Baština Akademije nauka i umjetnosti Bosne i Hercegovine

RADOVI LXXXVIII, knj. 25.

Rezaković, Džemal

1991

Akademija nauka i umjetnosti Bosne i Hercegovine

https://bastina.anubih.ba/items/3bff7ae5-1a58-4336-9010-7be80dd2e58a

Preuzeto s Baštine Akademije nauka i umjetnosti Bosne i Hercegovine

https://bastina.anubih.ba/



AKADEMIJA NAUKA I UMJETNOSTI
BOSNE I HERCEGOVINE

RADOVI

KNJIGA LXXXVIII

Odjeljenje medicinskih nauka
Knjiga 25

SARAJEVO 1991

AKADEMIJA NAUKA I UMJETNOSTI
BOSNE I HERCEGOVINE

RADOVI

KNJIGA LXXXVIII

Odjeljenje medicinskih nauka
Knjiga 25

Redakcioni odbor
Jela Grujić-Vasić, Džemal Rezaković,
Dragomir Stanković

Urednik
Džemal Rezaković,
redovni član Akademije nauka i umjetnosti
Bosne i Hercegovine

UDC 615/.617:502(082) YU ISSN 0350-0071

SARAJEVO 1991

ACADEMY OF SCIENCES AND ARTS
OF BOSNIA AND HERZEGOVINA

WORKS

VOL. LXXXVIII

Department of Medical Sciences
Vol. 25

Editorial Board
Jela Grujić-Vasić, Džemal Rezaković,
Dragomir Stanković

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

UDC 615/.617:502(082)

YU ISSN 0350-0071

SARAJEVO 1991

VIRUSNI HEPATITISI U JUGOSLAVIJI SA POSEBNIM OSVRTOM NA STANJE U SRBiH I NA NOVA OTKRIĆA IZ OVE OBLASTI

J. A. GAON, R. MULIĆ, V. ILISIĆ, B. S. TELEBAK
Institut za epidemiologiju Medicinskog fakulteta, Sarajevo

UDC 616.988:616.36(497.51)

Apstrakt. Posljednjih deset godina prosječno obolijeva u Jugoslaviji nešto više od 120 lica na 100.000 stanovnika, osim u posljednjih četiri godine, kada broj oboljenja i raširenost tih oboljenja opada.

Umiranje oboljelih od virusnog hepatitisa trudnih žena sa deficijentnom ishranom, posebno deficitarnom animalnim bjelančevinama, dostizalo je do 10%, dok je u ostaloj populaciji stopa letaliteta od virusnog hepatitisa A iznosila ispod 0,1%, a za hepatitis B nešto više od 0,4%.

Od virusnog hepatitisa A najviše obolijevaju djeca u predškolskim ustanovama i osnovnim školama.

Među faktore transmisije ovog tipa hepatitisa je kod kuće ili u školi kontaktni put, upotreba zagađene vode, kontaminirane hrane i nizak stepen lične higijene, naročito nedostatak navike redovnog pranja ruku.

Od 373 uzorka krvi uzete random metodom utvrđeno je prisustvo anti-HAV antitijela kod 73,19% zdravih lica.

Virusni hepatitis tipa B i broj zdravih nosilaca HBsAg u posljednje vrijeme se povećava.

Od svih registrovanih oblika virusnih hepatitisa u Jugoslaviji (virusni hepatitis A, virusni hepatitis tipa B i neidentificirani tipovi) smatra se da u oko 7,5% ima oboljelih od virusnog hepatitisa tipa B (ispitivanja u 1989. — tabela br. 4), ali se smatra da ta stopa iznosi do 30% prema ispitivanjima u drugim godinama.

Naša ispitivanja 3.631 zdravog stanovnika su pokazala da u Bosni i Hercegovini ima oko 1,24% zdravih nosilaca HBsAg.

U ovom radu govori se o novim saznanjima o hepatiitsu tipa C, D i E, o epidemiološkim karakteristikama ovih oboljenja, dijagnostičkim metodama i mjerama borbe protiv svih navedenih tipova hepatitisa.

Ključne riječi: prisustvo, prevalencija, virusni hepatitisi u Jugoslaviji, nova saznanja o virusnom hepatitisu C, D, E.

UVOD

U našoj zemlji se registruje u posljednjih desetak godina prosječno oko 28.000 slučajeva virusnih hepatitisa. To znači da na 100.000 stanovnika boluje više od 120 lica, osim četiri posljednje godine, otkada broj oboljenja postepeno opada.

Od svih republika naše zemlje Bosna i Hercegovina stoji na drugom mjestu, iza SR Makedonije, sa preko 155 oboljelih na 100.000 stanovnika. U SR BiH su svi regioni zahvaćeni ovom bolešću, počev od Bosanske krajine do istočnih dijelova ove Republike.

Poslije velikih seoskih epidemija 1963. godine na teritoriji bihaćkog sreza (uglavnom hepatitis tipa A), virusni hepatit se kreće na zapad, tako da je u banjalučkom srezu stopa prevalencije ove bolesti 1965. godine iznosila 430,4 na 100.000 stanovnika, a odmah krajem iste i sledeće godine na području sarajevskog sreza prevalencija virusnog hepatita dostiže do 452,2 na 100.000 stanovnika. Krajem 1966. godine epidemije ove bolesti javljaju se u Višegradu, Rogatici i u Goraždu.

Umiranje od virusnog hepatitisa poslije 1963. imalo je visok stepen među trudnim oboljelim ženama. U ostaloj populaciji letalitet je iznosio ispod 0,1%.

Na teritoriji SR Bosne i Hercegovine među oboljelim licima od virusnog hepatitisa tipa B sa perzistirajućim ili progresivnim tipom zapaljenja jetre primjećeno je od strane kliničara povećanje ciroze jetre i primarnog karcinoma jetre.

U novije vrijeme otkriveno je da veliki rizik za hronično oboljenje jetre postoji kod bolesnika koji boluju od hepatitisa tipa B, C i D.

Sve to daje problemu virusnog hepatitisa društveno-ekonomski i izvanredno važan zdravstveni značaj, pred kojim se ne može ostati pasivan, zbog čega često intervenišemo tek kad se pojavi više slučajeva ili epidemija ove bolesti (1).

To je i razlog što je u SR BiH prihvaćen *Republički program za borbu protiv virusnog hepatitisa,* u kojemu aktivno sarađuje Medicinsko odjeljenje Akademije nauka i umjetnosti SR BiH.

U ovom radu iznosimo najvažnija iskustva o dosadašnjim proučavanjima hepatitisa tipa A i B i nediferenciranog tipa.

MATERIJAL I METODE RADA

Na području cijele Republike Bosne i Hercegovine za svaki slučaj virusnog hepatitisa higijensko-epidemiološka služba opštine vršila je anketiranje oboljelih. U slučaju više oboljenja ili epidemije određen je poseban tim iz iste službe, koji je vršio epidemiološko izviđanje terena i od najmanje 5% bolesnika uzimao krv, koja je upućivana Regionalnoj ili Republičkoj ili laboratoriji Medicinskog fakul-

teta u Sarajevu, radi laboratorijskog pregleda na Hepatitis tipa A, B i nekih virusnih ili bakterijskih oboljenja (CMV, Epstein-Barr, leptospiroze i dr.).

Na osnovu prijavnih kartica Republičkom zavodu za zdravstvenu zaštitu i Regionalnim zavodima za zdravstvenu zaštitu, analizirano je prosječno kretanje virusnih hepatitisa u SR Bosni i Hercegovini i preko *Izvještaja o kretanju zaraznih bolesti u SFRJ* kretanje iste bolesti na području cijele naše zemlje.

Pomoću izvršenih anketa ispitana je epidemiologija virusnog hepatitisa A, tipa B, kretanje zdravih nosilaca HB_sAg i kretanje nediferenciranih oblika hepatitisa. Posebno su utvrđene »ugrožene grupe« na mogućnost infekcije od virusnih hepatita i određeni su kriteriji za serološku dijagnozu ovih oboljenja. Doneseni su zatim principi *Programa za sprovođenje borbe protiv virusnih hepatitisa* i na kraju je utvrđena naša strategija borbe za preventivne i protivepidemijske mjere protiv virusnog hepatitisa.

REZULTATI RADA

Kao što se vidi iz tabela 1 i 2, na području SFRJ posljednjih deset godina obolijeva između 18.375 lica (1989. g.) i 34.063 (1983. g.). Poslije 1984. godine broj oboljenja od virusnog hepatitisa se postepeno smanjuje.

U periodu između 1978. do 1987. godine najveći prosječni morbiditet registrovan je u SR Makedoniji 209,66 0/0000; zatim u SR BiH 163,70 0/0000; u Crnoj Gori 132,70 0/0000; u SAP Kosovo 124,92 0/0000; u SR Srbiji van pokrajina 112,98 0/0000. Stopa morbiditeta registrovanih slučajeva virusnog hepatitisa ispod 100,0 0/0000 registrovana je u SR Hrvatskoj 95,10 0/0000; u SAP Vojvodini 84,25 0/0000 i SR Sloveniji 61,81 0/0000. U uslovima daleko bolje higijenske vodoopskrbe, higijenske dispozicije otpadnih materija, higijenske ishrane i drugih uslova opšte i lične higijene morbiditet od virusnih hepatitisa može biti mnogo manji. To se vidi iz priloženih podataka CDC (USA-Atlanta) po kojima je u USA 1975. godine morbiditet od virusnog hepatitisa bio 24,25 0/0000; 1983. g. 24,12 0/0000, a u periodu između 1966. i 1983. godine 17,56 0/0000 (minimalni u 1966. godini; a 33,64 0/0000 u 1971. godini).

Nijedna republika u našoj zemlji, osim u 1989. godini, nije imala morbiditet ispod 50,0 0/0000. Nerazvijena zdravstvena služba, naročito laboratorijska dijagnostika, ne otkriva kod nas veći broj oboljenja virusnih hepatitisa, posebno lake i inaparentne slučajeve.

Tabela 1. PRIJAVLJENI SLUČAJEVI OBOLJELIH OD VIRUSNIH HEPATITISA ZA PERIOD 1979—1989. GODINE U SFRJ

	1979	1980	1981	1982	1983	1984	1985	1986	1987	1988	1989
SFR Jugoslavija	27994	33917	32627	28123	34063	27939	20457	22643	23105	24000	18375
Bosna i Herceg.	8076	9848	7349	6525	8077	6360	4069	6031	5638	6542	4544
Crna Gora	1037	692	576	767	875	963	735	924	583	796	597
Hrvatska	4474	4886	5272	4601	4337	4716	3911	3959	4394	3424	1924
Makedonija	3362	5309	6150	4829	5618	3977	3297	2429	2734	4598	3364
Slovenija	1174	1254	1029	895	1288	1355	872	1018	1263	968	1267
Srbija	9871	11298	12251	10506	13868	10568	7573	8282	8493	7672	6679
Srbija bez podat. za SAP	6452	8493	8247	6570	8552	6325	4251	4779	5306	4666	4167
Kosovo	1786	1809	2322	1956	2212	2433	1979	2349	2005	1943	1628
Vojvodina	1633	1626	1682	1980	3104	1810	1343	1154	1182	1063	884

ANU BiH AHV Бих

Taebla 2. MORBIDITET OD VIRUSINH HEPATITISA ZA PERIOD 1979—1980. U SFRJ ZA SFRJ, SR i SAP

Mb = 1 : 100.000

	1979	1980	1981	1982	1983	1984	1985	1986	1987	1988	1989
SFR Jugoslavija	126,28	152,06	145,49	124,20	149,39	121,81	88,04	96,69	96,88	100,98	76,76
Bosna i Herceg.	217,07	240,66	178,20	156,06	191,21	146,69	89,96	131,68	121,63	139,49	95,80
Crna Gora	176,06	119,51	98,69	129,34	145,83	158,81	116,66	145,05	90,38	122,28	90,73
Hrvatska	97,23	106,37	114,58	99,52	93,63	99,95	83,89	84,66	93,70	72,73	40,82
Makedonija	180,46	280,45	322,15	248,66	285,61	203,76	160,59	116,77	129,81	215,57	155,89
Slovenija	64,36	66,52	54,38	46,98	67,32	67,95	46,48	54,00	53,51	48,53	66,20
Srbija	108,36	128,78	131,53	111,78	146,53	112,67	79,78	86,64	88,25	79,20	68,50
Srbija bez podat. za SAP	116,65	149,60	144,83	114,81	148,88	112,40	75,30	84,41	93,46	81,99	73,06
Kosovo	114,04	116,48	146,59	119,63	131,90	140,69	108,97	126,08	104,97	99,24	81,11
Vojvodina	81,16	80,01	82,65	97,01	151,93	89,88	66,12	56,73	58,05	52,14	43,32

ANU BiH АНУ БиХ

Prema nekim autorima, izgleda da treba računati da hepatitisa tipa B ima oko 20—30% od ukupno registrovanih kod nas slučajeva hepatitisa. Prema podacima iz 1989. godine, od ukupno registrovanih virusnih hepatitisa u SRBiH (4.544 oboljelih) bilo je 318 slučajeva hepatitisa B, ili 6,99% od ukupno registrovanih oboljenja.

Iako se tipovi virusnih hepatitisa prijavljuju od 1978. godine odvojeno kao hepatitis tipa A, tipa B i nediferencirani oblici, to do danas još nije postigla naša zdravstvena služba, jer se tipovi uglavnom dijagnosticiraju prema epidemiološkim podacima ili rijetko i laobratorijski, bar 20% od ovih oboljelih (vidi tab. br. 4).

Poslije do sada u SR BiH najvišeg epidemijskog vrha 1966. godine, bilo je epidemija virusnog hepatitisa u 1975, 1980. i u 1983. godini.

Tabela 3. BROJ OBOLJELIH OD VIRUSNIH HEPATITISA I MORBIDITET NA 100.000 STANOVNIKA — BROJ UMRLIH I LETALITET U SFRJ ZA PERIOD 1979—1989. GODINE

Godina	Broj prijavlj. slučajeva obolelih	MB na 100.000 stanovnika	Broj prijavlj. slučajeva umrlih	Letalitet
1979.	27.994	126,60	20	0,1
1980.	33.917	152,10	20	0,1
1981.	32.627	146,00	22	0,1
1982.	28.123	125,20	12	0,04
1983.	34.063	151,60	15	0,04
1984.	27.972	121,20	15	0,05
1985.	20.457	88,00	8	0,03
1986.	22.643	96,69	19	0,08
1987.	22.856	96,88	22	0,10
1988.	24.000	100,98	14	0,06
1989.	18.375	76,76	13	0,05

U periodu između 1978. i 1987. godine najviše je umrlih na teritoriji SAP Kosovo (29,94%), što čini gotovo trećinu svih umrlih u našoj zemlji. Treba istaći da se u SAP Vojvodini od ukupno 15 umrlih u tom periodu 14, ili 93,3%, a na području Srbije od 50 umrlih 24 (48,00%) odnosi na hepatitis tipa B.

Nije još poznato koliko je u našoj zemlji umrlih od ciroze jetre i od karcinoma jetre kao posljedice infekcije virusnog hepatita tipa B, C i D.

Tabela 4. TIPOVI VIRUSNOG HEPATITISA ZA 1989. GODINU U SFRJ I MORBIDITET NA 100.000 STANOVNIKA

Mb = Morbiditet na 100.000 stanovnika
Br = Broj oboljelih
( ) = Broj umrlih

Tipovi virusnog hepatitisa	SFRJ		SR BiH		SR Crna Gora		SR Hrvatska		SR Makedonija		SR Slovenija		SR Srbija							
													Svega		Uža Srbija		SAP Kosovo		SAP Vojvodina	
	Br	Mb	Br	Mb	Br	Mb	Br	Mb	Br	Mb	Br	Mb	Br	Mb	Br	Mb	Br	Mb	Br	Mb
A	11603	48,47 (2)	4213	88,83 (1)	5	0,76 (Ø)	1044	22,15 (Ø)	2519	116,72 (Ø)	1089	54,90 (Ø)	2733	28,03 (Ø)	2063	36,57 (Ø)	31	1,54 (Ø)	619	31,91 (Ø)
B	1807	7,55 (8)	318	6,70 (2)	6	0,91 (Ø)	161	2,42 (2)	252	19,60 (Ø)	105	5,49 (Ø)	965	3,90 (4)	739	12,96 (2)	12	0,66 (2)	214	10,49 (Ø)
Hepatitis virosa non identifikata	4965	20,74 (3)	13	0,27 (Ø)	586	89,05 (Ø)	719	15,2 (Ø)	593	27,48 (Ø)	73	3,81 (Ø)	2981	30,54 (3)	1365	23,94 (Ø)	585	78,97 (3)	31	1,52 (Ø)

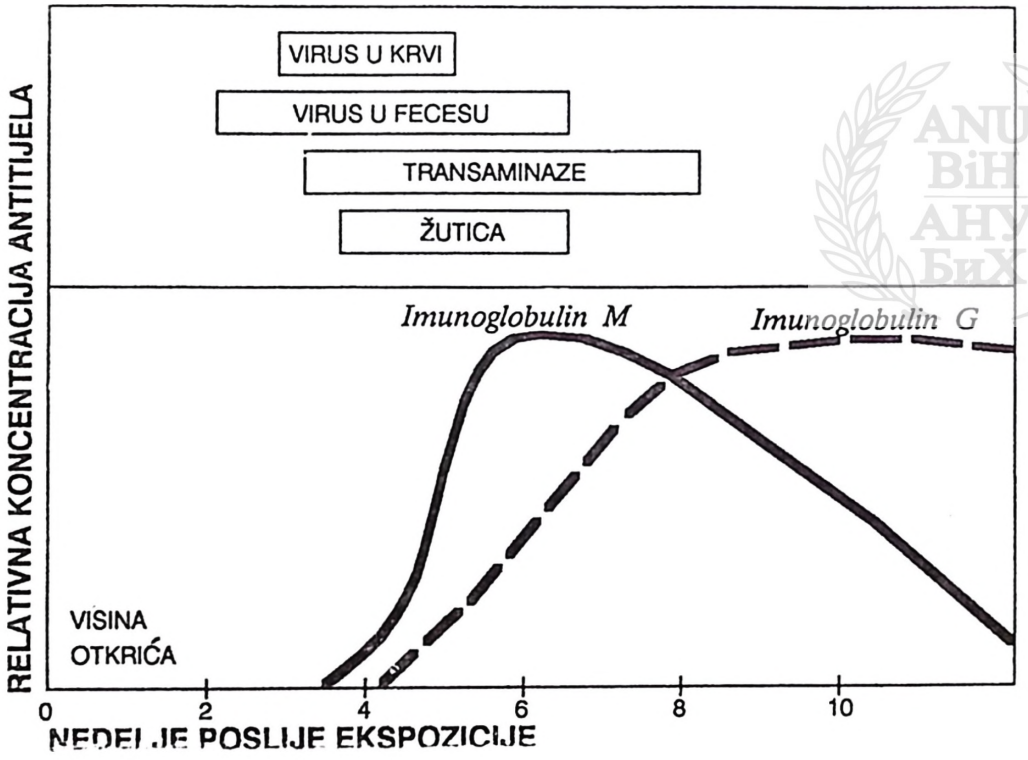
ANU BiH АНУ БиХ

U toku 1971—1982. godine u sedam regiona SRBiH prikupljeno je 373 ljudska seruma metodom slučajnog izbora. Za laboratorijsku dijagnozu upotrijebljena je RIA metoda (AusRIA II). Tada je utvrđeno 73,19% anti-HAV pozitivnih lica. Porastom dobne skupine prevalencija anti-HAV je rasla do 50. godine života, kada je nivo dostigao 94,64% pozitivnih. Veći procenat iznosio je u selima (90,5% pozitivnih) nego u gradovima (60,28%) /—X^2 = 42,65; p = 0,01/. Između muških i ženskih lica nije utvrđena signifikantna razlika.

Szmuness i saradnici su utvrdili na 100 pregledanih seruma zdravih lica iz SR BiH starih preko 18 godina 97,0% anti-HAV pozitivnih lica 4, 5).

Oboljela lica od virusnog hepatitisa tipa A u SR BiH su mahom djeca do 6 godina života, a zatim školska djeca.

Grafikon 1.
HRONOLOGIJA KLINIČKIH I LABORATORIJSKIH OBLIKA HEPATITISA A



Muslimansko stanovništvo, zbog posebnih etničkih karakteristika života (česte posjete bolesnicima, obavezno uzimanje hrane u kući bolesnika, posebno kafe, kontaminacije ruku poslije nužde, posebno u selima, i drugi faktori) tri puta češće obolijeva od virusnog hepatitisa tipa A nego ostalo stanovništvo.

Među najčešćim faktorima transmisije u SR BiH najčešći je kontakt oboljelog sa zdravim licem, upotreba zagađene vode, kontaminirana hrana, infekcije u školi i zajedničko spavanje djece pod jednim pokrivačem.

U gradovima češće su obolijevala djeca koja idu u školu. U seoskim porodicama sekundarni slučajevi oboljenja su bili češći nego u gradskim.

Dovoljno vlastitog iskustva sa upotrebom gamaglobulina nemamo, jer se naša epidemiološka služba najčešće pojavljivala kasno na terenu kada su utvrđeni još neki novi slučajevi hepatitisa tipa A ili je prošlo više dana od početka bolesti prvog slučaja, pa se smatralo da ovo, inače efikasno, ali i skupo sredstvo prevencije, nije korisno ako se ne daje u početku bolesti hepatita tipa A.

Danas postoje komercijalni kitovi za otkrivanje IgM antitijela (akutno oboljenje) i za totalna antitijela prema hepatitis A virusu (HAV). Četverostruki i veći porast titra antitijela u parnim serumima govore za ovo oboljenje (6).

Danas se najviše upotrebljava RIA ili ELISA test. Danas postoje komercijalni kitovi za laboratorijsku dijagnostiku hepatitisa tipa A (grafikon 1).

Preventivne mjere protiv virusnog hepatitisa A

— edukacija za ličnu higijenu, posebno ruku i higijenska sanitacija (zahodi, vodni objekti, okolina kuća, smetljišta, đubrišta, eradikacija muha i drugo u cilju da se izbjegne kontaminacija hrane i vode);

— u školama i predškolskim ustanovama (obdanište, jaslice i drugo) mogućnost fekalno-oralne infekcije, naročito pranjem ruku prije i poslije obavljanja nužde.

Unutar dvije nedjelje poslije ekspozicije dati IG svim kontaktima među učenicima i djeci;

— naročitu pažnju posvetiti IgM pozitivnim kontaktima i ostalim članovima porodice i njihove okoline, među kojima treba tražiti asimptomne izvore zaraze. Odvraćati od kućnih posjeta bolesnicima, a naročito u tim porodicama od uzimanja kafe i hrane i čuvati se drugih vrsta ekspozicije;

— putnicima koji putuju u visoko endemična područja za virusni hepatitis tipa A preporučiti davanje IG (0,02 do 0,04 ml/kg/tjelesne težine ili 2,0 ml za odrasle). Ako ekspozicija traje do dva mjeseca dovoljna je jedna doza, a ako traje duže daje se 0,06 ml/kg tjelesne težine, odnosno 5 ml za odrasle, što se ponavlja svakih 4—6 mjeseci;

— obezbijediti šprice i igle za jednokratnu upotrebu kao i upotrebljavati sterilni pribor koji služi za bušenje ušiju, tetoviranje kože i drugih manipulacija;

— vakcinacija protiv virusnog hepatitisa tipa A još uvijek se nalazi u fazi ispitivanja, ali ne i u upotrebi.

U protivepidemijskim mjerama naročito se primjenjuju: prijava oboljenja, anketiranje, tekuća dezinfekcija, pasivno-aktivna seroprofilaksa zdravih kontakata i to prema posebnim indikacijama. Izolacija bolesnika u bolnici nije neophodna. Kućna izolacija vrši se u toku dvije nedjelje od početka ili jednu nedjelju poslije pojave žutice.

VIRUSNI HEPATITIS B I ZDRAVO KLICONOŠTVO HB_sAg

Poznato je da je među stanovništvom određenih zanimanja povećan broj oboljelih od hepatitisa tipa B, a naročito broj zdravih nosilaca ovog tipa hepatitisa. Poznato je i to da je u područjima sa niskom ličnom i opštom higijenom i neriješenim pitanjem sanitacije broj ovih oboljenja daleko veći.

Osnovni put širenja virusnog hepatitisa tipa B je peranteralni i to kontaminiranom krvlju i njenim produktima, transfuzijom krvi, iglama kontaminiranim krvlju (narkomani) i prenos virusnog hepatitisa B od inficirane majke na novorođenče.

Među najugroženijim grupama u SFRJ i SR BiH su zdravstveni radnici, bolesnici i osoblje u institucijama za mentalno zaostala lica, homoseksualci, parenteralni narkomani, prostitutke, osoblje i bolesnici u ustanovama za hemodijalizu, transplantaciju tkiva i organa, članovi porodica nosilaca HB_sAg, osoblje i bolesnici na odjeljenjima za liječenje malignih oboljenja, kao i lica koja se liječe akupunkturom.

Osim seksualnog kontakta zdravih nosilaca HB_sAg, vrlo važnu ulogu igra tzv. »vertikalna transmisija«, što znači prenošenje HBV infekcije sa majke na novorođenu djecu i to u toku trudnoće, porođaja i poslije toga. Treba istaći da je vjerovatnoća tog prenošenja veća ukoliko je trudnica bolovala od manifestnog oblika hepatitisa B, a posebno ako je infekcija nastala od trećeg mjeseca trudnoće. Nije rijetko da do infekcije sa HBV nastupi pri endoskopskim pregledima, tetoviranju, cirkumciziji i dosta rijetko upotreboom tuđih četkica za brijanje, četkica za zube i tuđih aparata za brijanje. Smatra se da nosioca HB_sAg ima u USA oko 0,1 do 0,5% od ukupnog stanovništva, a u higijenski zaostalim područjima svijeta 0,1 do 20,0%, a često još više u tropskim područjima (7).

Uvidjelo se da postavljanje dijagnoze oboljenja od hepatitisa B najčešće nije dovoljno na osnovu epidemioloških i kliničnih karakteristika kao što to često naši ljekari primarne zdravstvene zaštite čine na terenu.

