCTCAAGCTGGAAAAAAGATTAG - 3').

Uslovi PCR amplifikacije su jednaki kao i za genomsku PrP amplifikaciju (genomska DNA) sa 20 ciklusa.

Purifikacija reamplificiranih PCR produkata.

Sekvenciranje pomoću Thermo sequenase i 5' IRD - 41 obilježenih primera (5' - TGTAAAACGACGGCCAGT - 3') ili rev (-29) primera (5' - CAGGAAACAGCTATGACC - 3').

Sekvenciranje pomoću automatskog sekvencera ABI PRISM (Windl et al., 1999.)

PrP genotipovi i kliničko-patološki fenotipovi humanih prion bolesti

Tabela 1. *Kliničko-patološki fenotipovi humanih prion bolesti*

prion bolesti	primarne karakteristike	trajanje	dob pacijenta	patologija
KURU	Ataksija, demencija	3 mjeseca do 1 godine	40	Kuru plakovi
sCJB	Demencija, ataksija, mioklonus	više od 1 godine	60	Vakuolizacija sive moždane mase i glioza
fCJB	Demencija, ataksija, mioklonus	1-5 godina	60	Vakuolizacija sive moždane mase i glioza
GSS	Ataksija, kasna demencija	2-6 godina	60	PrP pozitivni plakovi, glioza i vakuolizacija
FI	Insomnija, ataksija, demencija	1 godina	45	Glioza i oštećenja neurona
nvCJB	Promjene u ponašanju, kasna demencija	1,5 godina	15-55	Specifični plakovi i difuzna spongioza

Istraživanja varijabilnosti nukleotidne sekvence coding regiona humanog PrP gena, kod suspektnih slučajeva prion bolesti, pokazala su najčešće slijedeće patogene mutacije, koje su, naravno, u vezi sa određenim kliničko-patološkim fenotipovima (Windl et al., 1999.).

Tabela 2.

Tip mutacije PrP gena	Kliničko-patološki fenotip
P102L (Pro → Leu)	GSS
E200K (Gly → Lys)	CJB
D178N (Asp → Asn)*	CJB ili FFI
T183A (Thr → Ala)	CJB
V210I (Val → Ile)	CJB

* Kliničko-patološki fenotip je određen i mutacijom na 129 kodonu PrP gena

Atipične prion bolesti kod ljudi uzrokovane su mutacijama u PrP genu a mnoge od njih detektirane su genetičkim screeningom kliničkih slučajeva označenih kao "not CJD".

Nove missense mutacije i polimorfizmi mogu definisati nove subtipove prion bolesti odnosno veze PrP genotipova i njihovih kliničko-patoloških fenotipova.

Od izuzetnog značaja je izvršiti tipizaciju PrP gena na 129 kodonu jer promjena na njemu određuje čak šest varijanti sCJB ili pak ukazuje na FI (Parchi et al., 1998.).

Dijagnosticiranje nvCJB fenotipova, podrazumijeva analizu PrP gena u cilju isključivanja patogenih mutacija koje mogu lažno ukazivati na nvCJB. Neophodna je i detekcija polimorfizma na kodonu 129 (Will et al., 1996.).

Analiza PrP gena omogućava diferencijaciju humanih prion bolesti od ostalih nasljednih bolesti sa demencijom kao što je npr. Alzheimerova bolest.

Zbog velikog broja suspektnih slučajeva nvCJB kod ljudi a za koje se s pravom smatra da su uzrokovani konzumiranjem mesa goveda oboljelih od tzv. "kravljeg ludila" (mad cow disease), u Njemačkoj i Engleskoj su ustanovljeni istraživački programi čiji je cilj, između ostalog, istraživanje PrP gena, odnosno PrP genotipizacija i određivanje kliničko-patoloških fenotipova humanih prion bolesti za svaki pojedinačni slučaj.

Projekat Centra za medicinska istraživanja Odjeljenja medicinskih nauka ANUBiH pod naslovom "Istraživanje humanog Prion proteina (PrP) i PrP gena" realizirat će se u Odjelu za molekularna istraživanja i elektronsku mikroskopiju Instituta za mikrobiologiju, imunologiju i parazitologiju Kliničkog centra Univerziteta u Sarajevu. Trajanje projekta je tri godine ali

je on zbog svega navedenog svakako dugoročnog karaktera. Realizirat će se vrlo složena molekularno-biološka istraživanja PrP gena kod svih suspektnih slučajeva, kao i elektronsko-mikroskopska istraživanja uzoraka tkiva mozga uzetih post mortem. Svakako da će dobijeni rezultati kombinirani sa ostalim kliničko-patološkim nalazima dati prvu jasnu sliku o tome da li u BiH postoje slučajevi nvCJB, koje su od tipova humanih prion bolesti zastupljeni. Rezultati prvih molekularnih analiza PrP gena svakako će uključiti BiH u savremena svjetska istraživanja u ovoj izuzetno značajnoj oblasti.