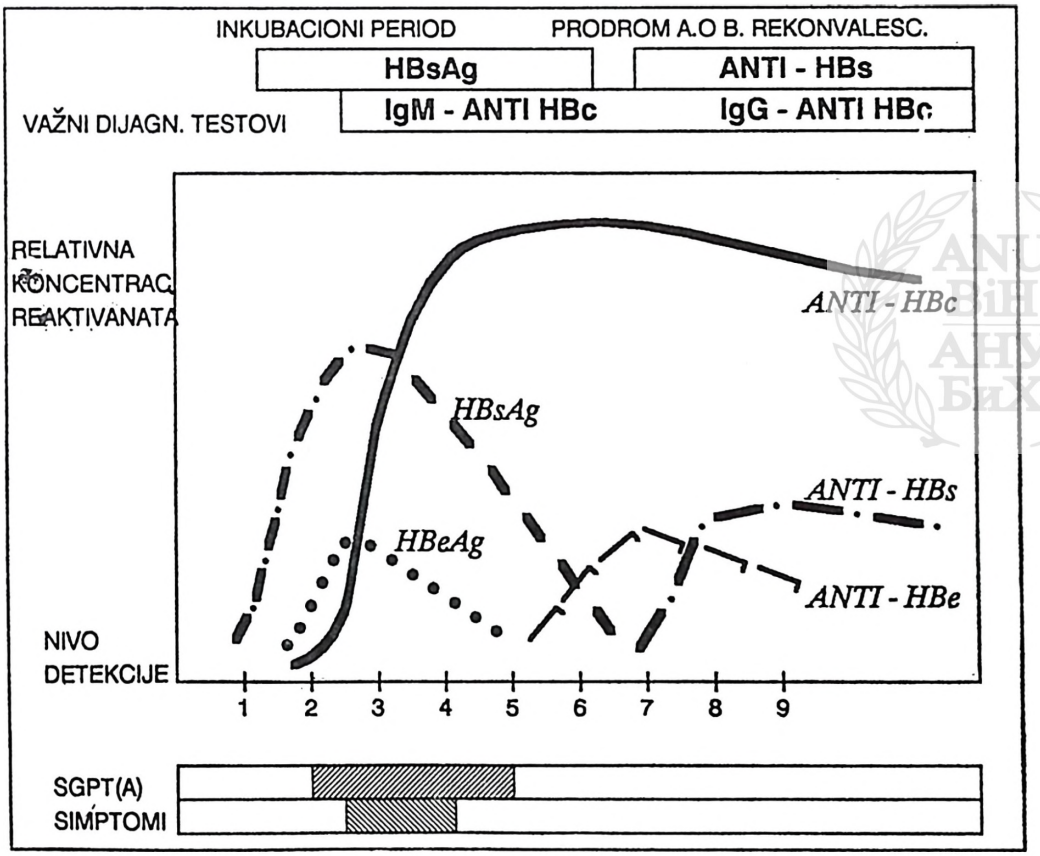
Danas se za sigurnu dijagnozu traže RIA i EIA testovi, za koje postoje komercijalni kitovi (HB_sAg i anti HB_s, anti HBe, HBeAg i anti-HBc).

HB_sAg može se otkriti u krvi nekoliko nedjelja prije početka simptoma bolesti do nekoliko dana, nedjelja ili mjeseci poslije početka bolesti. On perzistira i u hroničnoj infekciji.

IgM anti-HBe javlja se u visokom titru na početku akutne faze bolesti i obično nestaje unutar šest mjeseci poslije toga. Ovaj test se smatra pouzdanim za dijagnozu akutne infekcije B virusnog hepatitisa.

Naši kriteriji za dijagnozu HB virusne infekcije bili su slijedeći: bolest sa postepenim početkom, žutica ili povećani nivo aminotransferaze (2—3 puta iznad normalnog nivoa), HBsAg pozitivan nalaz za IgM anti-HAV negativnim ili ako nije rađen. Broj oboljelih od HBV vidi se iz tabele br. 1. i br. 2. Kod nas se tačno ne zna koji je odnos između registrovanih slučajeva hepatitisa tipa A i B. Smatra se da je to oko 15% do 20% od svih tipova koji se kod nas prijavljuju (vidi sl. br. 2 i graf. br. 2).

Grafikon 2.
HRONOLOGIJA KLINIČKIH I LABORATORIJSKIH OBLIKA HEPATITISA B



U USA od 1966. do 1976. godine broj registrovanih hepatitisa B iznosio je između 4,3% do 26,1% od svih registrovanih oboljelih. Smatra se da će još uvijek broj hepatita tipa A kod nas biit mnogo viši nego broj hepatita tipa B zbog toga što još uvijek kod nas ima mnogo djece osjetljive na ovu infekciju i zbog znatnog prisustva faktora koji

omogućuju fekalno-oralnu transmisiju. Broj hepatitisa tipa B sigurno će se povećavati u našoj zemlji zbog još uvijek znatnije upotrebe nedovoljno sterilnih materijala, kojima se mogu oštetiti kože i sluzokoža.

Naša ispitivanja 3631 zdravog ostanovnika u Bosni i Hercegovini u periodu između 1. 9. 1977. do 1. IX 1980. pokazala su da je bilo 33, ili 0,91% pozitivnih nosilaca HB_sAg. Tada nije utvrđena signifikantna razlika između seoskog (0,91%) i gradskog stanovništva (0,90%). Ustanovljeno je da izvjesne grupe zdravstvenih radnika daleko češće obolijevaju (5,64% HB_sAg pozitivnih) nego opšta zdrava populacija, a mentalno zaostala djeca u domovima za retardiranu djecu oko 20 puta češće (14,72%).

Slična ispitivanja vršena su u šest opština sjeveroistočne Bosne. Ona su pokazala stope prevalencije zdravih nosilaca HB_sAg između 3 i 5%, anti-HB_s pozitivnih lica između 5,71% i 16,66%. U istom ispitivanju je utvrđeno da u porodicama u kojima ima rekonvalescenata poslije HBV infekcije ima više nosilaca HB_sAg nego u zdravim kontrolnim porodicama.

Broj umrlih od HBV infekcije iznosio je više od 0,5%. S obzirom da se u našoj zemlji javlja najmanje oko 20—30% od svih registrovanih slučajeva akutnih oboljenja hepatitisa B, i s obzirom da kod nas u SR BiH ima oko 3 do 5% zdravih nosilaca, smatramo da treba malo opširnije govoriti o borbi protiv ovih infekcija. U protivepidemijske mjere spadaju slijedeće: prijava oboljenja; anketiranje; tekuća dezinfekcija; vakcinacija određenih grupa stanovništva. Hospitalizacija nije potrebna radi izolacije. Zdravstveno prosvjećivanje kao protivepidemijska mjera je vrlo važno.

U razmatranjima infekcije sa HBV-om govore slijedeći serološki nalazi: HB_sAg, anti-HB_s anti HBe, i to IgG i IgM; HBeAg; anti-HBc; delta Ag i anti-delta IgM. Za delta infekciju govori delta Ag, anti-delta IgG i IgM (8) (vidi graf. br. 2):

— paziti na sterilnost instrumenata i na upotrebu šprica i igala za jednokratnu upotrebu;

— vakcinisati protiv hepatitisa B osobe koje se nalaze u »visokom riziku: infekcije, kao što su hirurzi, patolozi, ljekari opšte prakse, osoblje koje stalno ili često dolazi u dodir sa ljudskom krvlju, naročito u jedinicama za hemodijalizu, onkologiju, transfuziju, transplantaciju organa itd;

— trudnicama inficiranim HBV virusom treba preporučiti vakcinaciju novorođene djece vakcinom protiv hepatita B i HIG-om. Zbog toga za sve trudnice za koje se sumnja da bi mogle biti inficirane treba primijeniti skriniranje na HBV infekciju (promiskuitetne žene, prostitutke, narkomanke, žene koje rade u institucijama za mentalno zaostalu djecu itd.);

— nabaviti nove dijagnostičke biološke kitove za dijagnozu hepatitisa tipa C, D i E, da bi se mogle što prije sprovesti preventivne i protivepidemijske mjere, jer je poznato da C virusni hepatitis izaziva umjereni mortalitet, ali da izaziva visoki rizik za hronično oboljenje jetre i za kasnije posljedice ove bolesti, dok delta antigen daje visok mortalitet i visok rizik za kasne posljedice ove bolesti;

— ne upotrebljavati za transfuziju krvi produkte od neskriniranih lica na HBV infekciju, a isto tako ne uzimati za transfuziju krv od narkomana;

— voditi evidenciju svih lica koja su imala postransfuzioni hepatitis i voditi protokol svih lica koja su davala krv za transfuziju i koja su izazvala postransfuzioni hepatitis da bi se lakše mogao pronaći izvor infekcije.

VIRUSNI HEPATITIS C
(Non-A, Non-B hepatitis ili postransfuzioni Non-A, Non-B hepatitis ili AC)

Agens za kojeg se sumnja da izaziva ovu bolest je poznat. To je mali, između 30—50 nm velik virus, za koga se smatra da je flavi virus. Po našim anketama u SRBiH u slučajevima akutnog hepatitisa, kada je isključena infekcija hepatita tipa A, B i ostalih agenasa koji mogu da izazovu oštećenje jetre, najčešće dolazi u obzir, u slučaju transfuzije neskrinirane krvi, ovaj tip virusnog hepatitisa. Učestalost ove infekcije kod nas nije poznata, jer se u većini naših laboratorija za virusne hepatitise serološki ne ispituje na virusni hepatitis tipa C. Danas je poznato da infekcija ovim virusom može biti akutna i hronična, ali može biti i asimptomna. Dijagnoza se može laboratorijski dokazati prisustvom anti-HCV, najčešće kod hroničnih infekcija, ali i kod akutnih povećanjem anti-HCV titra između akutnog i rekonvalescentnog seruma. Ne treba zaboraviti da interval između infekcije i pojave oboljenja može biti dug.

Danas postoje za dokazivanje anti-HCV komercijalni kitovi za skriniranje davaoca krvi i bolesnika kod kojih je serološki isključena A, B i Delta infekcija i drugi agensi koji bi mogli dovesti do oštećenja jetre. Ovaj test je vrlo često pozitivan kod pacijenata sa hroničnim hepatitisom. Treba naglasiti da između dana infekcije ovim virusom može proći više dana do pojave bolesti. Hronični hepatitis C može često dovesti do ciroze jetre. Nekada se ovo oboljenje ipak klinički poboljšava poslije 2—3 godine. Mjere borbe protiv ove vrste hepatitisa su iste ili vrlo slične kao i protiv hepatitisa tipa B. Vakcina protiv hepatitisa tipa B nije efikasna u borbi protiv hepatitisa tipa C (9, 10).

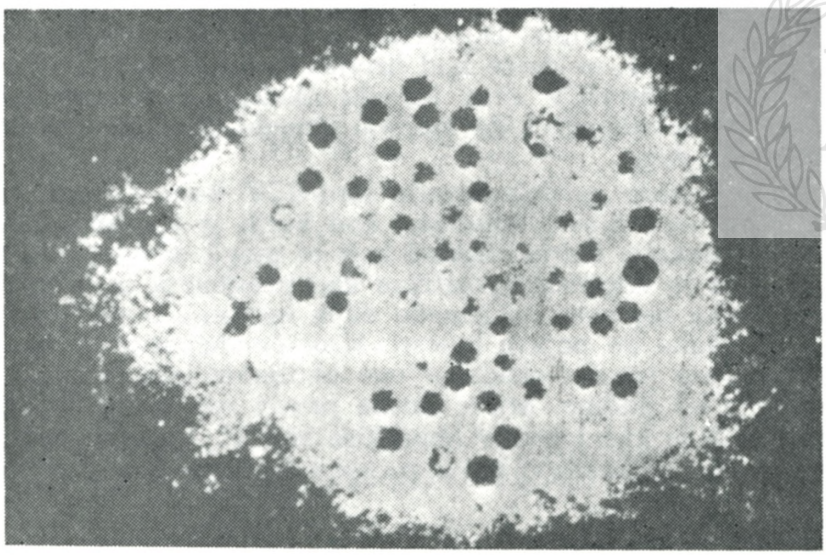
VIRUSNI DELTA HEPATITIS
(Virusni hepatitis D; hepatitis delta; Delta agens hepatitis)

Ovaj RNA virus je veličine 35—37 nm, opisan od dr Rizzetto, javlja se u krvi, plazmi, mokraći i u drugim izlučevinama infiricanog organizma, i to samo u prisustvu (koinfekcija) sa HBV-om ili kao superinfekcije, jer se ne može sam bez HBV-a replicirati u ćeliji. Prema tome način transmisije ovog virusa isti je kao i za virus HBV, ali je najčešća među narkomanima i licima koji boluju od hemofilije. Ova

vrsta hepatita javlja se svuda u svijetu, ali najviše u područjima u kojima vlada visoka stopa HBV-infekcije. Ovo oboljenje se često javlja u Južnoj Italiji, Africi, Americi, kod hemofiličara, narkomana i sa licima koja dolaze često u dodir sa ljudskom krvlju i sa ostalim licima »visoko rizičnim« na infekcije sa HBV-om. Treba napomenuti da oko 25—50% fulminantnih hepatita, posebno kod narkomana, nastaje kombinacijom infekcije HBV i hepatitis D virusa.

Serološka dijagnoza je moguća pomoću RIA i ELISA testom. U visoko razvijenim laboratorijama virus RNA može se otkriti hibridizacijom nukleinske kiseline (slika Delta antigena).

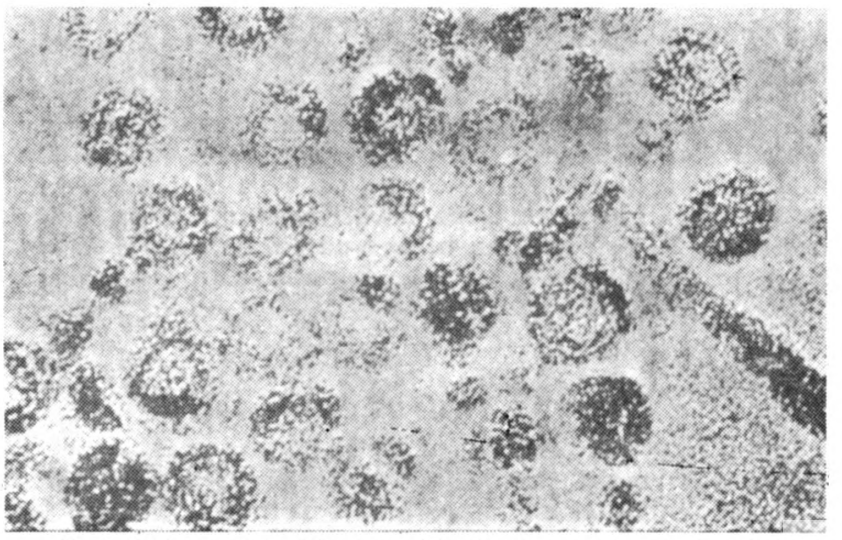
P.D. Ungar u svojoj doktorskoj disertaciji o Delta infekciji tvrdi da je Delta antigenom prokuženost naše populacije značajna. Ona je kod 868 ispitanika sa područja grada i sarajevskog sreza i kod 25 ispitanika van sarajevskog regiona utvrdila 43, ili 3,33% anti-Delta pozitivnih lica, a na području Hercegovine od 67 pregledanih lica utvrdila kod 13 ili 22,80% anti-Delta pozitivne (doktorska disertacija, Sarajevo, 1990).



Sl. 1. Hepatitis — D virus: imunoelektronsko-mikroskopska slika

Među serumima iz bolničkih odjeljenja najviše je bilo pozitivnih iz Mostara. Prema ovom autoru, Delta antigen je raširenji među zdravim nosiocima u Hercegovini nego u Bosni. U njenom laboratorijski ispitanom uzorku nije bilo signifikantnih razlika po spolu, narodnosti, po zanimanju i bračnom statusu. Ovaj autor nije dokazao da je djelatnost u zdravstvu ugroženija Delta agensom od drugih zanimanja.

Mjere borbe protiv ove vrste hepatitisa iste su kao kod hepatitisa tipa B. Vakcinacija protiv hepatitisa tipa B i upotreba HBIG i IG nije efikasna protiv ove vrste hepatitisa.



Sl. 2. Elektronska slika hepatitis B virusa (Danova čestica)

Danas još nema mogućnosti da se spriječi infekcija HBsAg-nosioca Delta antigenom prije ili poslije ekspozicije (16).

ANU ВіН АНУ БиХ

VIRUSNI HEPATITIS E

(enteralnim putem prenosiv Non-A, Non-B hepatitis, epidemični Non-A, Non-B hepatitis; fekalno-oralni Non-A, Non-B hepatitis)

Ovo oboljenje je klinički i epidemiološki vrlo slično hepatitisu tipa A. Danas je utvrđen serološki test za dokaz infekcije ovim virusom pomoću imunoelektronske mikroskopije (IEM).

U ranim fazama oboljenja u stolici oboljelih dokazane su pomoću imuno elektronske mikroskopije virusne partikule velike oko 32 do 34 nm. Kod pacijenata Non-A, Non-B hepatitis infekcijom ekstrakt stolice uzete devet dana prije kliničke pojave bolesti ili osmog dana poslije dat je dobrovoljcima oralnim putem. Pomoću elektronske imune mikroskopije otkrivena su antitijela, ali ne i antitijela IgM klase protiv A virusnog hepatitisa. Ova infekcija je prenešena na Cynomolgus macaccus majmune i na druge nehumane kičmenjake. Danas se serološka dijagnostika ove bolesti vrši metodom isključivanja hepatitisa A, B i drugih mogućih etioloških agenasa. Letalitet ove vrste hepatitisa je vrlo nizak kao i kod hepatitisa tipa A. Kod trudnica, posebno u trećem trimestru trudnoće, stopa letaliteta može biti vrlo visoka, čak i do 20%.

Ovaj virus izaziva sporadična i često epidemična oboljenja. Ove epidemije najčešće nastaju fekalnom kontaminacijom, vodom za piće i putem prenošenja bolesti sa inficirane osobe, ali i ostalim načinima

fekalno-oralne infekcije, kao i kod hepatitisa tipa A. Epidemija ove vrste Non-A, Non-B hepatitisa do sada su naročito registrovane u Sjevernoj Africi, u istočnom Sudanu, Somaliji, na Obali Slonovače i u Meksiku.

Ovo oboljenje se javlja nerijetko kod putnika u naprijed navedene i druge zemlje. Lica koja su preležala hepatitis A oboljenje, obolijevaju od ove vrste hepatitisa, što znači da nema unakrsnog imuniteta. Izgleda da je ova vrsta Non-A; Non-B hepatitisa česta u mnogim zemljama svijeta, što se potvrđuje upotrebom imune elektronske mikroskopije. Mjere borbe protiv ovog tipa hepatitisa iste su kao i kod hepatitisa tipa A, ali se ipak treba čuvati kontaminirane vode i hrane. Ne vjeruje se da IG pripremljen iz seruma zdravih davalaca može spriječiti pojavu ili ublažiti kliničku sliku hepatitisa tipa E (11, 12, 13, 14, 15).

ZAKLJUČCI

1. U našoj zemlji prosječno obolijeva nešto više od 120 lica na 100.000 stanovnika, osim u posljednje četiri godine, od kada broj oboljenja postepeno opada. Od svih republika naše zemlje, Bosna i Hercegovina je na drugom mjestu iza SR Makedonije, u kojoj boluje prosječno preko 150 lica na 100.000 stanovnika.

2. Veliki broj oboljenja čini problem virusnog hepatitisa u pogledu društveno-ekonomskog značaja vrlo važnim zdravstvenim problemom. Umiranje od virusnog hepatitisa bilo je poslije 1963. godine visoko među trudnim oboljelim ženama. U ostaloj populaciji letalitet hepatitisa tipa A iznosi ispod 0,1%, a hepatitisa tipa B nešto više od 0,4%.

3. Kliničari primjećuju da se među oboljelim licima od virusnog hepatitisa B sa progresivnim ili febricirajućim tipom zapaljenja jetre pojavljuje povećanje ciroze jetre i primarnog karcinoma.

4. Nerazvijena laboratorijska dijagnostika ne otkriva u našoj zemlji veći broj oboljenja virusnog hepatitisa, posebno lake inaparentne prirode.

5. U našoj zemlji najviše obolijevaju, a pojavljuju se i brojne epidemije, posebno među malom djecom, virusnog hepatitisa A.

6. Od 373 ljudska seruma utvrđeno je 73,19% anti-HAV pozitivnih lica. Ova vrsta hepatitisa često se javlja među školskom djecom. Među najčešćim faktorima transmisije u SR BiH, najčešće je kontakt oboljelog sa zdravim licima, upotreba zagađene vode, kontaminirane hrane i infekcija u školi.

7. Među stanovništvom određenih zanimanja u posljednje vrijeme se povećava obolijevanje od hepatitisa tipa B i broj zdravih nosilaca tog hepatitisa. U Bosni i Hercegovini osnovni tip širenja ovog tipa virusnog hepatitisa je parenteralni, i to kontaminiranom krvlju i njenim produktima, transfuzijom krvi, iglama kontaminiranim krvlju od strane narkomana i prijenos virusnog hepatitisa tipa B od inficirane majke na novorođenčad.

8. Naša ispitivanja u Bosni i Hercegovini na uzorku od 3.631 zdravog stanovnika u periodu između 1977. i 1978. godine pokazalo je da je bilo 33, ili 0,91% pozitivnih nosilaca HB_sAg.

9. Od svih registrovanih slučajeva hepatitisa u Bosni i Hercegovini je utvrđeno da virusnih hepatita tipa B ima oko 7,5 na 100.000 stanovnika (ispitano u 1989. godini).

10. U ovom radu govori se o virusnom hepatitisu B, virusnom Delta hepatitisu i virusnom hepatitisu E prema najnovijim podacima svjetske literature, jer autori nisu raspolagali ličnim iskustvom u pogledu ovih oboljenja.

11. U ovom radu se ističu glavne preventivne metode i protivepidemijske mjere u borbi protiv raznih vrsta virusnih hepatitisa.

PRILOZI

VAKCINACIJA PROTIV POJEDINIH VRSTA HEPATITISA

Mnogi ljekari nisu upoznati sa problemom vakcinacije protiv pojedinih vrsta hepatitisa. Zbog toga iznosimo ovdje podatke o ovom problemu:

Virusni hepatitis A

Vakcina za imunizaciju protiv ove bolesti, mrtva i atenuirana je u toku ispitivanja, ali se još nigdje rutinski ne upotrebljava.

Virusni hepatitis B

U USA su odobrena dva tipa inaktivirane vakcine protiv hepatitisa B koje su komercijalno dostupne. Obje ove vrste vakcine su visoko protektivne protiv svih podtipova HBV-a.

Prvi tip inaktivirane vakcine dobiva se iz plazme pozitivnih nosilaca HB_sAg.

Drugi tip sadrži podjedinice HB_sAg i dobiva se rekombinacionom tehnologijom DNA (rDNA).

Kombinovana pasivno-aktivna imunoprofilaksa protiv hepatitisa B (Hepatitis imunoglobulin ili HBIG) i upotreba vakcine stvara stimulaciju anti-HBc, kao i samo davanje vakcine.

Virusni hepatitis C (parenteralno prenosiv Non-a, Non-B hepatitis)

Izgleda da ima više tipova virusa koji izazivaju ovu vrstu hepatitisa. Danas je utvrđen jedan tip virusa, u dijametru velik između 30—50 nm, koji se smatra kao hepatitis C virus. Vrlo je vjerovatno da je to flavo-virus.

Vakcina protiv ove vrste hepatitisa još nije utvrđena i nije u prometu.

ANU BiH АНУ БиХ

Delta hepatitis (virusni hepatitis delta)

Vakcina protiv ove vrste hepatitisa još nije u upotrebi. Iako ova vrsta hepatitisa uvijek ide zajedno (koegzistira) sa prisustvom hepatitisa B virusa, vakcina protiv hepatitisa B ne štiti protiv delta hepatitisa.

Virusni hepatitis E (fekalno-oralni Non-A, Non-B hepatitis)

Smatra se da je virus hepatitisa E velik oko 32 nm u dijametru i on kao antigen daje specifične reakcije sa rekonvalescentnim serumima ovih bolesnika. Još ne postoji vakcina protiv ove vrste hepatitisa.

SEROLOŠKA DIJAGNOSTIKA VIRUSNOG HEPATITISA A

U akutnim slučajevima oboljenja IgM se može otkriti 4—6 mjeseci poslije početka bolesti. Porast titra 4 ili više puta u parnim serumima govori za ovo oboljenje.

Kitovi (RIA ili ELISA) za otkrivanje IgM antitijela mogu se nabaviti. Epidemiološkim metodom ispitivanja nije moguće razlikovati hepatitis A od hepatitisa E.

VIRUSNI HEPATITIS B

Dokaz antitijela:

Anti-HBc, anti-HBs, anti-HB-e ili dokaz HBsAg i HBeAg govore za akutni ili hronični hepatitis. Anti-HBc pojavljuje se u početku bolesti i traje u toku rekonvalescencije i kasnije. IgM anti-HBc za vrijeme akutne faze bolesti pojavljuje se u visokom titru i obično nestaje unutar šest mjeseci.

HBsAg se može pojaviti u serumu inficiranih ljudi nekoliko nedjelja prije pojave bolesti do nekoliko dana, nedjelja ili mjeseci poslije pojave bolesti. On se održava i kod hroničnih infekcija HBV-om.

Komercijalni kitovi (RIA i ELISA) mogu se nabaviti za sve navedene markere, osim za HBcAg. HBeAg u prisustvu HBsAg govori za relativno visoku infektivnost, a u prisutsvu anti-HBe za relativno nisku infektivnost (ali ne apsolutno). Prisustvo HBeAg u vrijeme rađanja trudnice govori za vrlo visoki rizik infekcije novorođenog djeteta.

VIRUSNI HEPATITIS C
(parenteralno prenošenje Non-A, Non-B hepatitis)

Treba isključiti Hepatitis B i druge agense koji oštećuju jetru.

Postoji skrining test koji se može komercijalno nabaviti kao kit za dokazivanje antitijela za ovaj virus (anti HCV). Ovaj test je pozitivan u akutnom stadiju oboljenja i u većini oboljenja sa hroničnim Hepatitis C oboljenjem.

Kod ove infekcije može postojati veliki vremenski razmak između dana ekspozicije virusa, početka pojave bolesti i otkrića anti HCV-a.

DELTA HEPATITIS

Serološka dijagnoza ove bolesti može se postići otkrivanjem totalnog ili IgM antitijela pomoću RIA ili ELISA testa. Viralna RNA u specijalnim laboratorijama može se otkriti hibridizacijom nuklearne kiseline.

VIRUSNI HEPATITIS E
(enteralno prenosivi Non A Non B hepatitis)

Treba isključiti hepatitise druge etiologije, posebno hepatitis A.

Danas postoji serološki test za jedan vrlo vjerovatno virusni agens hepatitisa E, koji se smatra osnovnim kandidatom za uzročnika ove vrste hepatitisa.

Za mogućnost upotrebe vakcine za prevenciju pojedinih vrsta hepatitisa i za serološku dijagnostiku ovih oboljenja korišten je *Control of Communicable Disases in Man* (15. izdanje Benenson A; H. A. 1990).

Izolacija ovih virusa vrši se samo u specijalnim laboratorijama za proučavanje virusnih hepatitisa. Najčešći metod se sastoji u dokazu virusa elektronskom mikroskopijom (EM) ili imunom elektronskom mikroskopijom (IEM), a u novije vrijeme metodom genetskog inženjeringa otkrivanjem viralnog DNA u krvi hibridizacijom nukleinske kiseline.

VIRAL HEPATITIS IN YUGOSLAVIA — WITH SPECIAL REVIEW OF THE SITUATION IN THE REPUBLIC OF BOSNIA AND HERZEGOVINA AND THE NEW DISCOVERIES REGARDING THIS DISEASE

Summary

During the last ten years the average occurrence in Yugoslavia was more than 120 people to 100.000 inhabitants. Within the past four years the number of cases of this desease has been declining.

Lethality rate for hepatitis A has been below 0,1%, while for hepatitis B it has been somewhat above 0,4%.

Major transmission factors of hepatitis A have been contacts made at home or at school, consumption of contaminated water or food, low degree of personnal hygiene and undevelloped habbit of washing hands.

Out of 373 blood samples taken by random technique, 73,19% was found to be the Anti-HAV positive people.

Virel hepatitis B and the number of the healthy carriers of HBsAG has been increasing lately.

It is considered that 20% to 30% of all types of hepatitis (A, B, Non-differentiated) belong to the group of non-differentiated ones.

Our studies of 3.631 healthy persons proves that there is 1,24% of HBsAG healthy carriers in the Republic of Bosnia and Herzegovina.

This paper treats the issue of new discoveries on hepatitis C, D and E, the epidemiological characteristics of these diseases, as well as diagnostic methods and control measures against the above stated types of hepatitis.

LITERATURA

(1) Savezni zavod za zdravstvenu zaštitu: *Zarazne bolesti u SFRJ od 1987. do 1989. godine.*

(2) Gaon, J., Telebak, B.: *Seroepidemical study of hepatitis B in Bosnia and Hercegovina.* Folia Med. Fak. Med. Sarav. 1984, 101—109.

(3) Gaon, J., Telebak, B.: *Attemps to Estimate the Frequency of B Type Hepatitis among the Diseases registered in Bosnia and Hercegovina as Acute Viral Hepatitis.* Folia Med. Fac. Med. Univ. Saraviensis 1979, 61—9.

(4) Szmuness, W., Dienstag, Y.: *Hepatitis A Antigen in Various Parts of the World,* Am. Journ. of Epidemiology, 1977, 5:392—97.

(5) Dienstag, J. L., Szmuness, E., Stevense, E. et al: *Hepatitis A virus Infectious: New Visibilits from Seroepidemiological Studies.* J. Inf, Dis. 1978, 137:328—40.

(6) Deinhardt, F., Gust, D.: *Viral hepatitis.* Bull. WHO, 1982, 60:661—91.

(7) Center for Disease Control: *Hepatitis Surveilance,* 1989, 22—31.

(8) *Control of Communicable Disease in Man.* 15th Edition, 1990.

(9) Choo, Q. I., Weiner, A. J., Overby, L. R., Kuo, G., Houghton, M., Bradley, D. W.: *Hepatitis C Virus: the Major Causative Agent of Viral Non A Non B Hepatitis,* British Med. Bull; 1990, 46:423—441.

(10) Zuckerman, A. J.: *Hepatitis E Virus.* Brit. Med. Journ. Vol. 300, 9 june 1990, 1475:1476.

(11) Reves, G. R., Purdey, M. A., Kim, J. P. et all.: *Isolation of a CDVA From the Virus Responsible for Enteritically Transmitted Non A, Non B Hepatitis,* Science 1990, 247:1335—9.

(12) Purcell, R. H., Tiechurst, J. R.: *Enterically Trasmitted Non A, Non B Hepatitis: Epidemiology, and Clinical Characteristics,* in: Zuckerman, A. J., ed Viral hepatitis and liver disease. New York, 1988, 131—7.

(13) *Nepal, I: Reccovery of a Possible Etiologic Agent and Transmission Studies in Marmosets.* JAMA, 1984, 252:3140—5.

(14) Navar, N. G., Panda, S. K., Dalta, R. et al.: *Etiology and Outcome of Acute Hepatitis in Pregnancy.* Journal of Gastroneterology and Hepatology, 1989, 4:345—52.

(15) Velimirović, B. et al.: *Infectious Diseases in Europe — A Fresh Look WHO,* Copenhagen, 1989.

(16) Ungar-Pavlović, D.: *Delta agens — prokuženost populacije i značaj za kliniku HBVI,* Doktorska disertacija, Sarajevo, april 1990.

PERFORMANSA IZOLOVANOG HUMANOG URETERA KAO MODEL-SISTEMA ZA ISPITIVANJA NEUROTRANSMISIJE I NJENE MODULACIJE

SEID HUKOVIĆ, SRETEN BOŠKOVIĆ, IRIS RAJMAN, NEDIM HUKOVIĆ i ELVEDINA KAPIĆ
Institut za farmakologiju i toksikologiju Medicinskog fakulteta, Sarajevo

UDC 615.017

Apstrakt. Prilikom transplantacije bubrega potrebno je nekad odsjeći komadić humanog uretera zdravog davaoca. Komadić od 1—2 cm se stavi u posudu za izolovane organe i transmuralno električki stimuliše. Registruju se kontrakcije i promjena tonusa, koje se ponavljaju više sati. Pošto se dobiju kontrolne kontracije, injiciraju se farmakološke supstance, potrebne za karakterizaciju preparacije. Acetilholin u većini slučajeva smanjuje tonus i visinu izazvane kontrakcije, dok noradrenalin povećava visinu izazvanih kontrakcija. Fizostigmin smanjuje visinu kontrakcija, a kod nekih preparacija dovodi do potpunog bloka efekta električne stimulacije. Atropin nema uticaja na visinu kontrakcija, dakle preparacija je atropin rezistentna. Morfin i aminofilin relaksiraju izolovani humani ureter i smanjuju visinu izazvanih kontrakcija. Serotonin, histamin i prostin mijenjaju efekat stimulacije. U tumačenju neuromišićne transmisije i njene modifikacije treba uzeti u obzir NANC nerve koji će izazvati relaksaciju. Mehanizam relaksirajućeg djelovanje acetilholina se tumači njegovim vezivanjem na presinaptičke muskarinske receptore, koji smanjuju oslobađanje neurotransmitora. Model-sistem izolovani humani ureter može poslužiti za ispitivanje djelovanja lijekova, i to ne samo onih koji djeluju na spastički ureter nego i drugih lijekova koji djeluju na glatkomišićne strukture genitourinarnog trakta. Isto tako može poslužiti za ispitivanja novih oblika neurotransmisije.

Ključne riječi: izolovani humani ureter, performanse, farmakološka analiza, elektrofiziologija uretera.

UVOD

Kao alternativa dosadašnjim ispitivanjima djelovanja raznih supstanci mogu se koristiti ispitivanja na izoliranim organima humanog porijekla (G r ü n z e l et al., 1988; L e m b e c k, 1988) ukoliko se ne kose sa odredbama Helsinške deklaracije iz 1975. godine. Organi humanog porijekla, ili dijelovi organa, mogu se uzeti za vrijeme operacija kao materijal koji inače hirurg odbacuje, te, umjesto da se baci, taj ma-

Ovaj rad je pomognut sredstvima Saveznog sekretarijata za razvoj, Beograd.

terijal se šalje u laboratorij za istraživanja in vitro. Ukoliko su to glatkomišićni organi, mogu se stimulirati preko vanjskih ili unutrašnjih nerava i tako poslužiti kao autoesej (Rand and Mitchel, 1986). U tom slučaju autoesej omogućava da se stimulirajući oslobađaju endogeni transmitori, a da se dodavanjem egzogenih aktivnih supstanci modifikuje ne samo električki izazvan efekat nego da se istovremeno registruje direktan efekt na glatki mišić. Na taj način se mogu dobiti informacije koje se istovremeno na drugi način ne dobivaju.

Humani ureter je vrlo rijetko zdravo tkivo koje se može dobiti od zdravog davaoca, a koje dobro funkcioniše u uslovima in vitro. Uz to, takva preparacija ima vlastitu endogenu inervaciju i glatki mišić koji dobro reaguje na električnu stimulaciju u izometrijskim uslovima registracije (Huković et al., 1990). Na takvim preparacijama su se mogle dobiti informacije o djelovanju lijekova i drugih supstanci (Hertle and Nawrath, 1985, 1989; Amann et al., 1988; Cole et al., 1988; Vereecken, 1986a, 1986b; Potenzoni et al., 1984; Bertaccini et al., 1983). Na izolovanim ureterima životinja su vršena razna ispitivanja djelovanja analgetika i kortikosteroida (Angelo-Khattar and Thulesius, 1985; 1987), te uticaj lokalnih anestetika (Bordyga and Magura, 1986).

Cilj ovog rada je da se opišu svojstva izolovanog humanog uretera koji će biti tako prepariran da se izazivaju povremene kontracije, i da se na njemu ispitaju efekti endogenih i egzogenih supstanci i njihovih kombinacija. Cilj je da se opišu i registruju fenomeni povećanja kontrakcija, tonus uretera, dakle modulacija normalne transmisije. Zadatak je da se poslije transplantacije bubrega dobiveni komadić uretera stavi u pogodne uslove in vitro i da se izvrši elektrofiziološka i farmakološka evaluacija novog model-sistema, te da se ustanove performance izolovanog humanog uretera.

METODE

Prilikom transplantacije je potrebno ureter davaoca skratiti da se bez previjanja implantira u mokraćni mjehur primaoca. Tom prilikom preostane komadić normalnog zdravog humanog uretera kojeg hirurg odstranjuje. Ovako odstranjen dio uretera se može poslati u laboratorij za ispitivanja kao izolovani organ humanog porijekla, a da se ne prekrši nikakva deontološka norma. Takav komadić uretera se dobiva iz Instituta za transplantaciju u Sarajevu, na čemu smo zahvalni. Duljina uretera koja se dobije je različita, a u posudu za izolirane organe se stavi komadić od 2—3 cm. Obično ureter dođe u laboratorij oko 14 sati, stavi se u Tyrodeovu otopinu i oksigenizira na sobnoj temperaturi do narednog početka radnog dana. Ukoliko organ dođe ranije, onda se montira u posudu za izolirane organe u Tyrodeovu otopinu na temp. od 32°C, oksigenizira i njima se počinje raditi sutradan na početku radnog dana. Organ se optereti silom od 2 g i bubrežnim krajem veže na izometrijski transducer. U međuvremenu se ispire posuda nekoliko puta. Elektroda je od platine i jedna se uvlači u lumen, a druga je u posudi

izvan organa. Parametri električnog stimulansa su 20 mA, 20 Hz, 1 m/sec., a ponavljaju se svakog minuta u trajanju od jedne sekunde.

Upotrijebljene supstance se injiciraju u volumenu od 0,2 ml Tyrodeove otopine. Supstance su bile: acetilholin hlorid, fizostigmin hlorid, noradrenalin hlorid, histamin hlorid, hydroksitriptamin kreatinin sulafat, prostin, morfin hlorid i aminofilin. Prvo se izazove desetak normalnih kontrakcija, iza čega se injicira ispitivana supstanca. Supstanca se ostavi u posudi za izolovane organe 6—10 minuta, a onda se posuda ispire i čeka povratak na kontrolne vrijednosti tonusa i kontrakcija. Analizira se promjena visine bazalnih linija i izazvanih kontrakcija, uspoređujući rezultate prije i poslije davanja ispitivanih supstanci. Mjere se promjene tonusa i visine izazvanih kontrakcija, te se na osnovu promjena izvode zaključci o performancama preparacije i djelovanja ispitivanih supstanci.

REZULTATI

Uticaj električne stimulacije

Električna stimulacija endogenih nerava humanog uretera izaziva kontrakcije izolovanog uretera. Konstantni električni stimulansi u konstantnim vremenskim intervalima (svake minute), će izazvati ravnomjerne kontrakcije, koje se mogu registrovati izometrijski ili izotonički. Ravnomjernije su izazvane kontrakcije registrovane izometrijski. Opadanje visine uzastopno izazvanih kontrakcija je manje od 2%. Nakon određenog vremena, nakon 100 do 150 uzastopnih kontrakcija, ovisno od preparacije, počinju da ispadaju pojedine kontrakcije, ili se počinju pojavljivati prevremene kontrakcije. Ovo je vjerovatno posljedica polarizacije elektroda. Promjena parametara električne stimulacije mijenja visinu izazvane kontrakcije, mada u uskim granicama, tako da izolovani ureter reagira približno po principu »sve ili ništa«. Ukoliko se skraćuje interval između dvije stimulacije, onda visina izazvanih kontrakcija mnogo brže opada nego kada se upotrebljava optimalna stimulacija: 20 Hz, 20 mA, 1 m/sek., svake minute u trajanju od jedne sekunde.

Uticaj holinergičkih supstanci, ostalih agonista i antagonista

Acetilholin u koncentraciji 10^{-5} mola/1 će smanjivati efekat stimulacije nerava, tj. smanjuje visinu izazvanih kontrakcija. Smanjenje ovisi od koncentracije acetilholina. U 1/10 eksperimenta acetilholin će povećati efekt stimulacije do određene koncentracije, iza čega će ponovo doći do smanjenja. Acetilholin neće nikada potpuno blokirati efekt stimulacije.

Fizostigmin, poznati parasimpatomimetik i inhibitor holinesteraze će, ovisno od koncentracije, smanjivati visinu izazvanih kontrakcija, pa će u pojedinim slučajevima dovesti do potpunog bloka efekta stimulacije.

Atropin u dozi od 10^{-5} do 10^{-4} mola/1 nema značajan uticaj na visinu izazvanih kontrakcija. Radi se o rezistenciji prema atropinu. Injiciranje većih koncentracija acetilholina kada je organ atropiniziran također bitno ne mijenja efekt stimulacije unutrašnjih motornih nerava.

Uticaj adrenergika, serotonina, histamina i prostaglandina

Noradrenalin u koncentraciji između 10^{-6} i 10^{-5} mola/1 povećava visinu izazvanih kontrakcija humanog izoliranog uretera. Nakon ispiranja efekt stimulacija se brzo vraća na početne vrijednosti. Odnos između doze i reakcije ustanovljen je tek u malim granicama. Pod uticajem noradrenalina je uglavnom povećana visina izometrijskih kontrakcija, dok tonus obično nije promijenjen.

Serotonin u koncentraciji 10^{-5} mola/1 povećava visinu izazvanih kontrakcija i tonus. Uticaj serotonina se može dobro registrovati i postoji odnos između doze i reakcije.

Histamin u koncentracijama od 10^{-6} do 10^{-5} mola/1 smanjuje visinu izazvani hkontrakcija i tonus izolovanog humanog uretera. Prostin (PGE_2) u koncentraciji 10^{-6} mola/1 sasvim lagano smanjuje visinu izazvanih kontrakcija.

Uticaj aminofilina i morfija

Aminofilin u koncentraciji 10^{-5} mola/1 znatno smanjuje visinu izazvanih kontrakcija i tonus izolovanog humanog uretera. Nakon ispiranja visina, kontrakcija se sporo vraća na kontrolne vrijednosti. Morfin hidrohlorid u koncentraciji 10^{-6} mola/1 također smanjuje visinu izazvanih kontrakcija.

DISKUSIJA

Dio izolovanog humanog uretera se može dobiti od zdravog davaoca tokom transplatacije bubrega. Obično se dobije komadić uretera veličine 3—5 cm ako je potrebno skratiti ureter prilikom ušivanja u mokraćni mjehur primaoca. Ureter se skraćuje ako je previše dug i prijeti opasnost od savijanja i posljedičnog začepljenja. Taj dio uretera se inače odbacuje nakon operacije. Zbog toga se upotreba izolovanog humanog uretera ne može smatrati bilo kakvim deontološko-etičkim prekršajem.

Reakcije izolovanog humanog uretera na električne stimulacije su očekivane. Radi se o kontrakciji glatkomišićnog organa pod uticajem stimulacije endogenih motornih nerava. Kontrakcije su snažne i mogu se ponavljati 100—200 puta, nakon čega će nastupiti zamor organa. Reakcije su po tipu »sve ili ništa«, što je slično reakciji pieloureteralne i srčane muskulature (Vereecken and Das, 1986). Ispiranje organa ili mali mehanički pomaci mogu izazvati kontrakciju, što znači da se lako mijenja polaritet na elektrodi, unutar organa ili na njegovoj površini.

Uticaj najvažnijih neurotransmitora u perifernom nervnom sistermu: acetilholina i naradrenalina je bio poseban i neočekivan. Očekivalo se da će acetilholin povećavati visinu izazvanih kontrakcija i tonus organa, ali se dogodilo suprotno. Acetilholin je u zavisnosti od koncentracije smanjivao efekt stimulacije nerava i smanjivao visinu izazvanih kontrakcija na polovinu vrijednosti kontrolnih kontrakcija. Acetilholin u prisustvu atropina nije bitno mijenjao visinu kontrakcija niti tonus organa. U humanom ureteru je nađena bogata holinergička, a siromašna andrenergička inervacija. Nađeni su isto tako peptidergički nervi sa neurtransmitorem VIP-om, za kojeg se pretpostavlja da je modulator (K u l e n d o r f f et al., 1987). Drugi endogeni aktivni peptidi (SP, CGRP, neurokinin A), koji su utvrđeni u ureteru, vjerovatno igraju ulogu u senzornim nervima nakon ureteralne opstrukcije (H u a et al., 1987).

Fizostigmin i atropin su imali obrnute efekte od onih koji su očekivani. Fizostigmin u nekim slučajevima dovodi do potpune blokade efekata stimulacije pripadajućeg nerva. U drugim slučajevima smanjuje efekt stimulacije, ali ga ne blokira potpuno. Atropin kod većine preparata nema efekta i samo kod nekih preparata lagano povećava tonus uz jedva vidljivo smanjivanje visine izazvanih kontrakcija; dakle radi se o atropin-rezistentnoj preparaciji slične mokraćnom mjehuru (T o m i a k et al., 1985, B r a d i n g and M o s t w i n, 1989).

Noradrenalin ne izaziva relaksaciju glatke muskulature, kako se očekivalo, nego na humanom izolovanom ureteru povećava efekt stimulacije. Ovaj rezultat je u saglasnosti sa rezultatima H e r t l e i N e w r a t h a (1985), koji pretpostavljaju da u humanom ureteru postoji neki treći tip adrenergičkih receptora. Slično noradrenalinu su djelovali histamin i serotonin, ali je ovaj posljednji djelovao nešto jače u istim ekvimolekularnim koncentracijama. Histamin predominantno djeluje preko H_1 receptora (B e r t a c c i n i et al., 1983). Aminofilin i morfijum smanjuju efekt stimulacije intrinsičkih nerava humanog uretera. PGE_2 u ovom eksperimentu blago smanjuje fazne kontrakcije inerviranog humanog uretera, mada se C o l e i S a s (1988) našli da PGE_2 i $PGF_2\alpha$ dramatično povećavaju tonične i fazičke kontrakcije. Razlika je vjerovatno u dozi.

Izolovani humani ureter se do sada nije mnogo upotrebljavao kao model-sistem za farmakološka ispitivanja na način kao što je opisan u ovom radu. Relativno rijetko su se na opisani način koristili dijelovi uretera dobijeni od eksperimentalnih životinja. Neki eksperimenti na ureteru životinja u uslovima in vitro su se sastojali od analize djelovanja lijekova na prstenove uretera. Praćena je relaksacija i spontana aktivnost. Na pomenutim prstenastim dijelovima uretera je ustanovljeno da dolazi do relaksacije i spontane aktivnosti ako se dodaju NSAID (nesteroidni antiinflamatorni lijekovi) ili ako se dodaju kortikosteroidi (A n g e l l o - K a t h a r et al., 1985, 1986). Na izolovanim ureterima manjih životinja su vršena elektrofiziološka istraživanja i ispitivanja djelovanja lokalnih anestetika (B o r d y g a and M a g u r a, 1986).

Potenzoni i sar. (1984) su na izolovanom inerviranom humanom ureteru ispitivali nove relaksatore glatke muskulature i pokazali da je novi muskulotropni spazmolitik Rociverin spazmolitik ureteralne glatke muskulature.

Za tumačenje djelovanja acetilholina u smislu inhibicije moguća su tri objašnjenja. Prvo, moguće je da se radi o mehaničkom prividno relaksantnom djelovanju, a u stvari se kontrahuju spiralne niti pa se dobije krajnji efekt kao da se radi o relaksaciji, a u pitanju je kontrakcija spiralnih niti. Ova mogućnost nije vjerovatna jer nema uvrtanja organa. Druga je mogućnost da acetilholin i noradrenalin nisu transmitori na ovom organu, nego da se radi o NANC nervima. Vjerovatno na ovom organu postoje receptori za acetilholin i noradrenalin, ali ima i drugih neurotransmitora i neuromodulatora, te je rezultanta djelovanja onakva kakva je prikazana u ovom radu. To znači da acetilholin smanjuje, a noradrenalin povećava efekt stimulacije. Treće i najvjerovatnije objašnjenje je da je ekstrinzički acetilholin, budući da se daje u nešto većim dozama da bi se registrovao njegov efekt, djelovao presinaptički i tako smanjio oslobađanje endogenog acetilholina. Prema Viziu i Somogyu (1989), neočekivano djelovanje acetilholina je posljedica negativne muskarinske »feed-back« modulacije. Danas se mehanizam djelovanja tumači i djelovanjem na kalcijumove kanale i fluks kalcijevih jona. Kalcijev agonist Bay K 8644 povećava amplitudu ritmičke kontrakcije humanog uretera (Hertle and Nawrath, 1989). Blokatori kalcijevih kanala smanjuju spontani aktivitet izolovanog humanog uretera (Anderson and Forman, 1986).

Izolovani humani ureter je pogodan model-sistem za ispitivanje djelovanja lijekova i to ne samo onih koji će djelovati na ureter nego i na drugu glatku muskulaturu genitourinarnog trakta. Humani ureter ima sigurno drugačiju intervaciju, druge transmitore nego glatka muskulatura koja je do sada ispitivana. Zato će ispitivanja humanog uretera dati podatke o funkciji neurotransmisije.

THE PERFORMANCES OF THE ELECTRICALLY STIMULATED ISOLATED HUMAN URETER AS MODEL-SYSTEM FOR THE INVESTIGATION OF NEUROMUSCULAR TRANSMISSION

Summary

The isolated human ureter obtaine of a healthy donor after the kidney transplantation were used as a model-system. It was used for the evaluation of the effect of various substances on the neuromuscular transmission. The piece of the isolated human ureter was long 2—3 cm and was set up in an isolated organ bath in Tyrode solution. In the ureter platinium electrode was introduced and another electrode was in the organ bath. The ureter was stimulated transmurally with the constant stimula in the constant one min. intervals.

Acetylcholine usually decresed the hight of the induced contractions. Physostigmine decreased contraction and in some ureter caused block of the effect of the electrical stimulations. Atropine had no effect on the height of the contractions, so the preparation could be considered as atropine resistant organ. Noradrenaline, histamine and serotonine increased the contractions. Aminophyline and morphine decreased the contractions.

It is possible that there are unknown neurotransmitters in human ureter that induced contractions and relaxation. Isolated human ureter electrically stimulated in vitro could be used as a model-system for the pharmacological and toxicological investigations.

LITERATURA

Amman, R., Skofitsch, G., and Lembeck, F. (1988): *Naunyn Schmiedebergs*, Archiv Pharmacol, 338, 407—410.

Anderson, K. E. and Forman, A. (1986): *Effects of calcium channel blockers on urinary tract smooth muscle.* Acta Pharmacol. Toxicol. 58, Suppl. 2, p. 193—200.

Angelo-Khattar, M., Joseph, L., Nilsson, T. and Thuselius, O. (1985): *The effect of indometacin and diclofenac sodium on ureteral contractions in vivo and in vitro.* Br. J. Pharmacol. Proc. Suppl. **85,** 325 P.

Angelo-Khattar, M. and Thukesius, O. (1987): *Effect of corticosteroids, on motility of isolated ovine uretral ring.* Br. J. Pharmacol. Proc, Suppl. **91,** 320 P.

Angelo-Khattar, M., Thulesius, O. and Cherian, T. (1989): *The effect of glucocorticosteroids on in vitro motility of the ureter of the ship.* Br. J. Pharmacol. **96,** 527—530.

Bertaccini, G., Zappia, L., Bezzi, E. and Potenzoni, D. (1983): *Histamine receptors, in the human ureter.* Pharm. Res. Commun. 15, 156—166.

Brading, A. F. and Martin, W. (1989): *Electrical and mechanical responses of guina-pig bladder muscle to nerve stimulation.* Br. J. Pharmacol., **98,** 1083—1091.

Burdidyga, T. V. and Magura, I. S. (1986): *The effects of local anaesthetics on the electrical and mechanical activity of guinepig ureter.* Br. J. Pharmacol., **88,** 523—530.

Cole, R. S., Fry, C. H. and Shuttelworth, K. E. (1988): *The actions of prostaglandins on isolated ureteric smooth muscle.* Br. J. Urol. 61, 19—26.

Günzel, P. (1988): *Risk of wrong conclusions due to sample selections.* Symposia: *Alternatives to animal experiments in risk assesment.* ed. and chairmen Günzel, P. 26—27 März, 1987, Berlin.

Hertle, L. and Nawrath, H. (1985): *In vitro studies on human primary obstructed magaureter.* J. Urol. **133,** P 884—887.

Hertle, L. and Nawrath, H. (1989): *Stimulation of voltage-dependent contractions by calcium channel activator Bay K 8644 in the human upper urinary tract in vitro.* J. Urol., **141,** 1014—1018.

Hua, X. Y., Theodorsson, E., Lundberg, J. M., Kinn, A. C. et al. (1987): *Co-localisation of tachykinins and calcitonin gene-related peptide in capsaicin-sensitive afferents in realtion to motility effects on the human ureter in vitro.* Neuroscience, **23,** 693—703.

Huković, S., Bošković, S., Mulabegović, N. and Potkonjak, D. (1990): *The isolated Human urter as a model-system in pharmacology.* Acta Physiol. Pharmacol. Iug. U štampi.

Kullendorf, C. M., Elmer, M. and Alm, P. (1987): *Urinary bladder inervatin in children.,* J. Pediatr. Surg., **22,** 240—242.

Lembeck, F. (1988): *Alternativen zum Tierversuch.* Georg. Thieme Stuttgart.

Potenzoni, D., Zappia, L., Sacchini, P. and Bezzi, E. (1984): *Effect of rociverine on the human ureter: in vivo and in vitro experimental study.* Pharmacol. Res. Commun. **16,** 765—774.

Rand, M. L. and Mitchelson, F. (1986): *The guts of the matter: Contribution of studies on smooth muscle to discoveries in pharmacology.* Discoveries in Pharmacolog. **3,** 19—61.

Tomiak, R. H., Barlow, R. B. and Smith, P. J. (1985): *Are the valid reason for using anti-muscarinic drugs in the menagement of renal colic.* Br. J. Urol., **57,** 498—499.

Vereecken, R. L. and Das, J. (1986): *Contractile behaviour of the human pyelo-uretral musculature. I. Contraction frequency force relationship.* Urol. Research., **14,** 25—30.

Vereecken, R. L. and Das, J. (1986): *Contractile behaviour of the human pyelo-ureteral muschulature. II. Repetitive electrical stimulavtion effect.* Urol--Res. 14, 31—35.

Vizi, E. S. and Somogy, G. T. (1989): *Prejunctional modulation of acetylcholine release from the sceletal neuromuscular junction link between positive (nicotinic) and negative (muscarinic) feeback modulation.* Br. J. Pharmacol. **97,** 65—70.

ANU BiH АНУ БиХ

RAZRADA MORFOLOŠKIH KRITERIJA ZA DIJAGNOSTICIRANJE DISPLASTIČNIH PROMJENA U SLUZNICI DEBELOG CRIJEVA

ALEKSANDAR NIKULIN i SVJETLANA RADOVIĆ
Institut za patologiju Medicinskog fakulteta u Sarajevu

UDC 616.35

Apstrakt. Epitelna displazija u sluznici debelog crijeva je potencijalno prekancerozna promjena, čije prisustvo povećava rizik od nastanka karcinoma. Kako do sada nisu pruženi egzaktni kriteriji za dijagnosticiranje i stepenovanje displazije epitela mukoze kolona, istraživači su uvijek podvlačili postojanje subjektivne procjene njenog prisustva i intenziteta. Uvođenjem metode brojčano objektiviziranih kriterija znatno smo olakšali utvrđivanje prisustva epitelne displazije, njeno razlikovanje od upalno-regenerativnih promjena, kao što smo olakšali i procjenu jačine displastičnog procesa.