LITERATURA

1. **Bayer Advisory Council on Bioethics (1998):** *Creutzfeldt Jakob disease, blood and blood products: A bioethics framework.* Bayer advisory Council on Bioethics, Ottawa 1998. Canada.
2. **Brown, P., Cervenfikov, L., McShane, I. M., Barber, P., Rubenstein, R., Drohan, W. N., (1999):** *Further studies of blood infectivity in an experimental model of transmissible spongioform encephalopathy, with an explanation of why blood components do not transmit CJD in humans.* Transfusion 39, 1169-1178.
3. **Bruce, M. E., Will, R. G., Ironside, J. W., McConnell, L, Drummond, D., Suttie, A., McCardie, L., Chree, A., Hope, J., Birkett, C., Cousens, S., Fraser, H., Bostock, C. J., (1997):** *Transmissions to mice indicate that "new variant" CJD is caused by the BSE agent.* Nature 398: 489-501.
4. **Collinge, J., Sidle, K. C. L., Meads, J., Ironside, J., Hill, A. F., (1996):** *Molecular analysis of prion strain variation and the aetiology of"new variant" CJD.* Nature 383: 685-690.
5. **Fisher, M. B., Roeckl, C., Parizek, P., Schwarz, H. P. and Aguzzi, A., (2000):** *Binding of disease-associated prion protein to plasminogen.* Nature 23, p4 79-483.
6. **Gibbs, C. J., Jr., Gajdusek, D. C., Asher, DM, Alpers, M. P., Beck, K, Daniel, P. M., Matthews, W. P., (1968):** *Creutzfeldt-Jakob disease (spongiform encephalopathy): transmission to the chimpanzee.* Sciance 161. 388-389.
7. **Godlfarb, L. G., Brown, P., McCombie, W. R., Goldgaber, D., Swergold, G. D., Wills, P. R., Cervenakola, L., Baron, H., Gibbs, C. J., Jr., Gajdusek, D. C., (1991):** *Transimissible famililal Creutzfeldt - Jakob disease associated with Jive, seven, and eight extra octapeptide coding repeates in the PRNP gene.* Proc Natl Acad Sci USA 88: 10926 - 10930.
8. **Goldfarb, L. G., Haltia, M, Brown, P., Nieto, A., Kovanen, J., McCombie, W. R., Trapp, S., Gajdusek, D. C., (199 Ic):** *New mutation in crapie amyloid precursor gene (at codon 178) in Finnish Creutzfeldt - Jakob kindret.* Lancet 337: 425 - 425.

9. **Goldfarb, L. G., Brown, P., Mitrowa, E., Cervenakova, L., Goldin, L, Korczyn, A. D., Chapman, J., Galvez, S., Cartier, L, Ruberstein, R., et aL, (1991b):** *Creutzfeldt - Jakob disease asociated with the PRNP codon 200 Lysmutation. An analysis of 45 families.* Eur J Epidemiol 7: 477-486.
10. **Kretzschmar, H. A., Ironside, J. W., DeArmond, S. J., Tateishi, J., (1996):** *Diagnostic criteria for sporadic Creutzfeldt - Jakob disease.* Arc Neurol 53: 913 - 920.
11. **Laplanche, J. L., Delasnerie-laupretre, N., Brandel, J. P., Chatelain, J., Beaudry, P., Alperovitch, A., Launay, J - M. (1994):** *Molecular genetics ofprion diseases in France.* Neurology 44: 2347 - 2351.
12. **Masters CL, Harris JO, Gajdusek DC, Gibbs CJ, Jr, Bernoulli C, Asher DM, (1979):** *Creutzfeldt - Jakob disease: Patterns of world wide occurence and the significance of familijal and sporadic clustering.* Ann Neurol 5: 177- 188.
13. **Mastrianni, J. A., lannicola, C, Myers, R. M., DeArmond, S., Prusiner, S. B., (1996):** *Mutation of the prion protein gene at codon 208 in familial Creutzfeldt - Jakob disease.* Neurology 47: 1305 -1312.
14. **Medori, R., Tritschler, H-J., LeBlanc, A., Villare, F., Manetto, V., Chen, H. Y., Xue, R., Leal, S., Montagna, P., Cortelli, B., Tinuper, P., Avonim, P., Moghi, M, Baruzzi, A., Hauw, J. J., Ott, J., Lugaresi, E., Gambetti, P., (1992):** *Fatal familial insomnia, a prion disease with a mutation at codon 178 of the prion protein gene.* N Engl J Med 326: 444 - 449.
15. **Pocchiari, M, Salvatore, M., Cutruzzola, F., Genuardi, M., Allocatelli, C. T., Masullo, C., Maćehi, G., Alema G, Galgani S, Xi Yg, Petraroli R, Silvestrini MC, Brunori M (1993):** *A new point mutation of the prion protein gene in Creutzfeldt - Jakob disease.* Ann Neurol 34: 802-807.
16. **Prusiner, S. B., Collinge, J., Powel, J. and Anderton, B., (1992):** *Prion diseases of Humans end animals.* Ellis Harwood, 1992.
17. **Prusiner, S. B., (1991):** *Molecular biology of prion diseases.* Science, vol. 252, 1515-1522.
18. **Sutherland, K., Barrie, C. and Ironside, J. W., (1994):** *Automatic quantification of amyloid plaque formation in human spongioform encephalopathy.* Neurodegeneration 3, 293-300.
19. **Sutherland, K., Goodbrand, LA., Bell, J. E., Ironside, J. W., (1996):** *Objective quantification of prion protein of spinal cards of cases of CJD.* Analytical celular pathology, 10, 25-35.
20. **Will RG, Ironside JW, Zeidler M, Cousens SN, Estibeiro K, Alperovich A, Poser S, Pocchiari M, Hofman A, Smith PG, (1996):** *A new variant of Creutzfeldt-Jakob disease in the UK Lancet.* 347: 921 - 925.
21. **Windl, O., Giese, A., Schub-Schaejfer, W., Zerr, I., Skworc, K., Aremdt, S., Oberdieck, C., Bodemer, M., Poser, S. and Kretzschmar, H. A. (1999):** *Molecular genetics of human prion diseases in Germany.* Human genetics 105: 244-252.