Ključne riječi: epitalna displazija, upalno-regenerativne promjene.

UVOD

Epitelna displazija u sluznici kolona danas se smatra jednim od najznačajnijih predskazivača karcinoma (6, 8, 10, 11). Skrining za epitelnu displaziju u biopsijama kolona i rektuma je dio prihvaćenog programa praćenja rizične populacije (9, 11). Rizik za nastanak karcinoma raste sa porastom jačine displastične lezije. Nalaz visokog stepena epitelne displazije u bioptičkom uzorku može biti pokazatelj, s jedne strane, individualne sklonosti ka nastanku karcinoma (10, 15), a sa druge strane, može biti indikator i njegovog postojanja u bilo kom drugom segmentu debelog crijeva (10, 15). Isto tako, njeno nepostojanje ne mora značiti i da karcinoma nema (9), kao što karcinom može postojati i bez nastanka epitelne displazije na širem području sluznice.

U dosadašnjim istraživanjima ove premaligne promjene niti jedan autor nije dao objektivizirane kriterije za dijagnosticiranje i ste-

penovanje jačine displazije epitela, nego se uvijek podvlači njena individualna procjena, čime je određivanje postojanja i jačine displazije epitela produkt impresije patologa. Određivanje stepena i prisustva displastične promjene koje se bazira na mikroskopskim kriterijima nije lišeno subjektivnosti, a time i greške u interpretaciji. Najčešće nesuglasice i nedoumice među istraživačima su u definisanju one tačke u spektru promjena koja bi predstavljala minimum promjena kakve bi patolog akceptirao kao epitelnu displaziju, a ne kao upalno-regenerativni proces. Kako su displazije laganog stepena i upalno-regenerativne promjene u sluznici veoma slične, često ih je teško razlučiti. Rađene su studije (14, 15) koje su pokazale da postoje među morfolozima impresivne razlike u verifikovanju neke promjene ili kao epitelne displazije ili kao upalno-regenerativne promjene, odnosno i u određivanju intenziteta displazije epitela.

Sa ciljem da se uvedu više objektivni kriteriji identifikacije i stepenovanja epitelne displazije, odnosno sa primarnom intencijom da se pomogne dijagnosticiranje i gradiranje ove lezije, primjenili smo metodu brojčano objektiviziranih kriterija, koja može doprinijeti zauzimanju objektivnijeg stava u utvrđivanju kako prisustva tako i stepena jačine displastične promjene u sluznici kolona koja je upalno promijenjena. Sličan pristup ovoj problematici imali smo i u morfološkom verifikovanju displazije sluznice želuca (13).

MATERIJAL I METODE

Pri endoskopskom pregledu kolona uzimani su biopsijski uzorci sluznice, najmanje 3 do 4 iz različitih segmenata crijeva na udaljenosti od 8 do 10 cm u slučajevima kada se radilo o upalno promijenjenoj sluznici bilo koje etiologije ili pak pri nalazu tumorskih lezija, kada su uzorci uzimani ne iz same lezije, nego sa mjesta koja se nalaze distalno i proksimalno od nje. Također je prikupljan materijal i iz tekućih obdukcija, kada smo makroskopskim, a zatim i mikroskopskim putem utvrdili da se radi o jednoj od gore navedenih promjena.

Nakon fiksacije biopsijskih uzoraka u 10% formalinu, tkivo je uklapano u parafin, a rezovi debljine 5 mikrona su bojeni standardnom HE i PAS metodom.

Pri mikroskopiranju smo obratili pažnju na 19 promjena i to: veličinu jedara, oblik jedara, nukleo/citoplazmatski odnos, hromaziju jedara, raspored hromatina u jedrima, raspored jedara u žljezdanom epitelu, istaknutost i broj jedaraca u jedrima, izgled ćelijske citoplaz-

Tabela 1. MORFOLOŠKI KRITERIJUMI ZA ODREĐIVANJE DISPLASTIČNIH PROCESA U SLUZNICI KOLONA

POSMATRANE PROMJENE	1	2	3	4
1. VELIČINA ĆELIJA	smanjene	nepromijenjene	uvećane	izrazito uvećane
2. OBLIK JEDARA	nepromijenjen	katkad izdužen	izduženo pleomorfan	iregularno pleomorfan
3. NUKLEO/CITOPLAZMATSKI ODNOS	nepromijenjen	lagano promijenjen u pojedinim ćelijama	promijenjen u većini ćelija	izrazito promijenjen u svim ćelijama
4. HROMAZIJA JEDARA	normohromazija	lagana pojedinačna hiperhromazija	srednje izražena hiperhromazija	jaka hiperhromazija svih jedara
5. RASPORED JEDARA	bazalan raspored	pseudostratifikacija do 1/3 visine ćelija	pseudostratif. do 2/3 visine ćelija	pseudostratifikacija u svim nivoima ćelija
6. RASPORED HROMATINA U JEDRIMA	periferan	uobičajen	homogeniji	izrazito homogen
7. ISTAKNUTOST I BROJ JEDARACA U ĆELIJAMA	lagano prominentno, eozinofilno	ne vidi se	1-2 iregularnog oblika	3 i više izrazito iregularnog oblika
8. CITOPLAZMA	eozinofilna	nepromijenjena	srednje bazofilna	izrazito bazofilna
9. ODRŽANOST ĆELIJSKIH TIPOVA U ŽLIJEZDAMA	očuvani ćelijski tipovi	smanjen broj peharastih ćelija	pojava ne diferenciranih ćelija	sve ćelije su nediferencirane
10. LUČENJE MUKUSA	nepromijenjeno	lagano smanjeno	smanjeno	ne luči se
11. BROJ ĆELIJA U ŽLIJEZDI	nepromijenjen	lagano uvećan	uvećan uz pojavu rešetkastog izgleda dijela žlijezde	izrazito uvećan uz pojavu rešetkastog izgleda čitave žlijezde
12. PROSJEČAN BROJ MITOZA U ŽLIJEZDAMA	nema ih	1-2 u bazalnom dijelu žlijezde	3-5 u višim slojevima žlj.	6 i više u svim slojevima žlj.
13. PUPANJE ŽLIJEZDA	nema pupoljaka	1-2 u vidnom polju	3-5 u vidnom polju	6 i više
14. GRANANJE ŽLIJEZDA	ne javlja se	1-2 žlijezde su zahvaćene	3-5 žlijezda je zahvaćeno	6 i više
15. BROJ ŽLIJEZDA	smanjen	nepromijenjen	lagano uvećan	veoma uvećan
16. »BACK TO BACK FORMACIJE«	nema ih	pokoja (1-2 u vidnom polju)	više ih je (3-5 u vidnom polju)	brojne su (6 i više)
17. VILOZNI IZGLED SLUZNICE	nema ga	lagano naglašen	srednje naglašen	veoma naglašen
18. UPALNI INFILTRAT U LAMINI PROPRIJI	prisutne su rijetke upalne ćelije	povećan broj upalnih ćelija	srednje obilan upalni infiltat	veoma obilan
19. KRIPTA APSCESI	nema ih	pokoji 2-3 u vidnom polju	više ih je (4-6 u vidnom polju)	brojni su (6 i više ih u vidnom polju)

me, održanost ćelijskih tipova u žlijezdama, lučenje mukusa, broj ćelija u žlijezdama, prosječan broj mitoza u žlijezdama, pupanje žlijezda, njihovo grananje, vilozni izgled sluznične površine, broj žlijezda u sluznici, pojavu »back to back formacija«, prisustvo upalnog ćelijskog infiltrata u lamini propriji, te pojavu kripta apscesa (tabela 1).

Navedene kriterije smo odabrali na osnovu poznatih morfoloških promjena koje nastaju u toku upalno-regenerativnih i displastičnih promjena u sluznici debelog crijeva, koje su naveli drugi autori (11, 12, 14, 15), kao i na osnovu onih do kojih smo došli u toku vlastitih istraživanja.

Intenzitet svake od ovih promjena je »bodovan« vrijednostima od 1 do 4. Zbir dobijen sabiranjem pojedinačnih vrijednosti određenih prema jačini promjene dijeljen je ukupnim brojem promjena, tj. sa 19. Dobijena je indeksna vrijednost I.

Na osnovu morfoloških saznanja smo promjene u sluznici podijelili u dvije kategorije:

1. upalno-regenerativne promjene;
2. displastične promjene:
   — lagana displazija;
   — srednje teška displazija;
   — teška displazija.

Uvrštavanje u neku od ovih kategorija slijedilo je nakon detaljne analize svake promjene, pri čemu je raspon kretanja za pojedine kategorije određen računskim putem i na osnovu čije vrijednosti smo promjenu okvalifikovali kao inflamatorno-regenerativni ili kao displastični proces određenog stepena jačine. Prema našim proračunima, vrijednost indeksa I za pojedine kategorije promjena se kreće:

1. upalno-regenerativne promjene	$1{,}3 \leq I \leq 1{,}8$;
2. lagana displazija	$1{,}9 \leq I \leq 2{,}3$;
3. srednje teška displazija	$2{,}4 \leq I \leq 2{,}9$;
4. teška displazija	$3 \leq I \leq 3{,}7$.

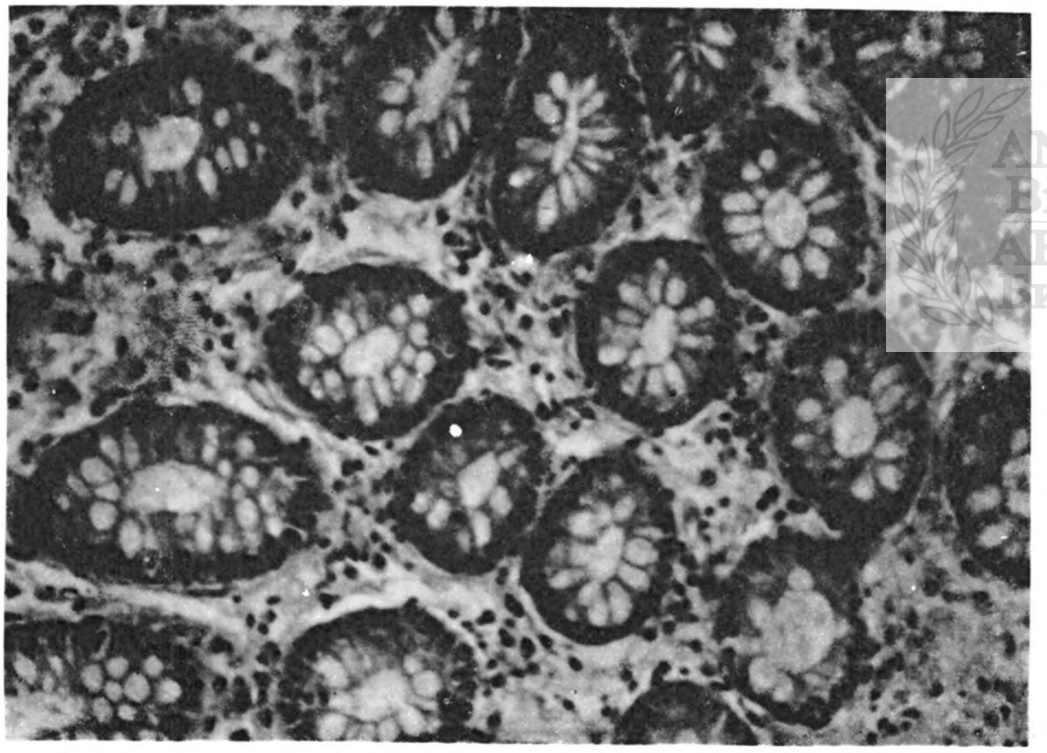
REZULTATI ISTRAŽIVANJA

Pregledani su bioptički uzorci 110 pacijenata. Uzorci sluznice su uzimani iz različitih segmenata debelog crijeva pacijenata kod kojih je utvrđeno postojanje hroničnog ulceroznog kolitisa (9 pacijenata), kolitisa druge etiologije (51 pacijent), karcinoma (41 pacijent) i polipa (9 pacijenata). Kod 39 pacijenata (35,45%) je nađena epitelna displazija. Od ovih 39 pacijenata 25 je imalo laganu displaziju (64,1%), 10 pacijenata je imalo srednje tešku displaziju (25,64%), a kod 4 pa-

cijenta je nađena teška displazija (10,25%). Kod 71 pacijenta su nađene samo upalno-regenerativne promjene, odnosno predisplastične promjene.

Indeksna vrijednost za upalno-regenetrativne promjene se kreće od 1,3 do 1,8 (tabela 2). Imali smo najveći broj slučajeva sa niskom vrijednošću ovoga indeksa, tj. sa 1,3, odnosno nađene promjene su bile veoma niskog stepena intenziteta. Sedam slučajeva je bilo sa indeksnom vrijednošću na gornjoj granici prema laganoj displaziji (I=1,8) i na prvi pogled su se mogli kao takvi i okvalifikovati, ali analizom svih navedenih parametara utvrdilo se da se ipak radi o promjenama predisplastične prirode (Slika 1).

Displastične promjene smo najčešće nalazili u bioptičkim uzorcima sluznice koji su uzimani distalno i proksimalno od mjesta nastanka neoplastične lezije (ne iz njene neposredne blizine, već sa najmanje udaljenosti od 10 cm). Imali smo 23 ovakva slučaja.

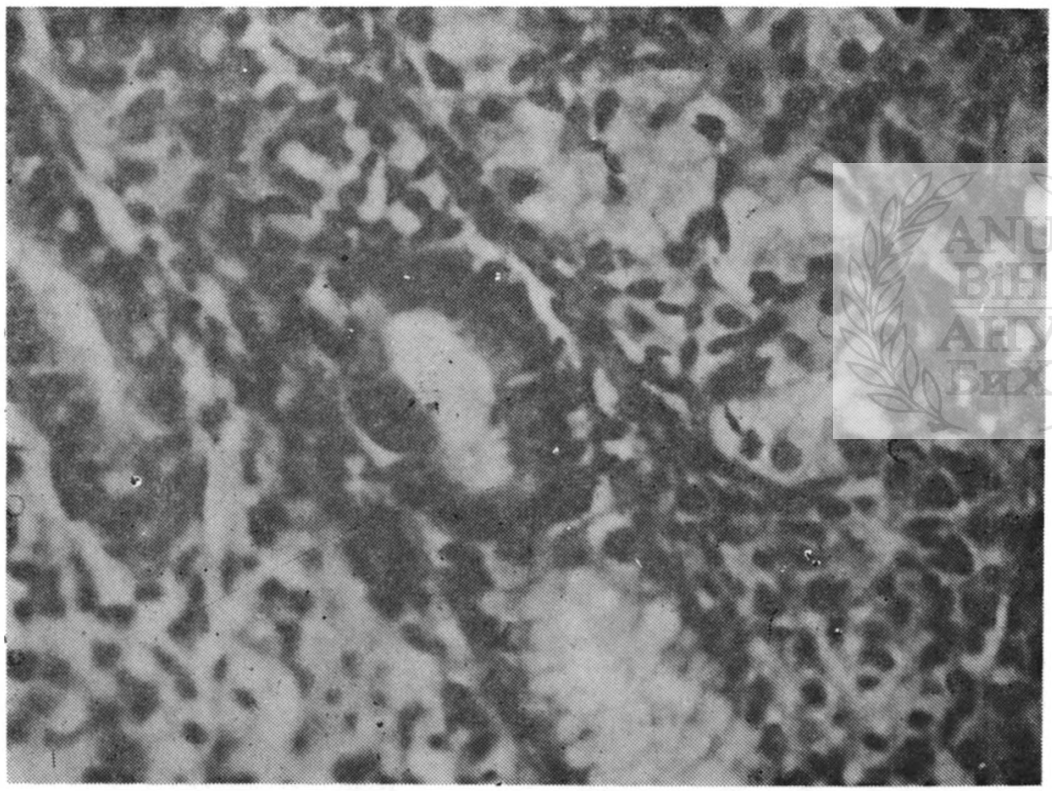


Slika 1. Upalno-regenerativne promjene u sluznici kolona (I=1,4; HE, 250X)

Raspon kretanja indeksa I za laganu displaziju se kreće od 1,9 do 2,3. U najvećem broju slučajeva lagana displazija (8 pacijenata) je imala indeksnu vrijednost 2,1, odnosno bila je srednjeg intenziteta (tabela 3; slika 2).

Tabela 2.

Vrsta oboljenja	Vrijednosti indeksa I za upalno-regenerativne promjene						
	1,3	1,4	1,5	1,6	1,7	1,8	
hronični ulcerozni kolitis		1		3	1		5
kolitisi druge etiologije	18	12	5	6	2	3	46
karcinom kolona	4	1	2	6	2	3	18
polipi kolona					1	1	2
ukupno	22	14	7	15	6	7	71

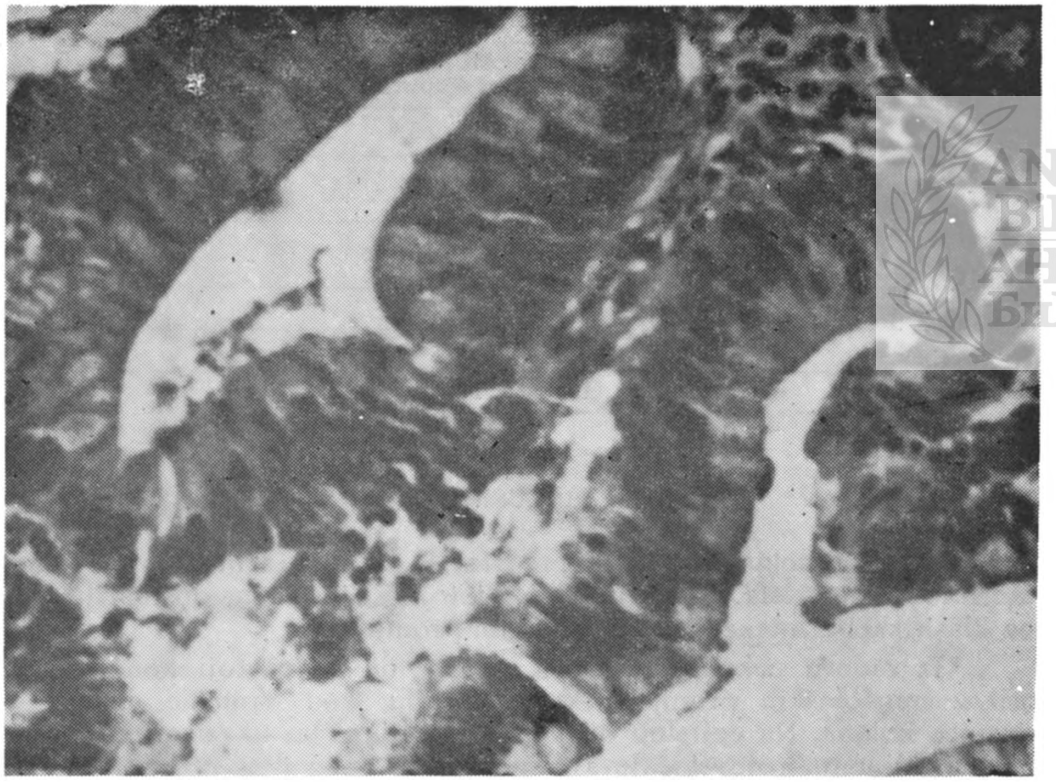


Slika 2. Lagana displazija (I=1,9; HE, 250X).

Srednje teška displazija, sa rasponom indeksne vrijednošti od 2,4 do 2,9, nađena je u 10 slučajeva (tabela 4). Najčešće smo je našli kod pacijenata koji su imali karcinom (7 pacijenata) i uglavnom se radilo o srednjem stepenu jačine displastičnog procesa indeksne vrijednosti 2,5 (slika 3).

Tabela 3.

Vrsta oboljenja	Vrijednosti indeksa I za laku displaziju					ukupno
	1,9	2	2,1	2,2	2,3	
hronični ulcerozni kolitis			2			2
kolitisi druge etiologije	2	1	2			5
karcinom kolona	7	4	3			14
polipi kolona		1	1	1	1	4
ukupno	9	6	8	1	1	25



Slika 3. Srednje teška displazija (I=2,5; HE, 400X).

Displaziju teškog stepena smo našli u 4 slučaja i sva četiri pacijenta su imala makroskopski vidljive promjene u kolonu (2 su imala karcinom, a 2 adenome) (tabela 5).

Tabela 4.

Vrsta oboljenja	Vrijednosti indeksa I za srednje tešku displaziju						ukupno
	2,4	2,5	2,6	2,7	2,8	2,9	
hranični ulcerozni kolitis							
kolitisi druge etiologije	1	1				1	3
karcinom kolona		3	1	2	1		7
polipi kolona							
ukupno	1	4	1	2	1	1	10

Tabela 5.

	Vrijednosti indeksa I za tešku displaziju								ukupno
	3	3,1	3,2	3,3	3,4	3,5	3,6	3,7	
Hronični ulcerozni kolitis									
kolitisi druge etiologije									
karcinom kolona	1			1					2
polipi kolona			1		1				2
ukupno	1		1	1	1				4

ANU BiH АНУ БиХ

DISKUSIJA

Mada epitelna displazija predstavlja dobro identifikovan skup morfoloških entiteta, još uvijek ne postoji jedinstvena, opšteprihvaćena klasifikacija intenziteta displastičnih promjena.

Iz radova nekolicine autora se vidi da ne postoji kompleksan prikaz morfoloških promjena koje nastaju kod epitelne displazije sluznice kolona. Na epitelnu displaziju morfolozi su ukazivali ne samo u nedovoljnom broju slučajeva i sporadično nego i sa različitih aspekata.

Među prvima koji je u morfološku dijagnostiku displazije epitela pokušao da uvede neki određeni sistem bio je Morson (11). Istakao je da najviše važnosti u određivanju jačine promjene imaju celularne promjene, dok one koje narušavaju sluzničnu građu, a koje se obavezno sreću kod displazije srednjeg i teškog stepena, smatrao

je manje važnim u dijagnostičkom postupku. Lennard-Jones (10) je detaljnije opisala morfološke promjene koje se mogu naći u toku razvoja epitelne displazije. Najviše pažnje je poklonila mogućim promjenama u izgledu ćelija, dok poremećaje ćelijske diferencijacije i sluznične građe samo spominje bez detaljnijih analiza. Williams (17) je podijelio epitelnu displaziju u sluznici kolona na tri stepena samo na osnovu analize citoloških i arhitektonskih poremećaja sluznice, dok poremećaje ćelijske diferencijacije i ne spominje. Najznačajniji rad iz ove oblasti prezentirao je Riddell (14, 15). Dao je dosta iscrpan prikaz najvećeg broja morfoloških promjena, koje mogu da nastanu u stanjima inflamacije, reparacije i epitelne displazije u mukozi kolona. Ovim radom je morfologija displazije epitela dobila definitivno mjesto u patologiji, a time se pojavila i imperativna potreba za postavljanjem kriterija kojima bi se ova promjena mogla sa sigurnošću dijagnosticirati i stepenovati. Riddell je promjene podijelio na granične slučajeve (za koje patolog nije siguran da li su prava displazija ili pak predstavljaju inflamatorno-reparirajuće procese) i epitelnu displaziju, koja po njemu može da bude niskog i visokog stepena. Uvođenjem kategorije graničnih slučajeva želio je da istakne da su svjetlosni mikroskop i standardno bojenje ograničenih mogućnosti u pravilnom kvalifikovanju gore navedenih pojava.

Mišljenja smo da jedino analizom svih mogućih promjena koje mogu da se jave u toku upale, regeneracije i displazije epitela, kao i utvrđivanjem njihovog intenziteta, može da se dobije potpuniji uvid u patogenezu ove lezije, kao i da se utvrde realniji kriteriji za procjenu njenog prisustva i jačine.

Učestalost javljanja epitelne displazije u našem materijalu je nešto veća nego što se to vidi u radovima drugih patologa (15, 17). To je zbog toga što su se oni pridržavali Riddellovog modela klasifikacije epitelne displazije i zato što su displaziju epitela proučavali samo u sklopu jednog patološkog procesa (najčešće hroničnog ulceroznog kolitisa). Zbog toga se naši rezultati ne mogu komparirati sa onim objavljenim u svjetskoj literaturi.

Primjena naše metode nam je omogućila da izbjegnemo kategoriju nedovoljno definisanih, odnosno graničnih slučajeva i nadamo se da ćemo ih pravilno okvalifikovati prema porijeklu i težini.

Iako incidenca nastanka karcinoma na displastično promijenjenom epitelu sluznice kolona nije poznata jer nema direktnih opservacija zbog prekida evolutivnog niza teška displazija — karcinom (zbog hirurške intervencije), postojeći podaci u literaturi indiciraju da se radi o patohistološkoj prekurzornoj leziji karcinoma (18). Mišljenja

smo da ju je opravdano posmatrati kao marker, tj. indikator rane dijagnoze karcinoma unutar debelog crijeva. Naši nalazi učestalog nastanika epitelne displazije u sluznici kolona u kojoj se razvio karcinom (kod 14 pacijenata sa karcinomom nađena je lagana displazija, kod 8 pacijenata srednje teška i u 2 slučaja teška displazija) su veoma indikativni i ponukali su nas da vjerujemo u opravdanost mišljenja o značaju njenog prisustva za rano otkrivanje raka kolona.

ZAKLJUČAK

U mikroskopsko-morfološkoj fenomenologiji epitelne displazije postoje brojni manje ili više karakteristični nalazi na osnovu kojih se može uspješno postaviti njena dijagnoza. Ukoliko se u obzir uzmu samo pojedine morfološke promjene, što je uglavnom bila praksa kod najvećeg broja istraživača, nije moguće epitelnu displaziju sa sigurnošću niti dijagnosticirati niti stepenovati. U našoj morfološkoj studiji je posmatrano i po jačini vrednovano 19 promjena, pri čemu je svakoj data podjednaka važnost. Uvođenje metode brojčano objektiviziranih kriterija nam je pomoglo da objektivnije otkrijemo i stepenujemo epitelnu displaziju. Ovom metodologijom smo riješili neke poteškoće koje su isticane da postoje u postupku verifikovanja ove prekarcinomatozne lezije. Sa druge strane, nađeno je učestalo javljanje displazije epitela u sluznici pacijenata kod kojih se razvio karcinom u debelom crijevu. Ovi nalazi ukazuju na povezanost koja postoji između pojave epitelne displazije i karcinoma, čime se potvrđuje mišljenje brojnih autora da ona može biti pokazatelj sklonosti ka nastanku karcinoma ili pak postojanja malignog procesa u sluznici kolona.

THE ELABORATION OF THE MORPHOLOGICAL CRITERIA FOR DETERMINATION OF THE DYSPLASTIC CHANGES IN MUCOUS MEMBRANE OF THE COLON

Summary

The epithelial dysplasia in mucous membrane of the colon is potentially precancerous change whose presence increases the risk for the inception of carcinoma. Since no exact criteria for diagnosing and stageing of the dysplasia of the colon epithelium membrane were set so far, the investigators always emphasized the subjectivness in the evaluation of dysplastic presence and intensity. Through introduction of the method of numerically objectivized criteria we have considerably facilitated the determination of the epithelial dysplasia, and its diagnostical differentiation between inflamatory-regenerative changes as well as the estimation of the intensity of the dysplastic process.

LITERATURA

(1) Blackstone, M. O., Riddell, R. H., Rogers, G., Levin, B: *Dysplasia — associated lesion or mass (DALM) detected by colonoscopy in long-studing ulcerative colitis: an indication for colectomy.* Gastroenterology, 1981; 80:366—74.

(2) Bleiberg, H. i sar.: *Cell kinetic indicators of premalignant stages of colorectal cancer.* Cancer, 1985; 56:123—129.

(3) Blenkinsopp, W. K. i sar.: *Hystopathology reporting in large bowel cancer.* J. Clin Pathol, 1981; 34:509—513.

(4) Brostrom, O., Lofberg, R., Ost, A., Reichart, H.: *Cancer surveillance of patients with longstanding ulcerative colitis: a clinical endoscopical and histological study.* Gut, 1986; 27, 1408—1413.

(5) Brown, L. J. R., Smeeton, N. C., Dixon, M. F.: *Assessment of dysplasia in colorectal adenoma: an observer variation and morphometric study.* J. Clin Pathol, 1985; 38:174—179.

(6) Butt, A. H. i sar.: *Macroscopis lesions in dysplasia and carcinoma complicating ulcerative colitis.* Dig Dis Sci, 1983; 28:18—26.

(7) Cooke, T. i sar.: *Detection of early neoplastic changes in experimentally induced colorectal cancer using scanning electron microscopy and cell kinetic studies.* Gut, 1984; 25:748—755.

(8) Cooke, T. i sar.: *Carcinoma and epithelial dysplasia complicating ulcerative colitis.* Gastroenterology, 1985; 68:1127—1136.

(9) Giars, R., Hermans, J., Riuter, D.: *Variations in histological evaluation of non-neoplastic colonic mucosal abnormalities: assessment and clinical significance.* Histopathology, 1985; 9:535—541.

(10) Lennard-Jones, J. E. i sar.: *Cancer in colitis: assessment of the individual risk by clinical and histological criteria.* Gastroenterology, 1977; 73: 1280—1289.

(11) Morson, B. C., Pang, L.: *Rectal byopsy as an aid to cancer control in ulcerative colitis.* Gut, 1967; 8:423—434.

(12) Morson, B. C.: *Precancer and cancer in inflamatory bowel disease.* Pathology 1985; 17:173—180.

(13) Nikulin, A., Pašić, F., Radović, S., Hadžijahić, H.: *Metod numeričke procjene prisustva i stupnja displastičnih promjena želudačne sluznice.* Liječnički vijesnik, 1987; 109:68—72.

(14) Riddell, R.: *The precanceromatous phase of ulcerative colitis.* U: Morson, B. C.: *Pathology of the gastrointestinal tract, Berlin,* Heilderberg, New York: Springer Verlag, 1976; 179.

(15) Riddell, R. i sar.: *Dysplasia in inflammatory bowel disease: Standardized classification with provisional clinical applications.* Hum Pathol, 1983; 14: 931—986.

(16) Vatn, M. H., Elgjo, K., Bergan, A.: *Distribution of dysplasia in ulcerative colitis.* Scand J Gastroenterol, 1984; 19:893—895.

(17) Williams, G. T.: *Dysplasia in the large intestine.* Path Res Pract, 1985; 180:656—664.

(18) Yardley, J., Keren, D.: *»Precancer« lesions in ulcerative colitis.* Cancer, 1974; 34:835—844.

ANU
BiH
АНУ
БиХ

SOCIOMEDICINSKI PROBLEMI ISHRANE U TREĆOJ ŽIVOTNOJ DOBI

ADILA FILIPOVIĆ, DŽEMAL REZAKOVIĆ
Zavod za zdravstvenu zaštitu BiH

UDC 362.61:6/3.2:616—053.9

Apstrakt. Na osnovu usmjerenih istraživanja socioekonomskog položaja starih ljudi u SR BiH, istraživanja zdravstvenog stanja starog stanovništva u urbanim sredinama SR BiH, autori su analizirali podatke koji su važni za ishranu starih ljudi. Na osnovu podataka iz literature i vlastitih iskustava, data je sociomedicinska analiza faktora koji utiču na deficitarnu ishranu u starosti i predložena određena rješenja za poboljšanje, uključujući veću brigu i angažovanost šire društvene zajednice.

Ključne riječi: starije životno doba, slabija pokretnost, fiziološke promjene u gastrointestinalnom traktu, ishrana, zdravstveno stanje, društvena briga.

1. UVOD

Posljednjih petnaest godina sve Evropske zemlje bilježe porast broja starijih ljudi, što izaziva određene promjene i u politici tih zemalja podržavajući koncepciju zdravlja SZO i ciljeve »Zdravlje za sve do 2000-te godine«, gdje se pored ostalog, vrlo značajan dio strategije za ostvarivanje zdravlja posvjećuje starim ljudima, garantujući im ekonomsku nezavisnost, samostalnost u donošenju odluka o ličnim stvarima i njihovo pravo da budu aktivni saučesnici u zbivanjima društvene zajednice u kojoj žive (1).

Iz tih razloga neophodno je sprovesti određene mjere koje će, pored drugih poboljšanja u uslovima života starih ljudi, omogućiti i izmjenu uslova ishrane i vlastitih navika u ishrani, kao jednog od bitnih faktora za očuvanje fizičkog zdravlja starih ljudi, koji će im omogućiti da »godinama dodaju život«, a »životu godine«.

Da bismo se znali pravilno postaviti u odnosu na poboljšanje ishrane starih ljudi i stvaranja uslova da takvu ishranu obezbijede, potrebno je sagledati sve faktore koji utiču da se staranjem dođe do iz-

mjene mogućnosti da se obezbijedi adekvatna ishrana, da se hrana pripremi u obliku pogodnom za staro lice, da se iz uzete hrane reapsorbuju i iskoriste potrebni hranjivi sastojci.

Poznato je da na ishranu starih ljudi, pored socijalno-ekonomskih faktora, utiču promjene na probavnim organima koje se dešavaju u starosti, prisustvo ili odsustvo određenih hroničnih oboljenja, biokemijske promjene u organizmu zbog oboljenja drugih organa i sistema, psihičke osobenosti starog čovjeka, stečene navike u ishrani, usvojene zablude u odabiranju i načinu pripremanja hrane, stepen emancipacije o mogućnosti korištenja zdravstvene službe itd.(1).

Iz naprijed navedenih razloga mi smo se orijentisali na sagledavanje određenog broja pokazatelja iz oblasti socio-ekonomskih problema starih ljudi, određenog broja pokazatelja za sagledavanje zdravstvenog stanja populacije starih ljudi u SR BiH i naučno dokazanih funkcionalnih promjena na gastrointestinalnom traktu koje se razvijaju sa starošću da bismo što bolje ocijenili situaciju u odnosu na mogućnosti i uslove za adekvatnu ishranu tog segmenta stanovništva. U toj populaciji smanjenih funkcionalnih sposobnosti i prisutnih simptoma fizičkog i psihičkog propadanja, putem ishrane kao vrlo značajnog elementa njihovog zdravlja potrebno je obezbijediti takav nivo zdravlja koji će im dozvoljavati da nastave društveno i ekonomski aktivan život.

2. METODOLOGIJA RADA

U istraživanju socio-medicinskih problema vezanih za ishranu starih ljudi služili smo se vlastitim istraživanjima i istraživanjima drugih autora vezanih za problematiku zdravlja starih ljudi i faktora koji bi direktno ili indirektno mogli uticati na njihovu ishranu.

Veliki broj relevantnih podataka pružila nam je studija *Socio-ekonomski položaj starih ljudi u Bosni i Hercegovini.* Ovaj projekat je postavio i realizirao Savez samoupravnih interesnih zajednica socijalne i dječije zaštite Bosne i Hercegovine, uz saradnju centara za socijalni rad. Istraživanje je vršeno putem anketnog upitnika, a istraživanjem je obuhvaćeno 26 opština sa 28.647 ispitanika starijih od 60 godina, s tim što je u pet opština obuhvat te populacije bio potpun (tabela 1). Prema popisu stanovnika iz 1981. godine, ovaj uzorak je obuhvatio 9% stanovnika te populacione grupe.

Tabela 1. STAROST ANKETIRANOG STANOVNIŠTVA BiH U ODNOSU NA POL

Pol	bez odg.		do 60 god.		61-65 god.		66-70 god.		71-75 god.		76 i više		ukupno	
	broj	%	broj	%	broj	%	broj	%	broj	%	broj	%	broj	%
muški	12	0,10	1061	46,7	4365	44,1	2825	42,9	1865	43,4	2496	44,8	12624	44,06
ženski	18	0,11	1212	53,3	5530	55,9	3754	57,1	2433	56,6	3076	55,2	16023	55,93
ukupno	30	0,10	2273	7,93	9895	34,54	6579	22,96	4298	15,0	5572	19,45	28647	

Drugi dio podataka crpili smo iz statističkih podataka o morbiditetu stanovništva BiH, a time i starog stanovništva, uključujući podatke ambulantno-polikliničke službe i bolničke službe kojim raspolaže Zavod za zdravstvenu zaštitu BiH i Repubcički zavod za statistiku (tabele 4, 5).

Tabela 2. SUBJEKTIVNI OSJEĆAJ ZDRAVLJA KOD ANKETIRANOG STANOVNIŠTVA BiH

Starost	bez odgovora		dobro		relativno dobro		loše		veoma loše		ukupno	
	broj	%	broj	%	broj	%	broj	%	broj	%	broj	%
bez odgovora	1	33,33	6	20,00	9	30,00	13	43,33	1	3,33	30	0,10
do 60 god.	3	0,13	650	28,60	901	39,64	634	27,89	85	3,74	2273	7,93
61—65 god.	8	0,08	2471	24,97	4043	40,86	2978	30,10	395	3,99	9895	34,54
66—70 god.	4	0,06	1308	19,88	2622	39,85	2312	35,14	333	5,06	6579	22,36
71—75 god.	8	0,19	659	15,33	1584	36,85	1742	40,53	305	7,10	4298	15,00
76 i više godina	6	0,11	533	9,57	1716	30,80	2444	43,86	873	15,67	5572	19,45
ukupno	30	0,10	5627	19,64	10875	37,96	10123	35,33	1992	6,95	28647	

Tabela 3. NAJUČESTALIJA HRONIČNA OBOLJENJA USTANOVLJENA USMJERENIM ISTRAŽIVANJIMA KOD STANOVNIKA BiH

Grupa oboljenja	Starosne grupe																			
	60—64				65—69				70—74				75—79				80 +			
	M	Z	U	%	M	Z	U	%	M	Z	U	%	M	Z	U	%	M	Z	U	%
Kardiovaskularna	162	194	356	158	169	158	327	181	99	90	189	178	61	45	106	171	21	52	73	162
Gastrointestinalna	60	56	116	51	50	37	87	48	25	20	45	42	19	14	33	53	9	12	21	60
Respiratora	124	75	199	88	99	58	157	87	57	33	90	85	38	33	71	114	10	18	28	124
Endokrina	7	16	23	10	9	15	24	14	3	8	11	10	3	6	9	14	—	2	2	7
Maligna	1	4	5	2	3	3	6	3	2	3	5	5	4	—	4	6	—	1	1	1
Reumatska	30	54	84	37	15	25	40	22	9	9	18	17	6	5	11	17	2	6	8	30
Nefrološka	12	18	30	13	19	19	38	21	9	8	17	16	8	1	9	14	3	4	7	12
Neuropsihijatrijska	5	4	9	4	2	1	3	1	2	—	2	2	1	3	4	6	2	3	5	5
Malokrvnost	4	9	13	6	3	5	8	4	1	2	3	3	3	4	7	114	2	4	6	4
Broj ukupno pregledanih	110	114	224	100	100	80	180	100	55	51	106	100	35	27	62	100	11	25	36	110

Treći dio podataka crpljen je iz naučnoistraživačkog projekta (3) vezanog za ispitivanje zdravstvenog stanja reprezentativnog uzroka starih ljudi u četiri geografski i privredno različita lokaliteta BiH (tabela 3).

Četvrti dio podataka crpljen je iz naučnoistraživačkih radova drugih autora, pretežno onih koji su se bavili problemima ishrane starih ljudi, a čija su imena navedena u bibliografiji.

Tabela 4. DESET VODEĆIH DIJAGNOZA KOD LICA STARIH 60 I VIŠE GODINA LIJEČENIH U BOLNICAMA BiH

Šifra	Dijagnoza	1983.		1984.		1985.	
		Broj	Rang	Broj	Rang	Broj	Rang
011	Plućna tuberkuloza	1761	V	2085	IV	1956	V
162	Maligna neopl. traheje bronha i pluća	587		921		941	IX
250	Diabetes mellitus	1688	VI	2351	III	2265	III
366	Katarakta	991	VIII	1566	VII	1395	VI
401	Esencijalna hipertenzija	1793	IV	3170	II	2420	II
410	Akutni infarkt miokarda	700	X	966	X	915	X
425	Kardiomiopatija	6141	I	7792	I	6356	I
485	Bronhopneumonija neoznač. uzroć.	1429	VII	1802	VI	1313	VII
491	Hronični bronhitis	2055	III	2009	V	1979	IV
493	Astma	886	IX	1007	IX	771	
550	Ingvinalna hernija	642		790		915	X
574	Holelitijaza	563		962		951	VIII
715	Osteoartroza i srodna oboljenja	120		1317	VIII	521	
780	Opšti simptomi	2135	II	171		437	
	Ukupno liječenih	274451		323736		310127	
	Ukupno liječenih starijih od 60 i više godina	48185		57078		55753	
	% liječenih sa 60 i više godina na ukupno liječenih	17,63%		17,55%		17,97%	

ANU BiH АНУ БиХ

Tabela 5. DESET VODEĆIH DIJAGNOZA UZROKA SMRTI STANOVNIKA BiH STARIH 60 I VIŠE GODINA U PERIODU 1981—1985.

Osnovni uzrok smrti		Broj umrlih po godinama									
		1981		1982		1983		1984		1985	
Šifra	Dijagnoza	Broj	R	Broj	R	Broj	R	Broj	R	Broj	R
162	Maligna neoplazma traheje, bronha pluća			528	X	550	X	453	IX	783	VII
402	Hipert. oboljenje srca	785	VI	970	VI						
410	Akutni infarkt mikar	1048	IV	1169	IV	1344	IV	1269	III	1408	III
416	Hron. pulm. obolj. srca	456	X			607	VIII	468	VIII	495	IX
425	Kardiomiopatija	1680	I	1751	I	1830	II	1770	II	1783	II
429	Nedovoljno definisani opis bloesti srca	700	VII	630	VIII	834	VII	806	VII	669	VIII
436	Akutno nedov. definisano cerebrovaskularno obolj.	525	IX	746	VII	962	VI	1147	V	1340	IV
440	Ateroskleroza	1442	III	1749	II	1398	III	1153	IV	1251	V
491	Hronični bronhitis							451	X		
493	Astma	601	VIII	549	IX	597	IX			406	X
797	Senilnost bez psihoze	1032	V	873	V	1020	V	1002	VI	889	VI
799	Drugi nedovolj. defin. i nepoznati uzroci smrti	1498	II	1504	III	2245	I	2871	I	2997	I
Ukupno umrlih u BiH		26222		26775		29999		29046		28966	
Ukupno umrlih od 60 + god.		16156		16594		18890		18355		18447	
Ukupno umrlih od 60 + god. od vodećih uzroka		9952		10284		11387		11390		12021	
% ukupno umrlih 60 +		61,61%		61,81%		62,97%		63,19%		63,69%	
% od 10 vodećih dijag.		37,95%		38,41%		37,96%		39,21%		41,50%	

ANU BiH АНУ БиХ

3. REZULTATI ISPITIVANJA SOCIJALNO-MEDICINSKIH PROBLEMA VEZANIH ZA ISHRANU STARIH LJUDI

3.1. Socio-ekonomski faktori koji utiču na ishranu starih ljudi

Iz usmjerene studije *Socio-ekonomski položaj starih ljudi u BiH*, gdje je anketom obuhvaćeno 28.647 ispitanika starijih od 60 godina, došlo se do niza podataka od interesa za zdravlje starih ljudi, pa i uslova koji onemogućavaju starim ljudima odgovarajuću ishranu (5).

3.1.1. Subjektivni osjećaj »dobrog zdravlja« imalo je samo 20% ispitanika. Taj osjećaj dobrog zdravlja je opadao sa rastućim godinama, tako da je u grupama iznad 75 godina bio pozitivan samo u 9% slučajeva. Subjektivni osjećaj »relativno dobrog« zdravlja imalo je 37% ispitanika, dok je osjećaj »lošeg« zdravlja imalo 35% ispitanika. »Veoma loše« zdravstveno stanje imalo je 7% ispitanika (tabela 2).

3.1.2. U odnosu na podatke sa kim žive, došli smo do saznanja da 17% starih ljudi žive sami, od toga 15% na selu i 21% u gradu. Od ovih 17% starih ljudi koji žive sami 50% ima »loše« ili »vrlo loše« subjektivno osjećanje zdravlja.

3.1.3. Na pitanje ko ih njeguje kad su bolesni, u 43% slučajeva to je bračni drug, u 26% slučajeva to su djeca sa kojom žive u stanu, u 11% slučajeva obilaze ih djeca koja s njima ne žive, u 5% slučajeva njeguju ih srodnici, u 3% slučajeva susjedi, a u 4% slučajeva niko. Kod onih 17% starih ljudi koji žive sami, u istom tolikom procentu (17%), kad su bolesni, nema ko da ih njeguje.

3.1.4. Pokretljivost starih ljudi je »dobra« različito prema starosnim grupama. U grupi od 61—65 godina je takva kod 50% ispitanika, pa postepeno opada i u grupi iznad 75 godina je 15%. Pokretljivost na manju udaljenost ima očuvano 38% ispitanika, dok je onih koji mogu izaći na dvorište 13%. Mogućnost da se kreću po kući imalo je 7% ispitanika. Sa ortopedskim pomagalima moglo se po kući kretati 1% starih ljudi, a nepokretno je bilo 2% ispitanika. Od starih ljudi koji žive sami samo se 28% kreće neograničeno, na manju udaljenost sposobno je ga se kreće 42%, mogu izaći na dvorište 18%, a mogućnost da se kreću sami po kući ima 10%. Nepokretnih je 3%.

3.1.5. Snabdijevati se prehrambenim i drugim artiklima ne može 30% starih ljudi, od čega u starosnoj grupi iznad 75 godina 59%.

3.1.6. Pripremiti hranu nije u mogućnosti 30% ispitanika. Čak i u najmlađoj starosnoj grupi starih ljudi (61—65 g.) to nije sposobno 20% ispitanika, a u starosnoj grupi iznad 75 godina 55% ispitanika.

3.2. Stanje zdravlja starih ljudi kao jedan od faktora koji opredjeljuje vrstu ishrane

3.2.1. Usmjerenim istraživanjima zdravlja starih ljudi na reprezentativnom uzroku u četiri lokaliteta SR BiH primjenom odgovarajućih laboratorijskih testova, Ekg-snimanja srca, Rtg-pregleda pluća i srca, pregledom ranije zdravstvene dokumentacije i kliničkim pregle-

dom ljekara interniste utvrđeno je da svaki ispitanik u prosjeku ima oko 3,8 hroničnih oboljenja (3). Među prisutnim hroničnim oboljenjima najčešća su bila kardiovaskularna oboljenja, zatim oboljenja respiratornog trakta, pa oboljenja probavnog trakta, zatim oboljenja endokrinog sistema i poremećaji metabolizma, gdje je uglavnom bila vodeća šećerna bolest, zatim slijede hronična degenerativna oboljenja mišićno-koštanog sistema, hronična oboljenja urinarnog trakta, malokrvnost, psihijatrijska oboljenja, maligna oboljenja (tabela 3).

Postoje određene razlike u rangu hroničnih oboljenja prema spolu ispitanika. Žene više obolijevaju od muškaraca od degenerativnih oboljenja srca, hroničnog gastritisa, holecistitisa, sa i bez kalkuloze, šećerne bolesti, degenerativnog reumatizma, oboljenja genitourinarnog sistema i anemije. Muškarci signifikantno češće obolijevaju od žena od hroničnih respiratornih oboljenja, ulkusne bolesti želuca i duodenuma, hroničnog hepatitisa i ciroze, ingvinalne hernije i oboljenja prostate (3).

3.2.2. Ispitivanjem razloga bolničkog liječenja starog stanovništva (tabela 4) ustanovili smo da su vodeća kardiovaskularna oboljenja sa najčešćom dijagnozom kardiomiopatija, a poslije slijedi povećani pritisak i njegove posljedice, šećerna bolest, hronični bronhitis, akutna infektivna oboljenja, kao što su bronhopneumonije, i hronična infektivna oboljenja, kao što je respiratorna tuberkuloza. Među deset vodećih oboljenja u bolničkom liječenju spadaju katarakta, žučni kamenci, maligna oboljenja (prvenstveno pluća), ingvinalna hernija, te infarkt miokarda (4).

3.2.3. Analiziranjem podataka o osnovnim uzrocima smrti starog stanovništva (tabela 4), koji se najčešće koriste u ocjeni socijalno-medicinskih problema starih ljudi, a koji na određen način govore i o organiziranosti zdravstvene službe i njenoj dostupnosti starim ljudima, konstatovali smo da je vodeća dijagnoza posljednje tri godine »drugi, nedovoljno definisani i nepoznati uzroci smrti«. Ko poznaje medicinu, odmah mu je jasno da to znači da ti stari ljudi nisu za života niti neposredno pred smrt imali kontakta sa ljekarima. Na drugom mjestu je kardiomiopatija, dijagnoza koja takođe ne zahtijeva prethodna saznanja o zdravstvenom stanju umrlog. Ona se jednostavno može upisati na osnovu godina umrlog i saznanja o simptomima koje je imao za života, koje su iznijeli ukućani ili bliski susjedi, odnosno prijatelji umrlog. I sljedećih sedam dijagnoza koje dolaze po redoslijedu nisu morale imati iza sebe dijagnostički postupak niti su posljedica poznate bolesti od koje je stariji čovjek liječen za vrijeme života (4).

3.3. Funkcionalne promjene probavnih organa u starosti

Mnogi strani i naši autori dali su dosta podataka o promjenama koje tokom starenja nastaju na probavnim organima, dovodeći do promjena njihove funkcije, a time do poremećaja u probavi hranjivih materija koje se unose hranom (2, 6, 7, 8, 9, 10).

Uglavnom se radi o degenerativnim promjenama koje neposredno ili posredno utiču na ishranu starih ljudi, jer onemogućavaju pravilno varenje i apsorbovanje hranjivih i zaštitnih materija, odnosno onemogućavaju iskorištavanje tih materija u ćelijama (7).

3.3.1. Nedostatak zuba onemogućava pravilno žvakanje i sitnjenje hrane.

3.3.2. Atrofične pljuvačne žljezde nedovoljno luče p t i j a l i n, pa time onemogućavaju razlaganje skroba.

3.3.3. Jednjak gubi svoju sinergističnu harmoniju, javljaju se diskinetična stanja zbog neuro-muskularne insuficijencije, kao disfagija.

3.3.4. Još uvijek nije razjašnjen uticaj starosti na pojavu hroničnog gastritisa, tj. da li je to posljedica mikroskopski vidljivih infiltracija upalnih elemenata kao posljedica upale ili se radi o autoimunom fiziološkom starenju želučane sluznice. Tako oštećena sluznica ne može više da luči probavne želučane sokove kao ranije (solna kiselina i pepsin). Pored toga, promjene zahvataju i glatke mišiće želuca, pa je poremećena njegova motorika. Mišićna vlakna u području fundusa i kardije propadaju na račun uvećanja ukupne količine kolagena i elastina.

3.3.5. U tankom crijevu reducira se također glatka muskulatura, a smanjuje se i linforetikularna stroma, što vjerovatno ima dalekosežne posljedice za cjelokupan imunološki odbrambeni sistem. Funkcionalni nedostaci u sekreciji i reapsorpciji se ne manifestuju (vjerovatno zbog velikih rezervi), pa hipofunkcija sekrecije i reapsorpcije ostaje latentna sve do agresivnijih patoloških faktora koji mogu dovesti do manifestnog mal-apsorpcionog sindroma.

3.3.6. Promjene na kolonu su slične onima na tankom crijevu, a zbog propadanja mišićnih vlakana, nastaju često proširena crijeva. Na tako promijenjenoj sluzokoži često je nastajanje divertikula, polipa, malignoma, što je sve praćeno dugotrajnom ostipacijom. Na ove promjene vezane za sluznicu nadovezuje se i dugogodišnji uticaj vanjskih faktora vezanih za hranu ili određeni broj hroničnih oboljenja koja se nose iz doba zrelosti.

3.3.7. Jetra sa žučnom kesom i žučnim vodovima se, kao i gušterača, u procesu starenja ponašaju nešto drugačije jer je njihov parenhim sastavljen uglavnom od postmitotičnih parenhimskih stanica, gdje su mitoze vrlo rijetke, pa su njihove ćelije stalno izložene škodljivim materijama. Ipak, zahvaljujući regeneracijskim potencijalima, pa i mitotičkim rezervama, kad zatreba, jetreni parenhim u starosti pokazuje samo male promjene (skromno umnožavanje vezivnog tkiva, retikularne supstancije i elastičnih niti). U pojedinim stanicama nakuplja se pigment l i p o f u s c i n, a i broj K u p f f e r o v i h stanica je smanjen. Uz sve to, globalna funkcija jetre direktno starenjem vrlo malo se mijenja ako se zanemare primarni malignomi, koji nisu nužno vezani za starije godine.

Na žučnom mjehuru nastaje samo kaolagenizacija glatkih mišića i sluzokože, koji ipak na neki način postaju slaba tačka za nastanak drugih patoloških promjena na žuči.

3.3.8. Promjene na pankreasu nisu nužno vezane za starije godine; uglavnom se radi o umnožavanju masnog tkiva na račun redukcije parenhima; umnožavanjem kolagena u vezivnom tkivu inzularnog aparata može da se nakuplja a m i l o i d, što može dovesti do fibroze, a u najgorem slučaju do endokrine insuficijencije i pojave staračkog dijabetesa. Gotovo nikad ne dolazi do egzokrine insuficijencije pankreasa.

4. POSLJEDICE PO ZDRAVLJE — PROMJENA U ISHRANI STARIH LJUDI

Pored somatskih promjena koje utiču na ishranu starih ljudi, postoje još mnogi drugi faktori koji negativno djeluju na metaboličke procese u razmjeni energetskih i gradivnih materija organizma (2, 6, 10).

U starijim godinama, zbog smanjene fizičke aktivnosti, a i zbog navika stečenih u ranijim godinama ne samo u izboru namirnica već i u načinu pripremanja, broju obroka, količini hrane, dolazi do izrazitijeg pozitivnog energetskog bilansa, a kao posljedice toga i gojaznosti. Takva stanja izazivaju često poremećaj metabolizma, šećera i masti, pa nastaju hiperglikemije i hiperlipoproteinemije. Posljedica ovih metaboličnih poremećaja je ubrzanje razvoja težih oblika atero i arterioskleroze, hipertenzije, koronarne insuficijencije, hepatorenalne insuficijencije, pojava letentnog ili klinički manifestnog dijabetesa, kao i kliničke manifestacije svih oboljenja koja u osnovi imaju suženje krvnih sudova (srčani i moždani infarkt).