Istraživanje akutnog gastroenteritisa, encefalitisa i meningitisa virusne etiologije

Đemo Subašić[1)], Faruk Konjhodžić [2)], Džemal Rezaković[2)], Kemal Šerić [1)], Faris Gavrankapetanović [1)], Rijad Konjhodžić [1)], Irma Salimović [1)], Mensura Šeremet [1)]

Uvod

Virusi uzročnici akutnog gastroenteritisa kod ljudi su Rotavirusi (grupe A, B i C) i Enteroadenovirusi (tipovi 40 i 41). Rotavirusi pripadaju familiji Reoviridae a specifični su po tome što virioni posjeduju 11 molekula linearne dvostruke RNA, dok su Enteroadenovirusi članovi familije Adenovirusa te imaju monopartitnu, linearnu dvostruku DNA. Ostali virusi koji izazivaju akutni gastroenteritis su mali i okrugli te ima dosta teškoća oko njihove klasifikacije. Na osnovu morfoloških, molekularnih, kliničkih i imunoloških studija ovi virusi su provizorno svrstani u četiri skupine: Norwalk i Norwalk-like virusi, Calicivirusi, Astrovirusi i Small round structured virusi (SRSV) ili virusi sa malim strukturalnim prstenovima. Posjeduju jednostruku, pozitivnu RNA, virusne partikule su sferične, promjera 27-38 nm dok Rota virusi Enteroadenovirusi imaju promjer 70-75 nm, odnosno 70-80 nm. (Blacklow and Greengerg, 1991.; Singleton and Sainsbury, 1993.).

Svake godine u USA ima registrovanih 3,5 miliona slučajeva bolesti od čega 35% otpada na virusni gastroenteritis koji često imaju fatalni kraj. Najčešći uzročnik gastroenteritisa kod dojenčadi jesu Rotavirusi. Kliničku slika ove bolesti karakteriše dehidrirajući gastroenteritis (5-7dana) koji je praćen povraćanjem i groznicom. Najveća incidenca rotavirusnih infekcija utvrđena je kod dojenčadi u dobi od 3-15 mjeseci života.

Uobičajeni tretman kod ove bolesti je upotreba oralnih dehidratacijskih tečnosti (Kapikan and Chanock, 1996.).

SRSV su čest uzročnik akutnog gastroenteritisa. Infekcije su specifične za ustanove kao što su bolnice, domovi gdje je kontakt medicinskog osoblja i

[1)] Klinički centar Univerziteta u Sarajevu, Institut za mikrobiologiju, imunologiju i parazitologiju

[2)] Akademija nauka i umjetnosti Bosne i Hercegovine

oboljelih pacijenata čest i blizak. SRSV partikule se prenose hranom i vodom (Hedberg and Osterholm, 1993.).

Metode koje se danas koriste za dijagnosticiranje navedenih virusa su ELISA- test, elektronska mikroskopija, Polymerase chain reaction-reverse transcriptase (RT-PCR) ili lančana reakcija polimeraze s upotrebom enzima reverzne transkriptaze, kojim se virusna RNA prevodi u DNA radi PCR amplifikacije. DNA sekvenciranjem se ispituje diverzitet nukleotidnih virusnih sekvenci specifičnih genotipova (Blacklow and Greenberg, 1991. ; Tsai et al., 1994.; Govea et al., 1990.; Gray et al., 1997.; Boom et al, 1990.).

Virusi koji inficiraju centralni nervni sistem kod ljudi su: Herpes simplex virus (HSV), Varicella zoster virus (VZV), Enterovirusi i Mumps virusi.

HSV (tip l i 2) pripadaju familiji Herpesviridae, odnosno subfamiliji Alfa herpesvirinae. Virusne partikule su sferične i sadrže monopartitnu linearnu DNA. HSV-1 je uobičajen uzročnik virusnog encefalitisa. Član familije Herpesviridae je i VZV.

Enterovirusi pripadaju familiji Picornaviridae. Izometrične virusne partikule posjeduju jednostruku, pozitivnu, monopartitnu i linearnu RNA. Mnogi Enterovirusi se mogu umnožavati u kulturi ćelija (HeLa, Vero, Wi-38). Postoji preko 70 različitih tipova Enterovirusa (Poliovirusi 1-3; Coxcackie virusi tipovi A1-A23; B1-B6; Echovirusi tipovi 1-9, 11-27 i 29-33). Meningitis uzrokuju Coxackie virusi, Echovirusi a također i neklasificirani enterovirusi (tip 70 i 71). Enterovirusne infekcije su najčešće tokom ljetnih mjeseci, a infekcije uzrokovane sa HSV uobičajene su tokom cijele godine. Ovi virusi inficiraju dojenčad, malu djecu kao i odrasle osobe. Bez pravovremene odgovarajuće terapije procenat smrtnosti u slučajevima encefalitisa je veći od 70%. Promptnom terapijom sa acyclovirom ovaj procenat se u slučaju HSV infekcija može smanjiti za 20%.

Mumps virus pripada rodu Paramyxvirus, odnosno familiji Paramixoviridae. Virioni imaju nesegmentiranu negativnu jednostruku RNA, sferični su dijametra 150-200 nm.

Danas se brza, visokospecifična i senzitivna detekcija navedenih virusa u kliničkim uzorcima vrši pomoću PCR i RT-PCR (Desselberger, 1995.; Cone et al., 1991.).

Ranije i sadašnje stanje dijagnosticiranja virusa uzročnika gastroenteritisa, encefalitisa i meningitisa u BiH

Dijagnostika raznih tipova enterovirusa u BiH ustanovljena je 1976. godine kada je prof. dr. Kemal Šerić sa saradnicima formirao Laboratorij za proizvodnju kultura ćelija u Institutu za mikrobiologiju, imunologiju

i parazitologiju, na kojima su se vršile izolacije, identifikacije i tipizacije virusa. Enterovirusi su bili detektovani u sporadičnim slučajevima infekcija sa različitom kliničkom simptomatologijom (meningitis, enteritis, egzantemi i razna febrilna stanja). U tom laboratoriju su izolovani uzročnici epidemija seroznog meningitisa koje su bile 1979. i 1988. godine (Coxackie virus A-9, ECHO virus-30, ECHO virusi tip 4 i 7). U BiH također i uzročnici epidemije novorođenčadi sa simptomima miokarditisa i perikarditisa (Coxackie virus B-3).

Za izolaciju i tipizaciju virusa metodom kulture tkiva potrebno je oko mjesec dana, s tim što ovaj metod ima relativno visok stupanj senzitivnosti i specifičnosti. Molekularno-biološkim metodama kao što su PCR i RT-PCr moguće je za 1-2 dana izvršiti identifikaciju virusa uzročnika encefalitisa, meningitisa i gastroenteritisa sa tačnošću od 99,9%. Brzina, senzitivnost i specifičnost su glavni razlozi što je danas PCR metod umjesto ranije kulture tkiva i ćelija, postao "zlatni standard" u dijagnostici infektivnih agenasa (virusa, bakterija, gljivica).

Danas u BiH ne postoji dijagnostika HSV, SRSV, Enterovirusa i Rotavirusa.

Značaj realizacije projekta "Istraživanje akutnog gastroenteritisa, encefalitisa i meningitisa virusne etiologije"

Institut za mikrobiologiju, imunologiju i parazitologiju Kliničkog centra Univerziteta u Sarajevu je zbog svih navedenih razloga pokrenuo istraživački projekat čija bi realizacija dovela do estabiliranja vrhunskih molekularnih metoda (PCR, RT-PCR, DNA sekvenciranje), te ostalih metoda kao što su ELISA, PAGE (Poliakril amid gel elektroforeza) i elektronska mikroskopija a u svrhu dijagnostike i karakterizacije virusa uzročnika gastroenteritisa, encefalitisa i meningitisa na području BiH. Također bi bila omogućena kontrola ovih oboljenja i odgovarajuća pravovremena zaštita pacijenata, osobito dojenčadi i djece.

Na osnovu komparativnih analiza diverziteta nukleotidnih sekvenci detektiranih virusa biće moguće korigirati dizajniranje sekvenci specifične PCR-detekcionih primera za virusne izolate u BiH. Omogućila bi se kontinuirana edukacija mladih stručnjaka iz domena PCR-tehnologije, DNA-sekvenciranja i dizajniranja PCR primera i saradnja sa odgovarajućim institucijama u razvijenim zemljama.

Detekcija virusa i istraživanje nukleotidnih sekvenci dovelo bi do prvih podataka o prisustvu specifičnih virusnih genogrupa na području BiH što je osnov za buduća molekularno-epidemiološka istraživanja. Rana i brza dijagnostika, bazirana na molekularno-biološkim metodama, čini mogućom i realnom pravovremenu i efikasnu terapiju.

Projekat će trajati tri godine, a realizirat će se u Odjeljenju za molekularnu dijagnostiku i istraživanje Instituta za mikrobiologiju pri Kliničkom centru Univerziteta u Sarajevu.