U poznijim godinama, osobito poslije 75. godine, usljed psihičkih promjena praćenih konfuznim stanjima, dezorijentacijom u vremenu i prostoru, depresijom, apatijom, nezainteresovanošću za zbivanja u okolini, pa i nezainteresovanošću za ishranu, nastaju suprotna stanja od naprijed navedenih. Stari ljudi, pogotovo ako žive sami, često ispuštaju pojedine obroke, ili usljed nemogućnosti da žvaću hranu, prelaze na kašastu hranu, dugo termički obrađivanu, obično bogatu šećerom, pa mastima, začinima i kuhinjskom solju, a siromašnu gradivnim materijalima životinjskog porijekla, vitaminima i mineralnim solima iz voća i povrća.

Pothranjenost dovodi do sindroma energetsko-proteinskog deficita praćenog smanjenjem tjelesne težine, usljed smanjenja masti u depoima, a kasnije usljed smanjenja aktivne mišićne mase, usljed razgradnje proteina iz mišića, ali i iz parenhimnih organa. Ovakvo stanje praćeno je i slabijim stvaranjem antitijela, pa i većom sklonosti infekcijama, tj. opadanjem imuniteta. Dolazi do deproteinizacije i dekalcifikacije koštanog tkiva — staračke »kostobolje«. U starosti značajno opada sadržaj retinola i kerotina u serumu, bilo zbog smanjenog unošenja, bilo zbog smanjene resorpcije u crijevima. Isto tako opada i sadržaj tokoferola u serumu, uglavnom zbog smanjene apsorpcije, a poznata je njegova uloga u održavanju normalne građe i funkcije skeletnih i poprečno-prugastih srčanih vlakana. Kod starih ljudi je spriječena i sinteza vit. D3 u koži iz 7-dehidro holesterola, jer izbjegavaju izlaganje suncu, a time i sunčane ultraljubičaste radijacije. Ako nedostaju vitamini iz B kompleksa, odgovorni najviše u metabolizmu šećera i za neuromišićni sistem, dolazi do oštećenja funkcije jetre, uz poremećenu sintezu kokarboksilaze. Kod siromašnih starih ljudi često je u ishrani zapažen nedostatak niacina (kukuruz glavna hrana), a u periodu zima — proljeće, čest je nedostatak C vitamina. Zbog neodgovarajućeg sadržaja željeza u hrani i smanjene apsorpcije istog, nastaju i nutritivne anemije kod starih ljudi.

Pored ovih opštih efekata, nedostataka pojedinih gradivnih i mineralno-vitaminskih sastojaka u ishrani (8), svaki stari čovjek ima po neko hronično oboljenje (prema našim istraživanjima, u prosjeku 3,8 oboljenja), kao što su kardiovaskularna hronična oboljenja, gastrointestinalna oboljenja, endokrina, metabolička, gdje su najčešća šećerna bolest, maligna oboljenja, koja svojim prisustvom komplikuju posljedice deficitarnosti pojedinih za život neophodnih sastojaka ishrane ili ih ove bolesti direktno izazivaju (3).

5. OSNOVNE KARAKTERISTIKE ODGOVARAJUĆE ISHRANE STARIH LJUDI

Odgovarajuća ishrana starih ljudi, pogotovo ako je ishrana iz ranijih godina života bila prilagođena potrebama organizma, zavisno od aktivnosti i antropoloških karakteristika čovjeka, jedan je od uslova za zdravu starost i preveniranje patološke starosti, tj. starosti opterećene komplikacijama ranije stečenih hroničnih oboljenja.

Ukoliko su se u mlađim godinama pravili promašaji u ishrani, to ipak ne znači da se odgovarajućom ishranom u starijim godinama ne može uticati na bolje zdravstveno stanje, a time uticati i na subjektivni osjećaj zadovoljstva životom, otpornošću prema određenim oboljenjima (anemija, osteoporoza, dijabetes), boljem efektu farmakoterapije na tok određenih hroničnih oboljenja itd.

Jasno je da hrana i ishrana nisu osnovni faktori mentalnofizičke ravnoteže čovjeka, jer je za život u starosti bitno zdravstveno stanje sa kojim je čovjek dospio do 65-te godine života i više, ekonomski položaj starog čovjeka i njegova socijalna sigurnost i emotivno zadovoljstvo životom kojim živi, odnosno odnosom prema njemu uže i šire društvene sredine.

Pa i premda je ishrana samo jedan od faktora u obezbjeđenju zdravijeg življenja u starosti, zdravstveni radnici je moraju prihvatiti kao značajnu preventivnu mjeru i uložiti dosta truda da njihovi savjeti i prijedlozi u ishrani budu prihvaćeni od strane starog čovjeka, a veliku ulogu u tome će odigrati dobro educirane sestre dijetetičarke, odnosno patronažne sestre u svakodnevnom radu sa starim ljudima.

Bazalni metabolizam i potrošnja kisika sa starošću progresivno opada (6), a raste glikolitička aktivnost. Smanjenje, odnosno gubitak stanica pojedinih organskih sistema, kao i histološke promjene na mišićnom tkivu, stanicama mozga, hrskavici, kostima, bubrezima itd. dovode do funkcionalnog slabljenja organizma, a kako uz to opada i fizička aktivnost, javlja se potreba za prilagođavanjem ishrane svim nastalim promjenama.

U planiranju prehrane starih ljudi preporučuje se sniženi energetski unos u odnosu na radno aktivni period, vodeći računa o sadržaju hrane u odnosu na potrebe organizma tog životnog doba, tj. da su zastupljene sve materije neophodne u tim godinama. U SAD je 1972. godine donesen zakon koji u svom sadržaju daje prehrambeni program

za starije osobe (11), a i mnoge evropske zemlje su izradile svoje standarde za prehranu starih ljudi. Jedan od tih standarda je prikazan na tabeli 6.

Tabela 6. PREHRAMBENI STANDARD ZA PLANIRANJE PREHRANE STARIH LJUDI [na bazi preporuka R.D.A. (11)]

Hranila		Muškarci	Žene
Energetska vrijednost	Kcal	2250	2000
	kJ	9450	8400
bjelančevine, g		80—85	75
masnoće, g		70	60
ugljikohidrati, g		310	280
vitamin A, I. J.		5000	5000
vitamin B_1, mg		1,7	1,5
vitamin B_2, mg		1,8	1,8
vitamin C, mg		75	75
kalcij, mg		800	800
željezo, mg		10	12

Pored sastojaka koji su neophodni u ishrani starih ljudi, vrlo je značajan i raspored dnevnih obroka. Većina autora koji se bave ovom problematikom se slaže da obroci trebaju biti po količini uglavnom izjednačeni i raspoređeni u oko pet vremenskih razdoblja sa razmakom od 3—3,5 sati, što je osobito značajno za starije ljude koji su i dijabetičari.

Što se tiče namirnica koje stari čovjek treba da upotrijebi za ishranu, bilo u ishrani koju priprema individualno za sebe, ili ako se radi o ishrani u većim kolektivima, odnosno društveno organizovanoj ishrani, ima određenih doktrinarnih pravila kojih se treba držati, pa ćemo navesti neke primjere (10).

M e s o u ishrani je neophodno (oko 1 g na kg težine u toku dana) i preporučuju se mesa mršavih ili mlađih životinja, živinsko meso i posne ribe. Korisni su i proteini biljnog porijekla.

M l i j e č n i p r o i z v o d i su također vrlo značajni, osobito kod žena u menopauzi, a prednost imaju kiselo mliječni proizvodi i posni sirevi.

Od j a j a se preporučuje bjelance, a žumance samo 1—2 puta sedmično.

U l j e dobijeno iz kukuruznih klica i suncokretovog sjemena je najbolje, ali se ne preporučuje njegovo jako zagrijavanje i prženje na njemu, nego se dodaje u hranu koja se kuha u vodi ili nakon završetka kuhanja.

M a s l a c je omiljena hrana starih ljudi, ali treba ga ograničiti na manje količine, a ni njega ne treba zagrijavati.

Margarin, ako nije obogaćen esencijalnim masnim kiselinama i vitaminima, nije preporučljiv.

Šećer treba svesti na najmanju mjeru ili, ako stari čovjek nije dijabetičar, zamijeniti ga medom ili voćnim šećerom. Zamjene za šećer koje se preporučuju dijabetičarima i debelim ljudima kao saharin, sorbitol, asugrin itd. također ne treba zloupotrebljavati i uzimati u većim količinama.

Voće i povrće se preporučuju za svakodnevnu upotrebu i to u svježem stanju, po obliku prilagođeno starim ljudima (radi eventualnog nedostatka zuba).

Hljeb treba da je od neprosijanog brašna, bogat mekinjama, tj. celulozom.

Kuhinjska so se treba ograničiti, a ostali začini se također mogu umjereno upotrebljavati.

Ako nema hipertenzije i poremećaja sna, čaj, kakao i kafa se u ograničenim količinama mogu konzumirati.

6. DISKUSIJA I ZAKLJUČCI

Nezavidan socijalno-ekonomski položaj starih ljudi, koji smo ilustrovali samo kroz neke od pokazatelja, čak se ne upuštajući u stvarni ekonomski položaj starih ljudi i premda smo kroz naša istraživanja (uz oko 30% uskraćenih odgovora na pitanje o prihodima) došli do podataka da ih je: samo 3% sa ličnim dohocima (uglavnom u grupi do 65 godina), 25% sa starosnom penzijom, 12% sa invalidskom, 6% sa boračkom penzijom, 20% sa porodičnom penzijom, 5% sa zaštitnim dodatkom uz penziju, a 4% živi od socijalne pomoći, tj. 50% je ispod ekonomskog minimuma za život, upozorava da, pored oštećenog zdravlja starih ljudi većim brojem hroničnih oboljenja, uz starošću izmijenjenu funkcionalnost gastrointestinalnog trakta, i neminovne psihičke promjene koje više inkliniraju ka depresiji i apatiji, dovode u veliko pitanje adekvatnost ishrane starih ljudi. Subjektivni osjećaj lošeg ili veoma lošeg zdravlja ima 42% naših stanovnika iznad 60 godina starosti, 12% ih nema nikog od bližih srodnika da ih njeguje kad su bolesni, dok kod onih koji žive sami u 17% slučajeva nema baš niko da im pruži njegu u bolesti. Pokretljivost je smanjena na prostor kuće i eventualno do dvorišta kod 23% starih ljudi, dok su 3% nepokretni. Snabdjeti se hranom ne može 30% starih ljudi, a u istom procentu ni pripremiti hranu ako je i imaju obezbijeđenu (5). Problem ishrane starih ljudi dolazi u prvi plan za angažovanje šire društvene zajednice za čitav niz olakšavajućih mjera kroz nabavku, spremanje i adekvatan odabir potrebnih namirnica za ishranu. Obaveza je i zdravstvene službe da putem primarne zdravstvene zaštite, uključujući kućnu njegu i kućno liječenje, problem ishrane starih ljudi shvati kao značajnu preventivnu mjeru u sprečavanju patološke starosti i da ulože dovoljno truda da njihovi savjeti i prijedlozi vezani za ishranu budu prihvaćeni od strane starog čovjeka.

Osnovni principi ishrane starih ljudi su da je energetski unos nešto manji nego u aktivno doba (oko 2250 Kcal za muškarce ili 9450 kJ i oko 2000 Kcal, odnosno 8400 kJ za žene), da sadrži 1 g bjelančevina na kg težine (idealne), od toga 50% životinjskog porijekla, oko 70 g masti biljnog porijekla, oko 340 g ugljikohidrata, izbjegavajući bijeli šećer (uzima se kroz odgovarajuće prehrambene artikle — voće, povrće, hljebne materije). Svakodnevno je potrebno vitamina A oko 5000 I.J., vitamina B_1 1,7 mg, vitamina B_2 oko 8 mg, vitamina C oko 75 mg, kalcija oko 800 mg i željeza oko 12 mg (11). Obroci trebaju po veličini da su uglavnom izjednačeni i raspoređeni u oko 5 vremenskih razdoblja sa razmakom od oko 3—3,5h. Ovaj ritam ishrane je osobito važan za starog čovjeka koji boluje od dijabetesa, a važno je napomenuti da dijabetes koji se javi u starijim godinama, a glikemija na tašte ne prelazi vrijednosti iznad 7,2 se može smatrati fiziološkom granicom tolerancije. Zbog česte opstipacije u starosti, preporučuje se voće i povrće sa više celuloze, preporučuje se pijenje dovoljne količine vode i neslatkih voćnih sokova, radi odstranjenja putem mokraće nakupljenih toksičnih materija, jaki alkoholi se ne preporučuju, a kafa 1—2 puta dnevno 1—2 male šoljice.

Briga šire društvene zajednice o ishrani treba da bude realizirana preko mjesnih zajednica, službe socijalne zaštite, crvenog krsta, gerijatrijskih klubova, institucija za dnevni ili kompletni boravak starih ljudi, i da za sve stare ljude koji žive sami bude obezbijeđeno kontrolisano stanovanje sa posebnom brigom za starije od 75 godina.

Osnovno je u pristupu ishrane starih ljudi da se adekvatnom ishranom pomogne očuvanju zdravlja starih ljudi, koje je prema preambuli SZO definisano kao *stanje kompletnog fizičkog, mentalnog i socijalnog blagostanja, a ne samo odsustvo bolesti i slabosti*, a što pojednostavljeno znači da nam nije cilj, kad je ishrana u pitanju, da stari ljudi ž i v e d a b i j e l i, nego d a j e d u d a b i ž i v j e l i.

7. KRATAK SADRŽAJ

Autori iznose niz socijalno-ekonomskih i zdravstvenih faktora koji nepovoljno utiču na populaciju starih ljudi da bi se ispravno i kvalitetno mogli hraniti. Vrlo važan faktor su i činjenice da su pored narušenog zdravstvenog stanja stari ljudi opterećeni nizom porodičnih problema, počevši od slabog materijalnog stanja, neadekvatnog stana u kome žive, bolesti drugog bračnog druga, neodgovarajućom brigom vlastite djece ili, što je najteže, usamljenošću i izostankom bilo kakve društvene brige o njima, a u većem procentu su slabo ili nikako pokretni. Sve ovo uslovljava da veliki broj njih nije u mogućnosti da nabavi ili spremi hranu za sebe, a kamoli da je prilagode svojim potrebama, s obzirom na godine i istrošenost mnogih funkcija organizma. Rad sadrži i određene preporuke za ishranu starih ljudi.

SOCIOMEDICAL PROBLEMS OF NOURISHMENT IN THE THIRD AGE OF LIFE

Summary

The authors give a series of economical and health factors that influence adversely the population of old people to be fed adequately and qualitatively. A very important factor is the fact that, beside the reduced health conditions, old people are handicapped by a series of family problems — a bad economical situation, inadequate flat they live in, illness of the mate, inadequate care of their own children and, what is the most difficalt, loneliness and lack of any social care about them when they are insufficiently movable or not movable at all. All these factors cause a great number of older people not to be able to purchase or prepare food for themselves, not to mention to adapt it to their needs, taking into consideration their age and wear of many functions of their organism. In the paper there are some recommendations for nourishment of older people.

LITERATURA

(1) *Ciljevi zdravlja za sve,* Ciljevi Evropske regionalne strategije zdravlja za sve, prevod, Sarajevo 1987.

(2) Simić, B.: *Uzroci i značaj bolesti nedovoljne i preobilne ishrane starih ljudi,* »Hrana i ishrana«, 1982, Vol. 23, Br. 5—6, str. 107—113.

(3) Filipović, Adila: *Neki socijalno-medicinski aspekti starosti u urbanoj sredini BiH,* Disertacioni rad, Sarajevo, 1979.

(4) Filipović, Adila: *Analiza zdravstvene problematike starog stanovništva u SR BiH i prijedlog mjera za unapređenje zdravstvene zaštite tog segmenta stanovništva,* Zavod za zdravstvenu zaštitu BiH, Sarajevo 1987.

(5) Stojak, R., Vodopić, Š., Suljić, Lj., Filipović, A., Manojlović, P.: *Socio-ekonomski položaj starih lica u BiH,* Zavod za unapređenje socijalnih djelatnosti, Sarajevo 1990.

(6) Atanacković, V., Jovanović, S.: *Sprovođenje dijetetskih mjera u porodici starijih ljudi,* »Hrana i ishrana«, 1982, Vol. 23, br. 5—6, str. 129—133. 1982.

(7) Satler, J.: *Gastroenterološki problem u starosti,* Gerijatrija i Izabrana poglavlja za liječnike opšte medicine, IX Seminar za stručno usavršavanje, Opatija 1978, str. 92—102.

(8) Rezaković, Džemal: *Problemi eritropeze u starosnoj dobi od 60—80 g.* Doktorska dizertacija, Sarajevo 1970.

(9) Suić, Miljenko: *Život i zdravlje starih osoba,* Jugoslovenska medicinska naklada Zagreb, 1981.

(10) Simić, B.: *Medicinsko socijalni aspekti profilakse bolesti preobilne i nedovoljne ishrane starih ljudi,* 1974, Narodno zdravlje, God. XXX. Br. 3—4, str. 73—79.

(11) Brodarec, A., Antonić, K.: *Planiranje ishrane u ustanovama za zbrinjavanje osoba starije dobi,* Hrana i ishrana, 1982, Vol. 23, Br. 5—6, str. 123—127.

KOMPLEKSNA DISRITMIJA I KARDIOMIOPATIJE DOJENČETA

HASNA MESIHOVIĆ, S. DINAREVIĆ, Ž. RONČEVIĆ, H. ČENGIĆ, H. TERZIĆ, V. LOJPUR

Klinika i poliklinika za dječije bolesti »Prof. M. Sarvan«, Sarajevo

UDC 616.12 : 616—053.2

Apstrakt. Na Dječijoj klinici u Sarajevu u mjesecu julu 1988. god. hospitalizirano je žensko dojenče staro 5 mjeseci sa kompleksnom disritmijom i dilatirajućom kardiomiopatijom, rezistentnom na četiri antiaritmika, uz srčanu dekompenzaciju koja nije reagovala na Digoxin, te je predstavljala pravi terapijski problem. U prve tri sedmice dojenče je bilo pod parenteralnom kardiotoničnom terapijom, diureticima te euritmicima od kojih je primala: Isoptin, Rhythmocin, Gilurythmal i Novocamid. Od 20. dana u terapiji se uvodi Minsetil (meksiletin hidrohlorid) nakon čega dolazi do uspostavljanja sinusnog ritma, što je u skladu sa studijom autora iz Bromptom Hospital, London (11).

Ključne riječi: dilatirajuća kardiomiopatija dojenčeta, kompleksna disritmija, hipertrofična kardiomiopatija, hipertrofična opstruktivna kardiomiopatija, antiaritmik-Minsetil.

Kardiomiopatije su još uvijek predmet stalnih naučnih usaglašavanja. Goodwin (1972—3) smatra da su kardiomiopatije primarna oboljenja srčanog mišića nepoznate etiologije. Schmaltz (1986—9) ih dijeli na: 1. primarne idiopatske — čiji je uzrok nepoznat; i 2. sekundarne, kod kojih je poznat uzrok oboljenja.

Primarne kardiomiopatije:

1. Hipertrofične:

a) sa asimetričnom hipertrofijom septuma (prisutna je opstrukcija izlaznog trakta lijevog ventrikula);

b) sa koncentričnom hipertrofijom septuma (nema opstrukcije);

2) Kongestivne (dilatirajuće kardiomiopatije);

3) Restriktivne (obliterirajuće kardiomiopatije);

1) Hipertrofična kardiomiopatija

Predstavlja primarno nasljedno oboljenje srčanog mišića sa hipertrofijom pojedinih segmenata lijevog ventrikula a bez dilatacije. Nasljeđuje se autosomno dominantno kod 60% slučajeva; kod ostalih 40% ovo se ne može dokazati. Sinonimi su: asimetrična hipertrofija

srca, idiopatska hipertrofična subaortna stenoza (IHSS), hipertrofična obstruktivna kardiomiopatija, idiopatska muskularna subaortna stenoza, asimetrična hipertrofija septuma.

Hemodinamska klasifikacija hipentrofičnih kardiomiopatija prema gradijentu:

— Opstruktivna: gradijent pritiska LV/AO = 30 mmHg (bazalni uslovi);
— Provokabilna: gradijent pritiska najmanje 30 mmHg (ali nije prisutan pod bazalnim uslovima, nego se može izazvati Valsalvinim pokusom);
— Neopstruktivna: gradijent nije prisutan ni pod bazalnim uslovima niti se može provocirati. Distribucija po polu: M : Ž = 65% : 35%.

2) Kongestivna (dilatirajuća) kardiomiopatija

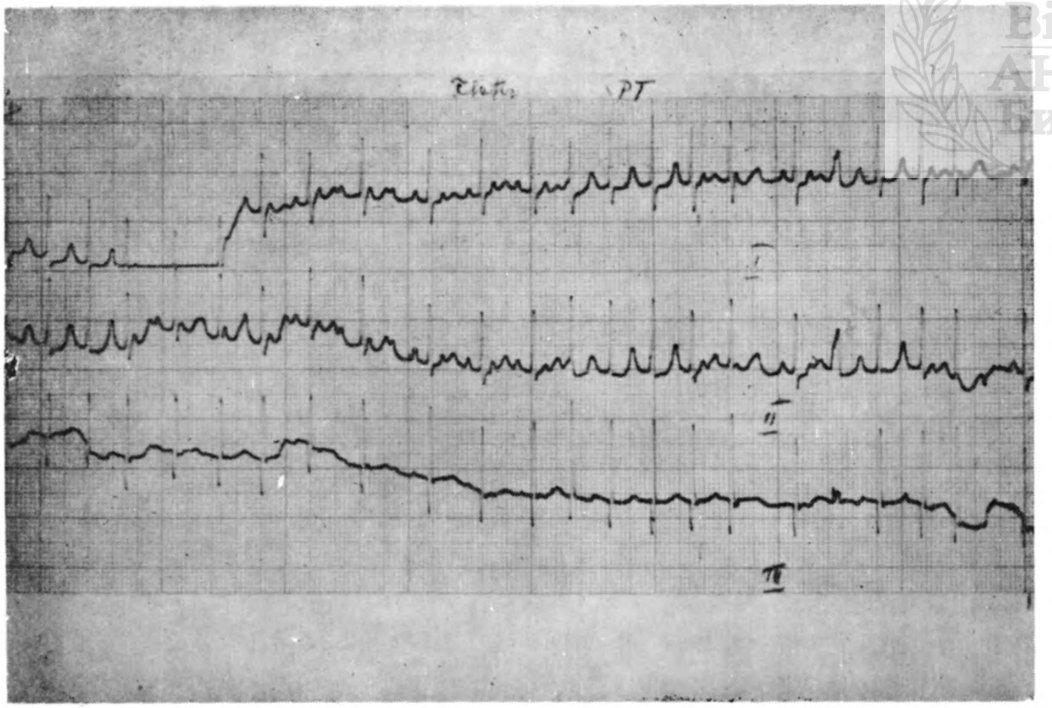
Uzroci oboljenja su nepoznati, ali sljedeći faktori mogu imati uticaja na razvoj ove kardiomiopatije: miokarditis, difterija, toksini, imuno-alergijski faktori, prolazni spazmi miokardne mikrocirkulacije. Kod ove kardiomiopatije česti su poremećaji srčanog ritma.

Na različite nokse miokard jedinstveno reaguje, pa u diferencijalnoj dijagnozi dolazi u obzir:

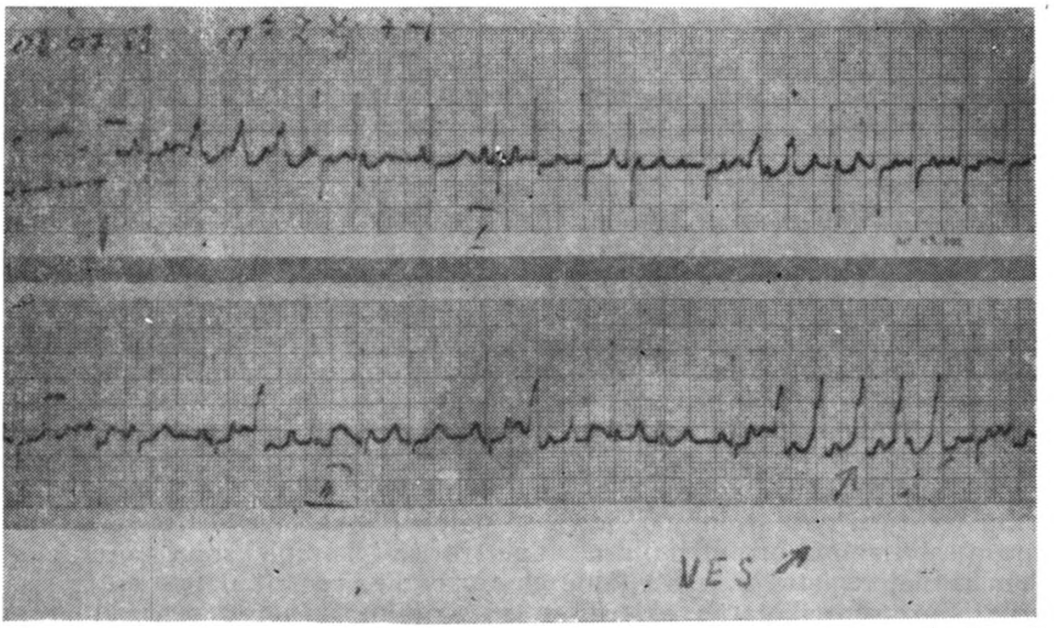
— miokarditis: serološki je teško dokazati s obzirom da dolaze u obzir brojni virusi kao mogući uzročnici, a histološki se ne dobije uvijek reprezentativan uzorak;
— endokardijalna fibroelastoza: predstavlja zadebljanje endokarda bez bitnog učešća miokarda i može se pouzdano razlučiti ehokardiografski i biopsijom;
— Bland-White-Garlandov sindrom: anomalno isticanje lijeve koronarne arterije iz arterije pulmonalis — daje sliku infarkta miokarda a ehokardiografski se razvija kardiomiopatija. Dilatirajuća kardiomiopatija ehokardiografski se karakterizira: dilatacijom lijevog ventrikula uz oskudno izraženu hipertrofiju, te oslabljenu kontraktilnost stražnjeg zida lijevog ventrikula, te istanjenim interventrikularnim septumom. Dilatacija je oblik kompenzacije — srce, povećavajući dijastolno punjenje održava funkciju.

Kod 3/4 bolesnika početak bolesti je u prve dvije godine života; uz febrilnu epizodu uradi se i Rtg snimak srca i pluća i slučajno se otkrije kardiomegalija. Klinički znaci oboljenja su: malaksalost, zastoj u napredovanju, tahipnea, kašalj, periferna cijanoza, edemi. Na srcu se auskultira sistolni šum parasternalno lijevo II st. po Levinu, prisutan je i 3. i 4. ton. Nekada je samo prisutna perzistentna tahikardija. EKG-ski: znaci lijeve ventrakularne hipertrofije sa poremećajima repolarizacije. Tačna dijagnoza se postavlja transvaskularnom biopsijom. Trajanje života je skraćeno. Iznenadna smrt je, prema svjetskim statistikama, notirana kod 35% slučajeva. U terapiji se uz mirovanje ordiniraju i kardiotonici, diuretici, prevencija tromboembolija i antiaritmici. Dilatirajuća kardiomiopatija je kandidat za transplataciju srca.