LITERATURA

1. **Blacklow, N. R. and Greenberg, n., 1991:** *Viral gastroenteritis.* The New England Journal of Medicine, vol. 325, No. 4, 252-264.
2. **Boom, R., Salimans, J., Wertheim-Van Dillen, P. And Noordaa van der J. A., 1990:** *A rapid and simple method for purification of nucleic acids.* J. Clin. Microbiology 28, 495-503.
3. **Tsai, Y. L., Tran, B., Sangermano, L. R., Palmer, C. J., 1994:** *Detection of poliovirus, hepatitis A virus and rotavirus from sewage and ocean water by triplex reverse transcriptase PCR.* Appl. Environm. Microbiology 60, 2400-2407.
4. **Govea, V., Glass, R. I., Woods, P., Taniguchi, K., Clarc, H. F., Forrester, B., Fang, Z. Y., 1990:** *Polymerase chain reaction amplification for typing of rotavirus nucleic acid from stool specimens.* J. Clin Microbiology, 28, 276-282.
5. **Kapikan, A. Z. and Chanock, R. M., 1996:** *Rotaviruses.* In: Fields Virology, 3rd Editian, edited by B. N. Fields et al., p 1657-1708. Lippincott-Raven, Philadelphia.
6. **Gray, J. J., Green, J., Cunliffe, C., Gallimore, C., Lee, J. V., Neal, K. And Brownn, D. W. G., 1997:** *Mixed genogroup SRSV infections among aparty of Canoeists exposed to contaminated recreational water.* Journal of medical Virology, 52, 325-429.
7. **Cone, R. W., Hobson, A. C: , Palmer, J., Remington, M. and Corey, L., 1991:** *Extended duration of herpes simplex virus DNA in genital lesions detected by Polymerase chain reaction.* J. Infect. Dis. 164, 757-760.
8. **Desselberger, U., 1995.:** *Medical Virology- A practical approach.* IRL PRESS, Oxford University Press.
9. **Hedberg, C. W., Osterholm, M. T., 1993:** *Outbreaks of food- borne and water-borne viral gastroenteritis.* Clin. Microbiol. Rev., 6, 199-210.
10. **Singleton, P., Sainsbury, D., 1993:** *Dictionary of Microbiology and Molecular Biology, 2nd edition.* John Wiley & Sons.

Značaj imunohistohemije i kliničkih podataka u dijagnostici malignih limfoma klasificiranih po R.E.A.L. [1)]

Evaluacijski period 1989-1991. i 1997-1999. za Sarajevsku regiju

Nurija Bilalović[2)], Ivan Selak [2)]

1. Uvod

Urgentnost klasifikacije je jedan fundamentalni humani instinkt, sličan predispoziciji grijeha, koji prati naše rođenje, život i naš kraj (*Hopwood A.T.*).[15] *Willis* je 1948 g. u knjizi "Patologija tumora" napisao da nigdje kao u neoplazmama limfnih čvorova nema veće zbrke imena i naslova.[1] Saul A. Rosenberg, izdavač časopisa "Krv", prije izlaska R.E.A.L. klasifikacije izjavljuje: "Situacija nije izmjenjena do danas, u odnosu na izjavu dr Willisa".[1] Razlog je velika ekspanzija ove oblasti razvitkom imunohistohemije i molekularne biologije. Imunolozi i hematopatolozi imaju metodologiju i reagense za identifikaciju većeg niza limfoidnih stanica što nije bitno za klasične morfološke kriterije. Od 1938-1994. godine, klasifikacija NHL i HL mijenja se više puta. Pokušaj u klasifikaciji započeo je studijama *Robb-Smitha* 1938. i *Gal & Mallory* 1942. a završio klasifikacijom *Rappaport* 1966. godine. Ova klasifikacija napravljena je na osnovu morfološkog i deskriptivnog izgleda stanica.[10] *Lukes* i *Collins* prvi uvode klasifikaciju limfoidnih neoplazmi baziranu na B i T staničnim limfomima. Iste godine *Gerard-Marchanti* i suradnici; *Kiel* i *Lennert* 1974; stvaraju novu klasifikaciju limfoma nazvanu *Lenert-Kiel klasifikacija.* Klasifikacija je bazirana na funkcijskom porijeklu stanica, uvode se termini dobro i loše diferencirani limfom, sa prefiksima "cytic" ili "cytoid" i "blastic".[11] *BNLI* (British National Lymphoma Investigation classification-Bennett et all, 1973) stvara klasifikaciju limfoma koja se nadopunjava na Rapaportovu.[4] Dvije godine iza, *W.H.O.* daje prijedlog nove klasifikacije malignih limfoma.[13] 1982. godine osam godina poslije NCI study (The Non Hodgkin Lymphoma Pathologic Classification Project) sačinjava *Working Formulation* klasifikaciju limfoma. Od ovih šest

[1)] Revizija Europsko američke Limfoma klasifikacije

[2)] Medicinski fakultet Univerziteta u Sarajevu, Institut za patologiju

klasifkacija, samo tri su se razvijale i bile u kliničkoj upotrebi i to: *Working Formulation* korištena od Nationalnog Cancer Instituta za njihove protokolarne studije, *Lukes-Collins* classification korištena od strane patologa United States, Lenert-Kiel classification korištena u Evropi. Razvoj monoklonalnih antitijela i njihova aplikacija na fiksiranom tkivu omogućila je imunotipizaciju hematoloških neoplazmi, te dijagnostičku primjenjivost i reproduktibilnost. Ovo je moglo rezultirati samo novom klasifikacijom koja je nazvana "realna". Ona respektuje Kiel, Lukes-Collins i Working klasifikaciju ali sa sasvim novim kriterijima za dijagnozu kao što su imunohistohemijski, molekularno biološki i klinički. Jednom rečenicom ova nova R.E.A.L. klasifikacija (Revised European-American Lymphoma Classification) prikazuje šta hematopatolog radi a ne šta treba da radi. Ranije klasifikacije su definirale maligne limfome kao jednu bolest a novom klasifikacijom viđene transformacije malignih limfoma klasifricirale su limfoidne neoplazme kao skup različitih bolesti. Klinička agresivnost različita je od slučaja do slučaja, to nije kao u ranijim klasifikacijama refleksija histološkog gradusa, determinisana na primjer brojem velikih stanica, već se klinička agresivnost može signifikantno mjenjati tokom proliferativne aktivnosti i apoptoze, aktivacijom onkogena, razvojem rezistencije na lijekove, lokalnim faktorima (citokini) i potencijalnom infekcijom (Helicobacterr pylorri).[2] U novembru 1997. godine, prezentirana je neznatna modifikacija R.E.A.L. klasifikacije nazvana *adaptirana R.E.A.L.* ili *WHO klasifikacija.* Ona može biti sumirana u parcijalnoj modifikaciji nomenklature, formaciji homogenih osobina i promociji propisa osobina unutar realne klasifikacije.[8]

2. Formulacija problema

Naučni i društveni interes teme obrazložene činjenicama koje su proizašle iz diskusije sa sastanku u Virginia, USA, 1997. i mnogih publickacija i radova nastalih u tom periodu. Ona priznaje zbir morfoloških, imunofenotipskih, genotipskih i kliničkih osobina koji su determinisani primarnom lokalizacijom neoplazme (nodalna, ekstranodalna), kliničkim tokom i odgovorom na specifičnu terapiju.[1] Dijagnostički kriteriji u R.E.A.L. klasifikaciji su uvijek kompleksni i nisu limitirani jednim parametrom (npr. morfološkim). Histologija je presudna u dijagnostici folikularnog limfoma, imunotipizacija u dijagnozi mantle limfoma i klinička lokalizacija u T-Cell i mediastinal large B-Cell limfomima. U datim studijama reproduktibilnost R.E.A.L. klasifikacije je 86-95%, što je za 20% više od Kiela, 40% od Working Formulation classification.[3,4,5,6,7] WHO klasifikacija limfoidnih hiperplazija nastala 1997. godine kao adaptirana R.E.A.L, može biti sumirana u parcijalnoj modifikaciji nomenklature, formaciji homogenih osobina i promociji propisa osobina unutar realne klasifikacije. Predložena klasifikacija priznaje B-stanične, T/NK-stanične neoplazme i Hodgkinovu bolest.

3. Ciljevi istraživanja

Na temelju uvoda i našeg dosadašnjeg rada postavljeni su sljedeći ciljevi:

1. Imunotipizirati, redefinirati i reklasificirati neoplazme limfnih čvorova na ukupnom šestogodišnjem materijalu u retrogradnoj studiji po R.E.A.L. klasifikaciji.
2. Konačno postavljenje dijagnoze poštovaće postulate: limfoidne neoplazme se klasifriciraju kao skup različitih bolesti, klasifikacija priznaje zbir morfoloških, imunofenotipskih, genotipskih i kliničkih osobina koji su determinisani primarnom lokalizacijom neoplazme (nodalna, ekstranodalna), kliničkim tokom, odgovorom na specifičnu terapiju.
3. Izvesti prognostički indeks (godine, stadij tumora, LDH, broj ekstranodalnih promjena), prognostičke parametre asocirane sa progresijom bolesti ili preživljavanjem (Ann Arbor stadij, broj ekstranodalnih lokalizacija, najveći dijametar tumora, specifičnu ekstranodalnu lokalizaciju, LDH i porast β2-microglobulina), parametre asocirane sa odgovorom pacijenta na tumor, te parametre asocirane sa odgovorom pacijenta na tretman.
4. Ove indekse uporediti u predratnom i poslijeratnom periodu, u koleraciji sa R.E.A.L. klasifikacijom.

4. Plan rada

4.1. Materijal

Materijal za projekat čine humani bioptički parafinski blokovi pacijenata sa dijagnozom malignog limfoma i klinički podaci skupljeni sa Klinike za hematologiju i onkologiju. Polazeći od postavljenih ciljeva, odabrane su dvije grupe. Jednu grupu čine bioptički uzorci pacijenata iz 3 predratne a drugu grupu iz 3 poslijeratne godine. Zastupljene su sve dobne grupe i oba spola, sa različitim kliničkim stadijem. Svi pacijenti su klinički praćeni, poznate su vrijednosti labaratorijskih nalaza, dužina terapije i klinički stadij.