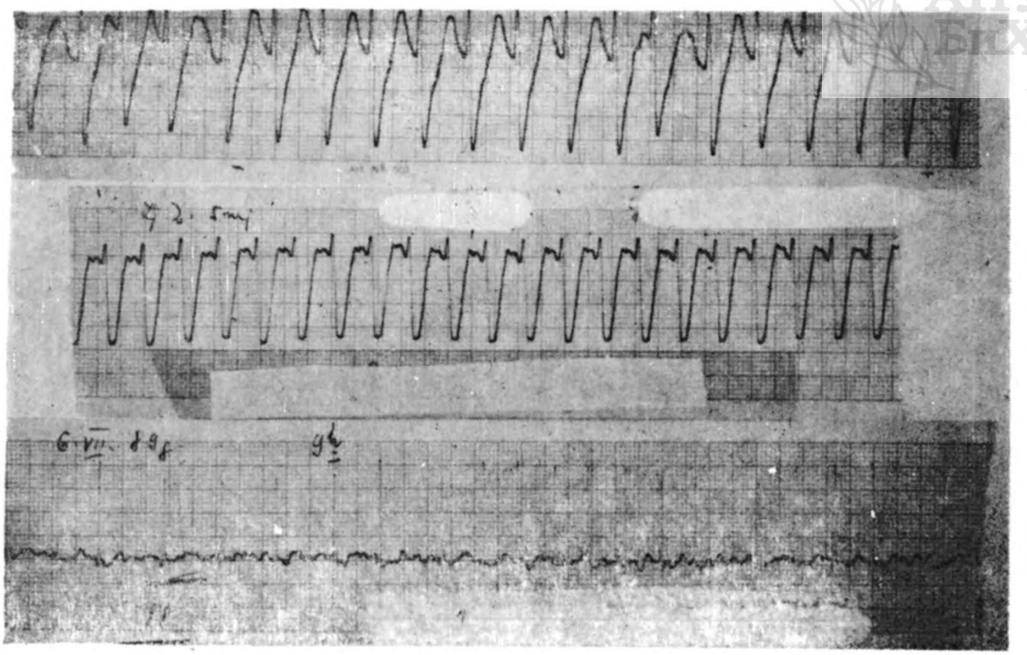
Anamnestički: žensko dojenče staro 5 mjeseci premješteno je na Dječiju kliniku zbog nemogućnosti uspostavljanja regularnog srčanog ritma. Drugo je dijete iz treće trudnoće koju je majka teško »nosila«, povraćala je, a od 1 mjeseca trudnoće uzimala je neke »lijekove protiv povraćanja«. Prva trudnoća uredna, porod terminski uredan, dijete zdravo, sada je staro 4 godine. Druga trudnoća završila je spontanim abortusom u 5 gestacijskom mjesecu. Treći porod (dijete koje se prikazuje) je terminski, spontan, plodna voda zamućena, dijete po porodu plavo, ne diše, te se po provedenoj reanimaciji liječi još 13 dana u porodilištu. Po izlasku iz porodilišta, normalno se razvija do 5 mjeseca kada se razboljelo sa visokom temperaturom, odbijalo je hranu, bilo uznemireno, imalo je perioralnu cijanozu i bljedilo. Iz statusa kod prijema: febrilno, dispnoično, blijedo, sa perioralnom cijanozom. Na plućima auskultatorno strugavo disanje. Cor: akcija srca aritmična, ubrzana (300/min) srčani tonovi tiši, uz sistolni šum jačine do II st. po Levinu uz lijevi rub strenuma, jetra se palpira za 3,5 cm. EKG: dekstrogram sa znacima biventrikularne hipertrofije i kompleksnim poremećajem ritma, registruju se atrijalne ekstrasistole, ventrikularne ekstrasistole, supraventrikularne ekstrasistole, atrijalni flatter i ventrikularna tahikardija. Elektrokardiografske promjene date su na slikama od broja 1 do 5.



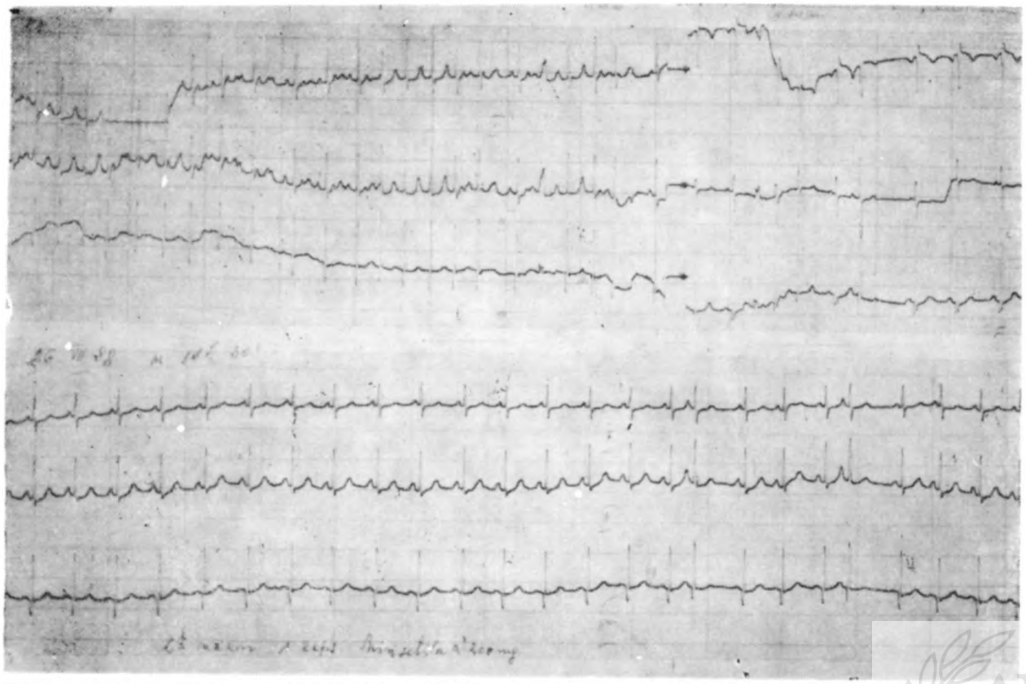
Slika 1. Na elektrokardiogramu registrovana je kompleksna disritmija — SPT: supraventrikularna paroksizmalna tahikardija, flatter atrija, pojedinačne ventrikularne ekstrasistole i supraventrikularne ekstrasistole



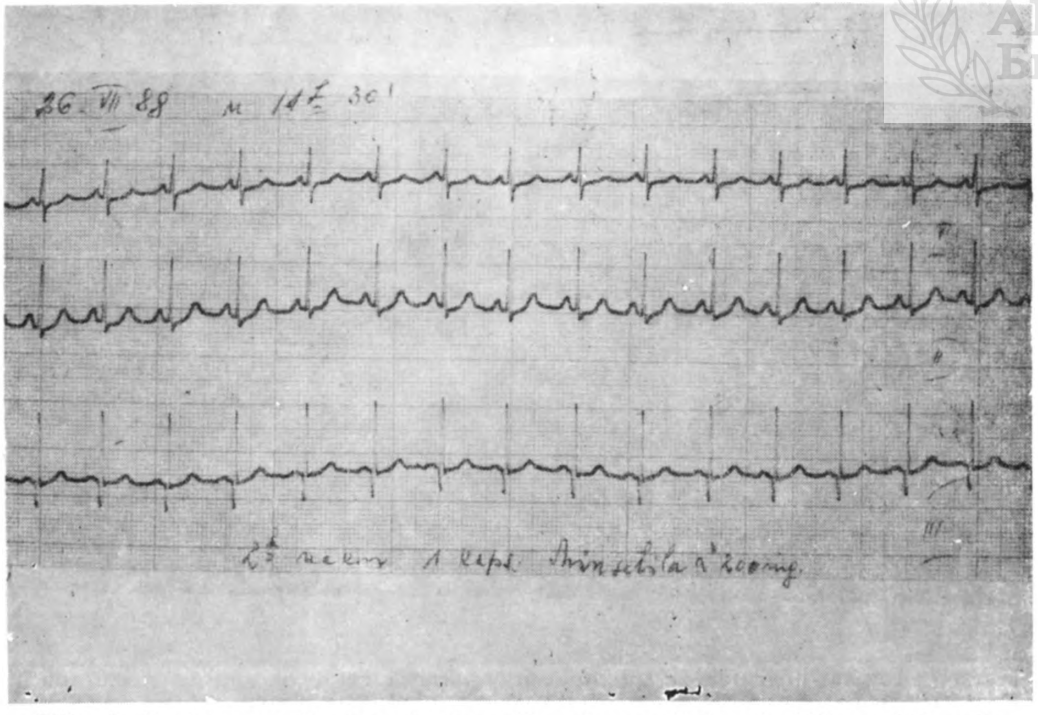
Slika 2. Registrovan je kompleksni poremećaj ritma sa salvama ventrikularnih ekstrasistola, što je dosta rijetko kod djece



Slika 3. Registrovana je paroksizmalna ventrikularna tahikardija

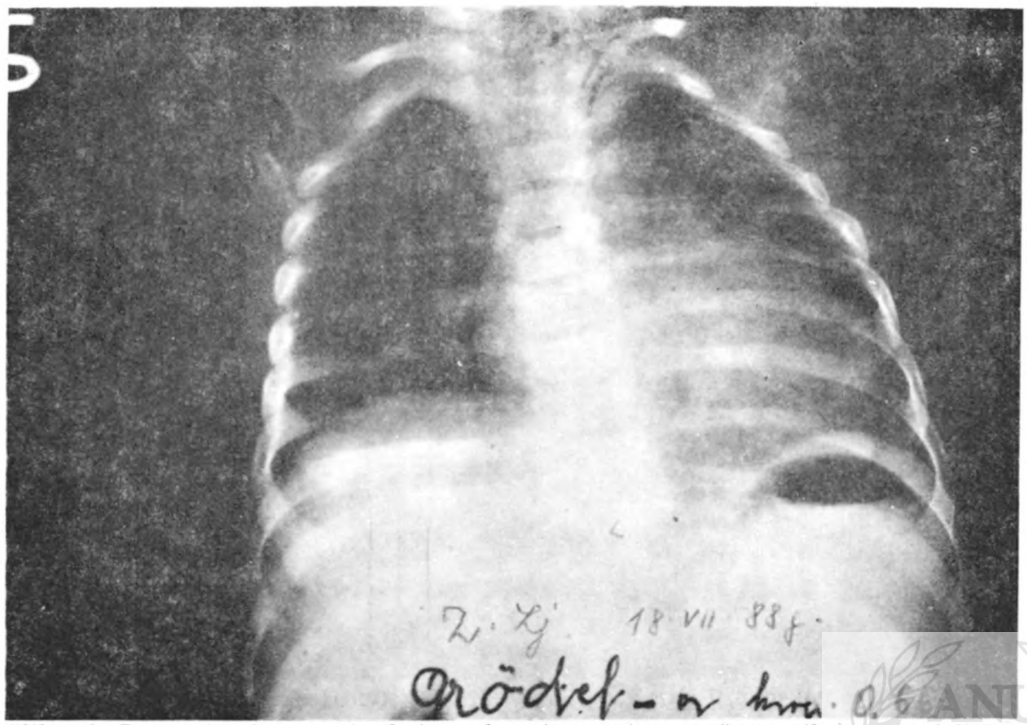


Slika 4. Kompleksna disritmija (flatter atrija, supraventrikularne ekstrasistole) kao i uspostavljanje sinusnog ritma 2 sata nakon ordiniranja 1 caps. Minsetila

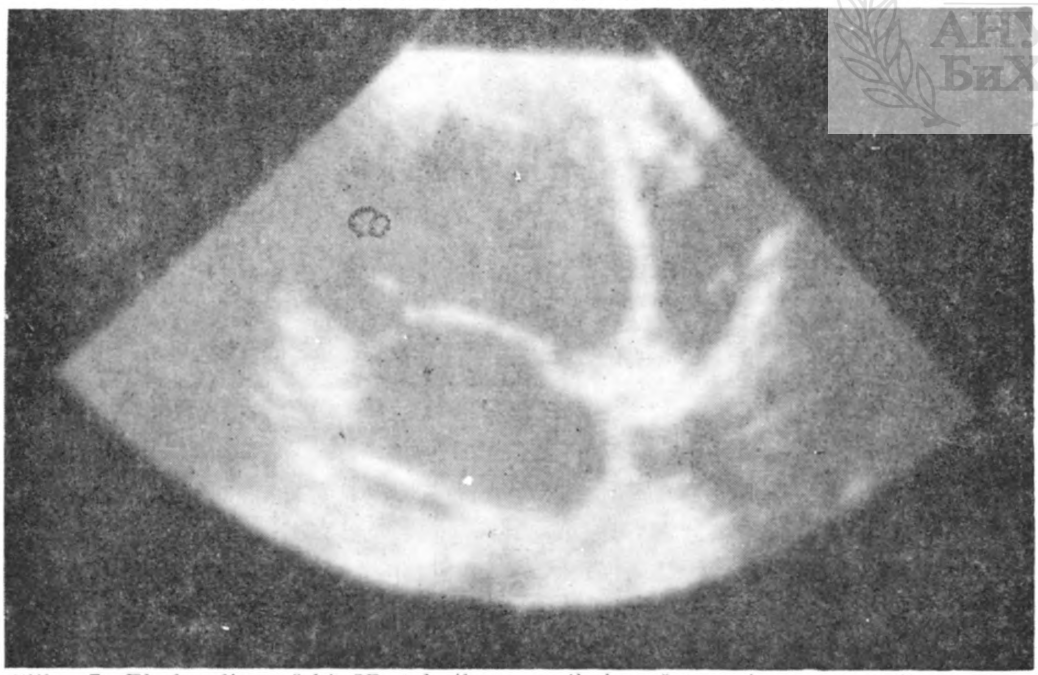


Slika 5. Registrovan je sinusni ritam 2h nakon ordiniranja 200 mg Minsetila

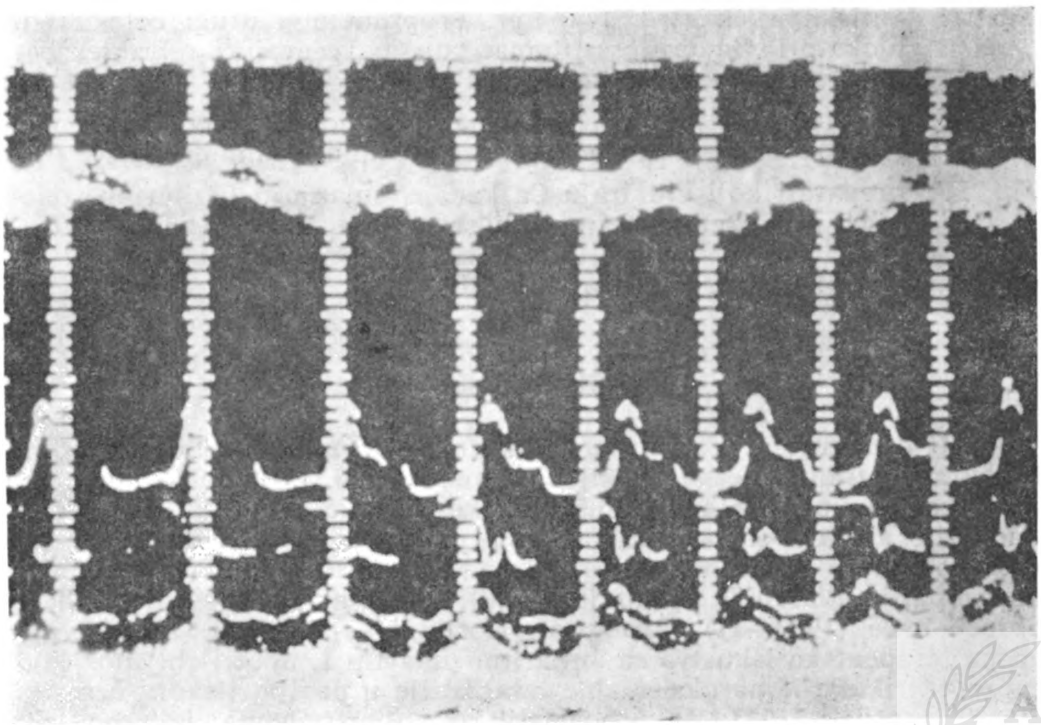
ANU ВіН АНУ БиХ



Slika 6. Rtg snimak srca i pluća pokazuje uvećanu srčanu siluetu u cjelini, a naročito uvećan lijevi ventrikul, te pojačan bronhovaskularni crtež



Slika 7. Ehokardiografski 2D tehnikom, apikalno četvorokomorno prikazana je, dilatirajuća kardiomiopatija, gdje su veoma proširene lijeve srčane šupljine — lijevi ventrikul i lijevi atrij te istanjen interventrikularni septum



Slika 8. Ehokardiografski 1D tenhikom prikazan je uvecan lijevi ventrikul i neizdašni pokreti interventrikularnog septuma kod dilatirajuće kardiomiopatije.

Kod dojenčeta većina laboratorijskih nalaza bila je u granicama normale, sem prisutne leukocitoze u krvnoj slici. RVK na viruse negativna. U prve tri sedmice dojenče je bilo pod parenteralnim kardiotonicima, diureticima te eureticima bez efekta; primijenili smo Minsetil 200 mg per os kada se nakon 2 sata uspostavlja sinusni ritam.

Klasifikacija antiaritmičnih lijekova

Tip I Lijekovi koji i reduciraju maksimalnu brzinu C faze depolarizacije (V max) blokiranjem ulaska Na u tkiva sa brzim odgovorom;

A smanjuje V max. pri svim srčanim frekvencijama, produžuje trajanje akcionog potencijala (npr. Kinidin, Prokainamid, Disopiramid);

B slab efekat pri sporim frekvencijama na V max. u normalnim tkivima. Efekat se pojačava pri brzim frekvencijama. Akcioni potencijal bez promjena ili smanjen (npr. Lidokain, Tenitoin, Tokainid, Meksiletin);

C smanjuje V max. pri normalnim frekvencijama u normalnim tkivima. Minimalni efekat na trajanje akcionog potencijala (npr. Enkainid, Lorkainid, Flekainid);

Tip II antisimpatička sredstva, npr. Propranolol i drugi beta-adren. blokatori. Smanjuju automatizam, povećavajući refrakternost A V čvora, smanjuju brzinu provođenja;

Tip III sredstva koja produžavaju trajanje akcionog potencijala u tkivima sa brzim odgovorom, npr. Bretilium, Amiodaron;

Tip IV preparati koji blokiraju Ca kanale, smanjuju brzinu provođenja i produžavaju refrakternost u tkivima sa sporim odgovorima, npr. Verapamil, Diltiazem *(Harrison Principles of Internal Medicine,* McGrow Hill, 1987).

DISKUSIJA I ZAKLJUČCI

U literaturi se kompleksna disritmija udružena sa dilatirajućom kardiomiopatijom rijetko opisuje, Schmaltz et al. (1986—9) je dao podjelu kardiomiopatija kao i opis kliničke slike kod dilatirajuće kardiomiopatije, što je u saglasnosti sa našim prikazom slučaja. Isti autor navodi podatke o velikoj učestalosti iznenadne smrti kod dilatirajuće kardiomiopatije. Clarke B. et all (1987—10), Till et all (1987—10) te Till et Shinebourne (1989—11), Brompton Hospital — London, saopštavaju slična terapeutska iskustva sa antiaritmicima tip 1, upotrijebljenog kod supraventrikularne paroksizmalne tahikardije u pedijatrijskom uzrastu. Harrison et all (1987—4) u poglavlju o antiaritmicima daje podjelu antiaritmika gdje lijek koji smo upotrebili kod našeg pacijenta, spada u tip 1, podgrupa B. Shodno naprijed navedenom, upotrijebili smo kod dojenčeta koje je bilo rezistentno na 4 antiaritmika (Isoptin, Rhythmocin, Giluritmal, Novocamid) Meksiletin (meksiletin hidrohlorid) 200 mg per os, te nakon 2 sata dolazi do uspostavljanja sinusnog ritma, koji se održava. Važno je istaći da smo ovim radom pokazali da je primjena novog euritmika u dojenačkom dobu efikasna u tretmanu kompleksnih disritmija, kao što su pokazali autori iz studije Brompton Hospital — London (11). Dojenče je sada u dobrom opštem stanju, čiji elektrokardiogram pokazuje sinusni ritam.

COMPLEX DYSRHYTHMIA AND CARDIOMYOPATHIAE OF INFANT

Summary

An 5 months old infant was hospitalised at the Paediatric clinic in Sarajevo, which was a real therapeutic problem with complex disrhythmias and dilatation cardiomyopathy. The infant was resistent to 4 antiarrhythmic drugs combined with heart decompensation resistent to Digoxin.

During the first three weeks the infant was treated with parenteral cardiotonic therapy, diuretics and antiarrythmics: Isoptin, Rhythmochin, Gilurythmal and Novocamid. From the twentieth day on, Minsetil (mexiletin hydrochlorid) was included in the therapy, which was soon followed by the establishment of sinus rhythm, comparable with London study (11).

Key words: dilatation cardiomyopathy, Complex disrhythmia, hypertrophic cardiomyopathy, antiarrythmic-Minsetil.

LITERATURA

(1) Clarke, B., Till, J., Rowland, E. et al.: *Rapid and Safe Termination of Supraventicular Tachycardia in Children by Adenosine,* Department of Cardiology, Brompton Hospital, London GBR — Lancet 1987; 1/9528: 299—301.

(2) Flaker, G. C., Madigan, N. P., Alpert, M. A., Moser, S. A.: *Mexiletine for Reccuring Ventricular Arrhythmias: Assessment by Long-Term Electrocardiographic Recordings and Sequential Electrophysiologic Studies.* AM Heart J 1984; 108: 490—5.

(3) Goodwin, J. F., Oakley, C. M.: *The cardiomyopathies.* Br Heart J 1972; 34: 545.

(4) *Harrison's Principles of Internal Medicine: Clasification of Antiarrythmic drugs;* Elevents edition; McGrow Hill Book Company 1987; p. 935.

(5) Hordof, A., Steg, C., Davies, M., Rosen, M. R.: *Variability of Ventricular Ectopis Frequency in Children with Chronic Ventricular Arrhythmias.* Circulation 1983; 68 (suppl III): 328.

(6) Johansson, B. W., Stavenow, I., Hanson, A.: *Long-term Clonical Experience with Mexiletine.* Am Heart J 1984; 107: 1099—102.

(7) Krongrad, E., Hordof, A. J.: *Tachycardias in Children.* In: Surawicz B., Reddy CP., Prystowsky EN., eds. *Tachycardias.* Boston: Martinus Nijhoff. 1984; 319—54.

(8) Rutledge, J. C., Harris, F., Amsterdam, E. A., Skalsky, E.: *Clinical Evaluation of Oral Mexiletine Therapy in the Treatment of Ventricular Arrhythmias.* J Am Coll Cardiol 1985; 6: 780—4.

(9) Schmaltz, A. A.: *Kardiomyopathien im Kindesalter.* Klin Pädiatrie 1986; 198(1): 1—7.

(10) Till, J., et al.: *Succesful Management of Refractory SVT in Children Using Adenosin and Flecainide Acetate.* Department of Paediatric Cardiology, Brompton Hospital, London. Abstracts of the XXII Annual General Meeting of the Association of European Paediatric Cardiologists, 1987.

(11) Till, J. A., Shinebourne, E. A. et all.: *Paediatrie Use of Flecainide in Supraventricular Tachycardia; Clinical Efficacy and Pharmacokinetiks.* Department of Paediatric Cardiology, Brompton Hospital, London SW 3 6HP GBR Br. heart. J. 1989; 62/2 (133—139).

ANU
BiH
АНУ
БиХ

UTICAJ METABOLIČKIH POREMEĆAJA NA TOK I ISHOD PROLJEVNE DEHIDRACIONE TOKSIKOZE DOJENČADI

LUTVO HODŽIĆ
Klinika i poliklinika za dječije bolesti »Prof. Milivoje Sarvan«, Sarajevo

UDC 616.34-053.2:615.9

Apstract. Autor je ispitivao sudbinu 161 djeteta oboljelog od proljevne dehidracione toksikoze (PDT). Ispitivan je značaj pojedinih metaboličkih promjena na tok i ishod PDT.

Utvrdio je dosta visoku smrtnost (24,22%) i oštećenost na kontroli (17,39%). Preživjelo i ostalo zdravo 58,39% bolesnika.

Najčešći vid dehidracije bila je izonatremijska 67,80%, hipernatremijska 31,51%. Statistički nismo mogli dokazati uticaj na lošu prognozu vrste dehidracije. Što je dehidracija bila veća i duže trajala to je prognoza bila lošija, a to je i statistički dokazano. Ni visina natrija nije favorizovala konvulzije kao što je to činila visoka temperatura, nizak pH i dužina trajanja poremećaja svijesti. Postojala je signifikantna razlika među grupama ispitivane djece kod hiperpireksija. Sa hiperpireksijom išao je porast konvulzija i teže promjene u koagulogramu, EEG i EKG. Hipoksične i anoksične promjene smo pratili preko EEG, EKG i stepena i dužine poremećene svijesti.

Ključne riječi: proljevna dehidraciona toksikoza, dehidracija, hipoksija, anoksija, metabolički poremećaj.

UVOD

U evropsku medicinsku literaturu pojam toksikoze je uveden krajem devetnaestog vijeka. Proljevna dehidraciona toksikoza (PDT) dojenčadi i male djece je najteži vid akutnog gastroenteritisa, gdje u kliničkoj slici, pored gastroentestinalnih simptoma, dominiraju poremećaji svijesti, znaci hipovolemijskog šoka i znaci poremećaja vitalnih organa (1). Pod pojam toksikoze danas se uključuje ne samo PDT već i neurotoksikoza, sepsa, endotoksični šok, Reye sindrom (hepatocerebralni sindrom), virusni encefalitis, hemolitičko-uremični sindrom (2, 3, 4). Najčešći oblik toksikoze u svijetu je proljevna dehidraciona toksikoza (4).

U kliničkoj slici toksikoze dominira izrazito teško opšte stanje dojenčeta. Ono je prouzrokovano gubitkom tečnosti i minerala, što dovodi dječiji organizam u stanje hipovolemije do hipovolemijskog šoka. Krajnja posljedica hipovolemije je hipoksija ili anoksija ćelije. Ovisno o stepenu hipovolemije i dužine njenog trajanja u krajnjem slučaju

zavisi tok toksikoze a i njen ishod. Sigurno da razni poremećaji metabolizma, a prije svega acidobaznog statusa, koagulacije, stvaranje hiperpireksije, pojava konvulzija, oštećenja funkcija pojedinih organa, pored hipoksije i anoksije, igraju veoma važnu ulogu u toku i ishodu PDT.

CILJ RADA

Cilj rada je bio da utvrdimo kakav uticaj imaju pojedine metaboličke promjene na tok i ishod PDT. U radu smo pratili smrtnost i preživljavanje dojenčadi, te kvalitet preživljavanja.