4.2. Metode rada

Sve biopsije iz navedenog perioda biće ponovo obrađene, morfološki i imunohistohemijski. Radiće se histohemijska bojenja i imunohistohemijske reakcije antigen antitijelo: LCA, Clone: PD7/26, B Cell CD 20cy, Clone: L26, B Cell, CD 74, Clone: LN-2, T Cell, CD3, Clone: PC3/188A, Cell, CD5, Clone 4C7, CD 10, (CALLA), Clone: 2B11+ PD7/26, CD30, Clone: Ber-2, ALK Protein, Clone: ALK1, CD15, Clone: C3D1, BCL2 Oncoprotein Clone: 124, B Cell, Cdw75, Clone: LN1, CD 79a, Clone: JCB 117, CD23,

АНУ БиХ АНУ БиХ

Clone: MHM 6, IgA, Clone: 6E2Cl, lgM, Clone: Rl/69, IgG, Clone: A57H, IgD, Clone: lgGD26, Kappa, Clone: A8B5, Lambda, Clone: A8B5, MPO, CD la, CD 56, Clone: T199, CD 34, Clone QBEND 10, lmmunotech, Cyclin Dl, Clone: DCS 6. Ovi patohistološki nalazi će se korigirati u četiri evropska centra za hematopatologiju (Herlev, Wirsburg, Zagreb i Ljubljana). Za sve pacijente izvesti prognostički indeks (godine, stadij tumora, LDH, broj ekstranodalnih promjena) odnosno prognostički parametre asocirane sa progresijom bolesti ili preživljavanjem (Arbor stadij, broj ekstranodalnih lokalizacija, najveći dijametar tumora, specifična ekstranodalna lokalizacija, LDH i porast β2- microglobulina) parametre asocirane sa odgovorom pacijenta na tumor te parametre asocirane sa odgovorom pacijenta na tretman.

4.3 Statistička obrada podataka

Statistička obrada dobivenih podataka će se vršiti deskriptivnim metodama, kao i adekvatnim parametarskim i neparametarskim testovima u zavisnosti od dobivenih rezultata.

5. Zaključak

Nakon obavljenog pregleda bioptičkog materijala urađene imunohistohemije, analize kliničkih podataka, te uporedbe ovih nalaza sa literaturnim podacima i podacima Međunarodne studijske grupe lymfoma (1994), dobiće se rezultati koji će biti svrsihodni i primjenjivi za sve koji se bave ovom problematikom.

Literatura

1. **Haaris NL, Jaffe ES, Stein H, Banks PM, Chan JKC, Cleary ML, Delsol G, De Wolf-Peeters C, Falini B, Gatter KC, Grogan TM, Isaacson PG, Knowles DM, Mason DY, Muller-Hermelink H-K, Pileri SA, Piris MA, Ralfkiaer E, Warnke RA:** *A Revised European-American Classification of Lymphoid Neoplasms: A Proposal from the International Lymphoma Study Grup.* Blood 84(5): 1361-1392, 1994 Sept.
2. **Pileri SA, MilaniM, Fraternali-Orcioni G, Sabattini E:** *From the R.E.A.L. Classification to the upcoming WHO scheme: A step towarrd universal categorisation of lymphoma entities?.* Ann Oncol 1998; 9: 607-612
3. **Pittalga S, Bijnens L, Teodorovic l, Hagenbeek A, Meerwaldt J. H. Somers R et al.:** *Clinical Analysis of 670 Cases in Two Trials of the EORTC Lymphoma Cooperative Group Subtyped Accorrding to the REAL Classification of Lymphoid Neoplasms.* Blood 1996; 87: 4358-4367.

4. **Melnyk A, Rodriguez A, Pugh WC, Cabannillas F:** *Evaluation of the REAL Lymphoma Classifiaction Confirrms the Clinical relervarnce of lmmunophenotype in 560 Cases of Aggressive Non-Hodgkins Lymphoma .*
5. *A Clinical evaluation of the International Lymphoma Study Group Classification of non-Hodgkins Lymphoma. The Non-Hodgkin's Lymphoma Classification Project.* Blood 1997; 89: 3909-3918.
6. *A clinical evaluation of the International Lymphoma Study Group Classification of non-Hodgkin's lymphoma. The Non-Hodgkins Lymphoma Classification Project.* Blood 1997; 89: 3909-3918.
7. *Effect of age on the characteristics and clinical behavior of non-Hodgkin's lymphoma patients. The non-Hodgkin's Lymphoma Classification Project.* Ann Oncol 1997; 8: 973-78.
8. **Jaffe ES, Harris NL, Diebold J, Muller-Hermelink HK:** *World Health Organization Classification of neoplastic diseases of the hematopoietic and lymphoid tissues. A progress report.* Am J Clin Pathol 1999 Jan; 111(1 Suppl 1): S8-12 Hematopathology Section, Laboratory of Pathology, National Cancer Institute, Bethesda, Maryland, USA.
9. *Janez Jancar Progres in the calssification of myeloid and lymphoid neoplasms. From REAL to WHO concept.* Adv Clin Path, (2000), 4, 59-76.
10. **David Mason and Kevin Gater:** *Lymphoma Classification. The pocket guide. Distributors Marston book services.* Registered at the United Kingdom 1998.
11. **Knowles DM ed.:** *Neoplastic hematopathology.* Baltimore Wiliams & Wilkins, 1992: 73-167.
12. **Tubbs RR, Fishleder A, Weiss RA, Savage RA, Sebek BA, Wick JK:** *Immunohistologic cellular phenotypes of lymphoproliferative disordes. Comprehensive evaluation 564 cases includes 257 NHL classified by the International Working Formulation.* Am. J Pathol 1983; 113: 207-21.
13. **Roger A. Warnke, M. D. Lawrence M. Weiss, M. D. et all.:** *Tumor of lymph nodes and spleen.* AFIP 1995
14. **Lennert K, Feller A:** *Histopathology of non-Hodgkins Lymphomas (ed2).* New York, NY, Springer-Verlag, 1992.
15. **Hopwood A.T.:** *Proceedings of the Linnean Society of London (1957).* 171: 230-234.

RADOVI
Odjeljenje medicinskih nauka
Centar za medicinska istraživanja

Izdavač

Akademija nauka i umjetnosti
Bosne i Hercegovine

Saradnici

Snježana Ćerić,
Rasim Kovačević
Danica Radić

Tiraž: 250

Štampa

Štamparija "Print M"

Sarajevo, 2002. Godine

Izlazi povremeno

ANU BiH АНУ БиХ

SGS International Certification Services AG

CERTIFICATE

Certificate Number 201393

SGS International Certification Services AG, Zurich, certifies that

BOSNALIJEK d.d.
BA-71000 Sarajevo, Bosnia and Herzegovina

has introduced and is applying a Quality Management System.

On the occasion of the certification audit by SGS-ICS the Quality Management System has been assessed and registered as meeting the requirements of:
SN EN ISO 9001 : 2000

The scope of the Quality Management System certification covers:
Development and Production of Pharmaceuticals.

The certificate is valid for three years up to and including July 10, 2004.

SGS International Certification Services AG
Technopark, Pfingstweidstrasse 30, CH-8005 Zurich

Zurich, July 11, 2001

The Management

Member of the SGS Group (Société Générale de Surveillance)

ANU BiH АНУ БиХ



BOSNALIJEK

Politika kvaliteta

Naša politika kvaliteta je da zadovoljavamo sve zahtjeve, potrebe i očekivanja naših kupaca, zaposlenih i dioničara.
Cilj nam je da stvorimo i održavamo imidž uspješne i pouzdane kompanije; osvajamo nova tržišta i unapređujemo kvalitet života svojim proizvodima.

Ovo ćemo ostvariti:

Poštivanjem GMP smjernica i primjenom najviših međunarodnih standarda koji garantuju kvalitet proizvoda i zaštitu čovjekove okoline;
Kontinuiranim unapređenjem kvaliteta u svim poslovnim procesima;
Permanentnim obrazovanjem svih zaposlenih;
Primjenom najsavremenijih tehnoloških rješenja;
Opredjeljenjem menadžera na svim nivoima za kontinuirano unapređenje kvaliteta;
Uključivanjem dobavljača u naš sistem kvaliteta i razvijanjem partnerskih odnosa.

ANU BiH АНУ БиХ

U Bosnalijeku smo svjesni okolinskog uticaja proizvoda i usluga i zbog toga ćemo se ponašati prema Okolinskom usmjerenju kompanije.
Davanjem odgovarajućeg mjesta kvalitetu i kontinuiranim radom na provođenju Politike kvaliteta zadovoljit ćemo potrebe i očekivanja kupaca .



Direktor:
Edin Arslanagic
dipl.ing.chem


New for advanced breast cancer
THE MOST ACTIVE INHIBITOR*
of microtubule depolymerization
ONE-HOUR INFUSION TIME
100 mg/m² over 1 hour iv. every 21 days.
GENERALLY WELL TOLERATED
Most common adverse events were myelosuppression, alopecia, asthenia, rash, neurosensory reactions, and fluid retention.
• Neutropenia (<500 mm³) was generally not complicated and of short duration.
• The incidence and severity of cumulative fluid retention and the subsequent treatment discontinuation (less than 2%) are significantly reduced by use of a 5-day oral corticosteroid premedication.
Striking clinical responses even as a single agent
48% overall response rate
(n = 83)
34% response rate in liver metastases
(n = 29)
n = number of anthracycline/anthracenedione resistant patients with advanced breast cancer treated with Taxotere® (docetaxel)[1]
†95% CI (37%–59%)
TAXOTERE®

Aventis

Aventis Pharma
71000 Sarajevo
Radićeva 8/I
www.aventis-pharma.ba

Metastazirajući karcinom kolona i rektuma

CAMPTO®

Irinotecan

Prvi specifični blokator
DNA-topoizomeraze I

ANU BiH
АНУ БиХ

Terapeutske indikacije

Campto je indiciran za tretman pacijenata sa uznapredovalim kolorektalnim karcinomom:

- u kombinaciji sa 5 - flurouracilom i folnom kiselinom kod pacijenata bez prethodne kemoterapije za uznapredovalu bolest
- kao monoterapija kod pacijenata nakon pada prethodne terapije sa 5 - floururacilom

MONOTERAPIJA
u ambulantnom liječenju

značajno preživljavanje

GEMZAR®
(gemcitabine HCl)



Naučno dokazana dobra učinkovitost i podnošljivost kod tretmana karcinoma pankreasa i nemikroćelijskog karcinoma pluća (NSCLC)

ELI LILLY (Suisse) S. A., Koševo 9, Sarajevo, BiH, Tel.: 33 263 670, Fax.: 33 216 686

Lilly