MATERIJAL I METODE

Naš materijal sačinjavalo je 161 dojenče oboljelo od PDT. Rad je bio retrospektivan i obuhvata period od 1977—1983. godine. Podaci za obradu uzimani su iz istorija bolesti i unošeni u individualni protokol za svako dijete.

U obradu su uzeta samo ona djeca sa pretpostavkom da bi njihov psihomotorni razvoj bio normalan da nisu oboljela od najtežeg oblika gastroenteritisa. Zbog toga u obradu nisu uzeti slijedeći bolesnici:

1. rođeni kao prematurusi,
2. koji su u anamnezi imali bilo kakav riziko faktor prenatalno, natalno i postnatalno;
3. djeca koja su bila oštećena u svom psihomotornom razvoju prije nastanka toksikoze;
4. djeca koja su gubila tečnost isključivo van digestivnog puta;
5. djeca koja su uz proliv imala još neko drugo oboljenje koje je moglo dovesti do promjena u psiho-motornom razvoju (encefalitis, meningitis, intrakranijalno krvarenje, sepsa, Reyeov sindrom) poslije preležane bolesti;
6. djeca koja su u anamnezi imala jednom ili više puta febrilne li druge konvulzije prije nastanka PDT.

Dijagnoza PDT postavljena je na osnovu anamneze, statusa pri dolasku, toka bolesti i laboratorijskih pretraga.

Najveći broj naših bolesnika (80%) su bila dojenčad do 6 mj. Bolovala su podjednako muška i ženska djeca koja su bila eutrofična. Najveći broj bolesnika poticao je iz siromašnih porodica gdje su majke po zanimanju domaćice (preko 75% slučajeva). Najčešće se bolovalo zimi, a 81% bolesnika bilo je na vještačkoj ishrani.

METODE

Od metaboličkih parametara pratili smo slijedeće: ABS mineralogram, šećer u krvi i urea, krvnu sliku, poremećaj koagulacije, tjelesnu temperaturu i hipoksiju preko indirektnih pokazatelja, kao što su EKG, EEG, pojava konvulzija i poremećaja svijesti.

Gasne analize uzimane su po ASTRUP-u na aparatu tipa BMS-2 MK-2 »Radiometer« Kopenhagen. ASTRUP je uziman odmah po prijemu djeteta.

Kompletna krvna slika rađena je kompjuterski na aparatu »PN«, model 1970, firme »Conlter Counter«.

K i Na je rađen plamenfotometrijski na aparatu »Evans« tip 100.

Ca je rađen kolonometrijski sa orto-krezol ftalein kompleksanom.

Mg je rađen kolorimetrijski sa titan žutilom.

Cl su rađeni titrametrijski po Schalesu.

ŠUK je rađen heksakinazom enzimatski.

Urea je rađena enzimatski sa ureazom.

EKG je rađen odmah po dolasku i praćen je na jednokanalnom aparatu proizvodnje EI Niš, tip Hellige.

EEG je rađen na dvanaestokanalnom elektroencefalografu firme »Scheworzer«, tip E 1200.

Koagulogram je rađen savremenim standardnim metodama koje se inače rade u svijetu.

Kategorisani podaci predstavljeni su u obliku dvodimenzionalnih tabela.

Podaci su statički obrađeni po Pearsonovoj X^2 statistici. Posmatrani parametri su uzeti na nivo signifikantnosti 0,05, a neke statističke tabele su urađene na računaru Sperry Univac u Cobol programskom jeziku.

NAŠI REZULTATI:

Na tabeli br. 1 se vide naši konačni rezultati, gdje je od 161 posmatrano dijete umrlo u toku liječenja 39, ili 24,32%. Preživjelo je toksikozu i na kontrolnom pregledu (najmanje poslije 6 mj. od otpuštanja iz bolnice) ostalo potpuno zdravo 94, ili 58,39 bolesnika. Preživjelo je i na kontroli bilo oštećeno 28, ili 17,39%.

Tabela 1. SMRTNOST I PREŽIVLJAVANJE BOLESNE DOJENČADI SA PROLJEVNOM DEHIDRACIJOM TOKSIKOZOM (POT)

Bolesnici	BROJ	%
Umrli	39	24,22
Oštećeni	28	17,39
Zdravi	94	58,39
Ukupno	161	100

Tjelesna temperatura, kao jedna od osnovnih homeostaza u organizmu kod naših bolesnika, imala je direktnog utjecaja ne samo na lošiji tok već i na lošiju prognozu ukoliko je bila hiperpirektična, što se vidi na tabeli br. 2.

Tabela 2. VRIJEDNOST TJELESNE TEMPERATURE KOD LIJEČENJA DOJENČADI PDT

	TT° < 37		37 — 38		38,1 — 39		39,1 — 39		> 40		Ukupno
Umrli	7	17,95%	2	5,12%	2	5,12%	5	12,82%	23	58,97%	39
Oštećeni	1	3,57%	2	7,11%	5	17,86%	8	28,57%	12	42,86%	28
Zdravi	6	3,38	18	19,15%	15	15,96%	25	26,59%	30	31,92%	94
											161

Proporcionalno i apsolutno najviše temperature pogađaju najčešće umrlu, pa oštećenu djecu, a najmanje onu koja su poslije liječenja ostala zdrava. To je i statistički dokazano da postoji signifikantna razlika po grupama i vrijednosti tjelesne temperature jer je $X^2 = 20{,}7072433 > 15{,}5506175$ odnosno $p < 0{,}05$.

U našem radu mi nismo našli ovisnost visoke temperature i pojave hipernatremije i ozbiljnih poremećaja u metabolizmu Cl^-, K^+ jona, ali jesmo Ca^{++} jona, jer sa porastom visoke temperature opada vrijednost Ca u krvi i javlja se hipokalcemija, jer smo 2/3 djece sa hipokalcemijom našli u grupi djece sa hiperpireksijom. Nađen je veliki broj patoloških koagulograma kod djece sa hiperpireksijom, kao i veoma veliki broj patoloških EEG-a. Visoka temperatura i pojava konvulzija idu jedni sa drugim, jer je u grupi djece sa visokim temperaturama bilo 2 puta više djece sa konvulzijama nego u grupi sa tjelesnom temperaturom nižom od 39°C. Promjene šećera u krvi u smislu hiperglikemije ili hipoglikemije su najviše zastupljene kod djece sa hiperpireksijom.

Naši bolesnici gubili su tečnost preko digestivnog trakta i to prolivom, povraćanjem, ali i preko kože i disanjem u velikom broju te zbog visoke temperature. Najčešća je bila izonatremijska dehidracija u 67,80% slučajeva, hipernatremijska u 31,51% i hiponatremijska u 0,69% slučajeva. Vrijednost jonograma dati su na tabeli br. 3.

Tabela 3. VRIJEDNOST JONOGRAMA KOD LIJEČENE DOJENČADI U PDT
Broj bolesnika

	IZO	HIPER	HIPO	Ukupno bolesnika
Na	99 ili 67,81%	46 ili31,51%	1 ili 0,68%	146
Cl	56 ili 47,82%	65 ili 49,19%	7 ili 5,65%	138
K	51 ili 35,66%	56 ili 38,16%	36 ili 25,18%	143
Ca	73 ili 52,52%	/	66 il 47,48%	139
ŠUK	45 ili 34,62%	47 ili 36,15%	38 ili 29,23%	130
UREA	50 ili 39,37%	70 ili 55,12%	7 ili 5,51%	127

Normalne ili referentne vrijednosti su·

Na 130 — 150 mmol/l
Cl 99 — 108 mmol/l
K 4 — 5 mmol/l
Ca 2,25 — 2,75 mmol/l
Šećer u krvi 3,6 — 6,0 mmol/l
N urea 1,78 — 7,14 mmol/l

Vrsta dehidracije nije uticala na prognozu bolesnika, što se vidi na tabeli br. 4.

Tabela 4.VRIJEDNSOT Na KOD DJECE U PDT

Vrijednost Na	Izonatremia	Hipernatremia	Hiponatremia	Ukupno bolesnika
Umrli	17 ili 65,38%	8 ili 30,76%	1 ili 3,84%	26
Oštećeni	23 ili 82,15%	5 ili 17,85%	/	28
Zdravi	59 ili 64,13%	33 ili 35,87%	/	92
				146

Najveći procenat po ispitivanim grupama dojenčadi odnosio se na djecu u izonometriji, znatno manje u hipernatremiji, tako da statistički među posmatranim grupama u cjelosti vrijednost natrija nije imala statistički signifikantnih razlika na ishod i kvalitet preživljavanja, pa je $X^2 = 8,84134297 < 9,49$, odnosno $p > 0,05$.

Vrsta dehidracije nije uticala ni na pojavu konvulzija, što se vidi na tabeli br. 5.

Tabela 5. NATRIJUM I KONVULZIJE U PDT

Konvulcije Natrijum	Sa konvulzijama	Bez konvulzija
Izo	56	43
Hiper	28	18
Hipo	0	1

Tabela br. 6 pokazuje da nismo našli korelaciju između pojave konvulzija i visine Na jona, što je i statistički dokazano da nema signifikantne razlike, pa je

$$X^2 = 1,60229693 < 5,99 = p > 0,05$$

Međutim, brzina gubitka velikih količina tečnosti u kratkom ili dužem intervalu imala je uticaja na prognozu, što se vidi na tabeli br. 6.

Tabela 6. BRZINA GUBITKA TEČNOSTI

	Do 12 h	12 — 24 h	24 — 48 h	Preko 48 h	Ukupno
Umrli	6 ili 15,38%	8 ili 20,52%	5 ili 12,82%	20 ili 51,28%	39
Oštećeni	6 ili 21,43%	9 ili 32,14%	5 ili 17,84%	8 ili 28,57%	28
Zdravi	3 ili 3,19%	22 ili 23,40%	21 ili 22,34%	48 ili 51,07%	94

Umrla i zdrava djeca vremenski su sporije došla u teško stanje hipovolemijskog šoka jer su sporije, tj. duže vremena gubila tečnost. Oko 50% ovih bolesnika imali su gubitak tečnosti do 24 h, a preko 50% ovih bolesnika imali su gubitak tečnosti preko 24 h.

U grupi djece koja su poslije preživljavanja ostala oštećena samo 28% je gubilo tečnost duže od 24 h, dok je 72% gubilo unutar 24 h. Zato i postoji statistički signifikantna razlika između posmatranih grupa dojenčadi koja su ostala oštećena i onih koji su ostali zdravi, pa je $X^2 = 7,12388335 > 3,84$ odnosno $p<0,05$.

Vrijednosti šećera u krvi nisu statistički signifikantne za tok i ishod PDT mada smo više hiperglikemije našli kod umrlih pacijenata.

Povišena vrijednost uree u krvi nađena je kod svih bolesnika.

Niske vrijednosti pH, a naročito one ispod 7,0 nerijetko su inkompatibilne sa životom ili daju veliki broj oštećene djece. Prosječan pH naših ispitanika bio je vrlo nizak — 7,14. Kretanje vrijednosti pH i njegov ishod su dati na tabeli br. 7.

Tabela 7. PH — ISHOD

Ishod pH	Umrli	Oštećeni	Zdravi
< 7,00	13	2	9
7,00 — 7,25	12	11	53
> 7,25	4	14	27

Statistički u posmatranim grupama postoji signifikantna razlika sa kretanjem pH jer što je isti niži to je smrtnost veća, a što je veći to je preživljavanje u smislu potpunog ozdravljenja veće, što se vidi na tabeli broj 10, a

$X^2 = 26{,}4044403 > 9{,}49$, odnosno $p < 0{,}05$.

Hipoksiju i anoksiju ćelije pratili smo preko indirektnih parametara: promjene u EKG, EEG, koagulograma i poremećaja svijesti. U vrijeme ispitivanja najvećeg broja djece iz tehničkih razloga nisu se radile vrijednosti p02 i Saturacije sa 02, pa njih i ne iznosimo.

Vrijednosti promjena u EKG mediju pacijentima prikazana je na tabeli br. 8, a signifikantnost ishemije u EKG prikazana je na tabeli br. 9.

Tabela 8. PROMJENE U EKG-u KOD DOJENČADI U PDT

	Frekvencija			Ritam		Znaci ishemije	Elektrolitni dizbalans	Opterećenja	Nije uzet EKG	Ukupno pacijenata
	T	N	B	SIN.	NOD.					
Umrli	20	3	2	22	1	22	11	16	25	14	39
Oštećeni	21	1	4	25	1	23	6	14	26	2	28
Zdravi	51	13	2	62	0	44	22	33	64	30	94

Sa patološkim promjenama u EKG pogoršava se prognoza, jer smo našli znake poremećaja fekvence u 100% umrlih, 81% oštećenih i 82% zdrave. Znake hipoksije smo našli u 96% umrlih, u 88% oštećenih i 69% zdravih. Znake elektrolitnog disbalansa smo našli kod 70% umrlih, 54% oštećenih i 51% zdravih. Znake opterećenja srca smo našli kod 48% umrlih, 23% oštećenih i 34% zdravih.

Tabela 9. ISHEMIJA — ISHOD

Ishod / Ishemija	Umrli	Oštećeni	Zdravi
Ima	22	23	44
Nema	3	3	20

Ishemija je najčešće zastupljena promjena u EKG u sve tri grupe. Naročito je loš prognostički znak u grupama umrlih i oštećenih u odnosu na zdravu djecu. Gledajući na prognozu po grupama između umrlih i oštećenih, sa jedne strane preživjelih a zdravih sa druge strane, postoji razlika, što je i statistički signifikantno.

$$X^2 = 6{,}16038662 > 5{,}99 \text{ odnosno } p < 0{,}05.$$

Elektrolitni disbalans ima utjecaja na srčanu funkciju, ali njegove promjene nisu signifikantne u pojedinim grupama.

Elektroencefalogram smo radili samo kod preživjele djece. Kod umrle nismo mogli raditi zbog njihovog veoma kratkog vremena boravka na odjeljenju (prosjek 13 h i 46'). Od 47 urađenih EEG nađeno je samo 7 normalnih, a 40 patoloških. Na slici br. 1 se vidi jedan od patoloških EEG koji pokazuje nultu vrijednost aktivnosti, tj. bioelektričnu smrt.

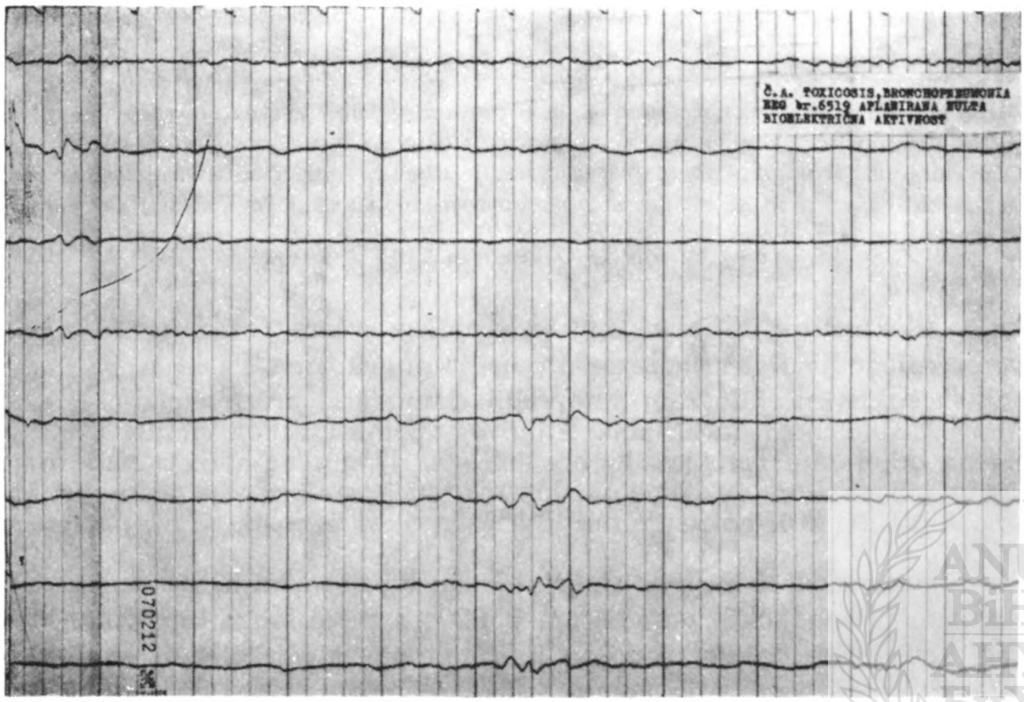
Poremećaj svijesti je sigurno jedan od najvažnijih posljedica sveukupnih metaboličkih poremećaja u PDT, a prije svega hipoksije. Najveći broj naših bolesnika došao je sa poremećajem svijesti od somnolencije, preko sopora do kome. Koliko se moglo dobiti anamnestičkim podacima, najveći broj umrle djece bilo je u besvjesnom stanju do 24 h. Ovaj podatak se mora uzeti sa rezervom zbog toga što se na roditeljske izjave nismo mogli u potpunosti osloniti, a i što je veliki broj djece dolazio u ranim jutarnjim satima, te je dio besvjesnog stanja sigurno proveden u snu. Djeca koja su preživjela PDT, a na kontroli su bila zdrava također su bila u najvećem postotku u poremećaju svijesti samo do 24 h u oko 90% slučajeva. Djeca koja su preživjela toksikozu, a na kontroli su bila oštećenja u pretežnom broju su imala poremećaj svijesti preko 24 h.

Statistička signifikantna razlika nije postojala u grupi umrli — zdravi, jer su u obje grupe imali gubitak svijesti u najvećem broju slučajeva do 24 h, ali je postojala u grupi oštećeni — zdravi jer je najveći broj pacijenata u grupi preživjelih ali oštećenih imao gubitak svijesti preko 24 h.

Različita prognoza se može objasniti stepenom dehidracije, odnosno dubinom hpovolemijskog šoka. Trajanje gubitka svijesti ima uticaja i na poremećaje i u koagulogramu i EEG, i što gubitak svijesti duže traje, to su ove promjene veće.

Promjene u koagulacionom statusu su proizvod promjena na vaskularnom sistemu zbog hipovolemije, ali i zbog hipoksije ćelija, a pr-

venstveno zbog hipovolemije u regiji splahnikusa kojima pripada i jetra. U koagulacionom statusu najčešće promjene se nalaze u K vitamin ovisnim faktorima. Od 41 uzetog koagulograma 39 su bili patološki, a samo 2 normalna.



Konvulzije su proizvod metaboličkih promjena, prije svega hipoksije, hipoglikemije, hipokalcemije i hipomagnezijemije. Mi u svom radu nismo razlučivali konvulzije prema uzroku, ali njihova pojava dovodi do lošije prognoze, što se vidi na tabeli br. 10. I statistički smo dokazali da postoji signifikantna razlika u pojavljivanju konvulzija i ishoda bolesti.

Tabela 10. KONVULZIJE — ISHOD

Ishod / Konvulzije	Umrli	Oštećeni	Zdravi
Bez	12	5	47
Jednokratne	10	2	19
Više puta u 1 dan	13	6	10
Više puta u više dana	4	15	18

Na tabeli 14. vidi se da postoji statistički signifikantna razlika u pojavi konvulzija kod pacijenata sa različitim ishodom posmatranih grupa jer je $X^2 = 32{,}50705775 > 12{,}6$, odnosno $p < 0{,}05$, jer se konvulzije najčešće javljaju u grupi oštećene djece (82%), pa umrle 70% a najmanje u zdrave djece 50%.

DISKUSIJA

Smrtnost od akutnog proliva i danas je u svijetu veliki problem, a naročito u nerazvijenim i u zemljama u razvoju. Prema izvještajima SZO, smrtnost od proliva je odgovorna za 40% cjelokupne smrtnosti (5,6). Prema autorima, ona se i danas kreće od 0,5—44% na bolničkom materijalu (3, 6, 7). Petina bolesnika umrla je u prvom satu po dolasku na Kliniku. U prvih 6 h umrlo je 56,41% bolesnika, a u prvom danu 87,18%. Preko 51% umrle dojenčadi bilo je mlađe od 3 mj. dok 74,35% mlađe od 6 mj. starosti.

Upoređujući smrtnost naših bolesnika sa smrtnošću kod drugih autora koji su jasno definisali pojam toksikoze približno su iste (1, 3, 16).

Kvalitet preživljavanja bolesnika u obrađenom materijalu bio je dvojak.

Najveći broj preživjele djece — 94 (58,38%) na kontrolnom pregledu bilo je potpuno zdravo. Na kontrolnom pregledu imalo je 28 (17,39%) sekvele u vidu oštećenja psiho-motornog razvoja, od čega 14 (50%) tešku psihomotornu retardaciju.

Još je Marfan 1896. god. upozoravao na teške sekvele poslije preživljavanja teških gastroenteritisa. Problem su kasnije aktuelizirali Caretier 1914, Ford 1928. i drugi. Na ovaj problem prvi je kod nas upozorio Ćosić 1962. (10).

Finberg i Harison insistiraju na ulozi hipernatremije u nastanku cerebralnih lezija poslije preživljavanja teških proliva i dehidracije (11, 12).

Morris-Jones, kontrolišući preživjele od toksikoze, našla je retardacija u 37% slučajeva (11, 12, 13). Chamberis (1975) smatra da u Engleskoj ima bar 1000 školske djece čiji edukativni i socijalni hendikep može biti pripisan teškoj dehidraciji i hipernatremiji u dojenačkom periodu (14).

Ishod i kvalitet preživljavanja u mnogome zavise od stepena i dužine trajanja febrilnog stanja dojenčeta u PDT. Još je Routa 1909. god. našao eksperimentalno na životinjama da visoka temperatura doprinosi povećanju mortaliteta. Zbog relativno velike površine kože, površine sluznica digestivnog trakta, ubrzanog disanja za vrijeme visoke temperature, dojenčad gubi velike količine vode, što ubrzava hipovolemiju u PDT. Za svaki povišen stepen temperature iznad 38°C tjelesne temperature organizam zahtijeva 12% više tečnosti u odnosu na dnevne potrebe (15).

Porastom temperature ishod je lošiji u našem materijalu. Od svih bolesnika 64% su imali visoku temperaturu preko 39°C, a u grupi umrlih taj postotak bio je 86%; grupa oštećene djece imala je temperaturu u 71% više od 39°C, dok u grupi preživjele i zdrave djece samo 58%. U našem radu vidljivo je da visoka temperatura favorizuje konvulzije. Hipokalcemija je dvostruko veća u grupi djece sa hiperpireksijom.

Topuzović i Nadaždin na svom materijalu toksikoza našli su u preko 90% slučajeva hiperpireksiju (16).

Visoka temperatura zbog katabolizma dovodi do stvaranja kiselih ekvivalenata, pa i do sniženja pH krvi (17).

Vera Golubović-Ćurčić kod 66 slučajeva hipernatremijske dehidracije našla je kao najkonstantniji simptom visoku temperaturu preko 40°C (18).

Kis govori o hipermotilnoj toksikozi u kojoj je dominirajući simptom visoka temperatura (19). Ivanovici govori o »hiperpiretičkoj toksikozi« jer se hiperpireksija javlja u 77% slučajeva (3).

Morris-Jones opisuje 50 slučajeva sa hiperpireksijom u teškoj dehidraciji i hipernatremiji kod kojih je našao i visok procenat neuroloških sekvela (13).

Beitzke je našao smrtnost u grupi djece sa hiperpireksijom preko 42% u 69 slučajeva (7). Stadler je našao smrtnost kod hiperpiretičke toksikoze 25—56% i veoma brzo nastupa smrt, najčešće u prvih 6 h, dok je smrtnost kod hipernatremijske dehidracije iznosila 11% (20).

U našoj studiji nismo našli statistički signifikantnu razliku u ishodu toksikoze obzirom na vrstu dehidracije. Izgleda da je stepen dehidracije mnogo važniji od vrste za mortalitet i oštećenost djece ukoliko je dehidracija bila velika i brzo nastajala. Mnogi autori u svijetu, a naročito oni iz nerazvijenih zemalja, nalazili su kao i mi daleko više izonatremijske dehidracije u odnosu na hipernatremijsku (13, 21, 22, 23).

Finberg je dokazao na svom materijalu da zbog hiperosmolariteta ekstracelularnog prostora dolazi do subduralnog i subarahnoidalnog krvarenja u mozgu (24). Ivanovici smatra da ključno mjesto u dehidraciji treba dati nedovoljnom prometu energije koja je nužna za normalan rad natrijum i kalijum pumpe, koja se poremeti zbog nedostatka energije (3).

Ahmed citira autore iz Indije, koji u podneblju tropske klime nalaze vrlo malo hipernatremijske dehidracije. On je u Lagosu na 120 slučajeva teškog proliva imao 20% hipernatremijske dehidracije (21).

Comay upozorava da dehidracija učestvuje u poremećaju hemostaze, pa kod liječenih može doći i do perifernih gangrena i do ozbiljnih poremećaja u području mikrocirkulacije (25).

Habel i Simpson smatraju da stepen dehidracije ne prati stepen hipernataremije (26). Istog mišljenja je i Paneth (8).

Khuffash je našao 7,5% hipernatremijskih dehidracija i 15% konfulzija, a na kontroli bolesnika našao je 7,6% pacijenata sa oštećenjem mozga (27).

Razlog za oštećenost bolesnika sa hipernatremijom mozga autori traže u povišenom ekstracelularnom osmolaritetu. Kod hipernatremije u plazmi i ECP-u uvijek pati ćelija, jer je hipernatremija uvijek

praćena dehidracijom intracelularnog prostora. Ćelija ostaje sa još manje kiseonika i energije i ulazi u degeneraciju ili u izumiranje. Hipernatremija je opasna i u fazi rehidracije ako se daje brzo i dosta hipotonih i izotonih rastvora, pa voda zbog stvorenih »idiogenih« jona prodire u ćeliju i nastaje edem (13, 28, 29).

Acidozni poremećaji mogu dovesti do kome, konvulzija, srčane insuficijencije, degeneracije vitalno važnih organa (30). Kada se pH spusti ispod 7,10, dolazi do poremećaja u funkciji srca u smislu smanjenja kontraktivnosti srčanog mišića, periferne vazodilatacije, hipoksije, hipoperfuzije tkiva i do kardijalne insuficijencije. Kada je pH 7,10 i ispod, potrebna je hitna korekcija acidoze (29).

Prema Rikici Najdanović, teška acidoza nastupa kada pH pada ispod 7,20 ili EB-20 ili više, ili je pCO2 veći od 70 mmHg (17). To je stanje kada je život dojenčeta ugrožen. Postoji opasnost oštećenja srca, CNS, krvnih sudova, slabijeg djelovanja digitalisa na srce itd. U našem radu najniži pH su u prosjeku imala djeca iz grupe umrlih, a šanse za dobar ishod imala su djeca sa pH iznad 7,25. Teško je objasniti dobijeni podatak da je 9-oro djece bolesnika (10,11%) imalo pH ispod 7,00 i preživjelo bez ikakvih posljedica, osim da je ta acidoza trajala vremenski kratko i da se nije razvijala dugotrajna hipoksija ili anoksija ćelija CNS. I drugi autori su nalazili direktnu ovisnost smrtnosti od vrijednosti pH (17). Acidoza naročito pogađa mlađu dojenčad ispod 2 mj. starosti. Dva puta je više nađeno mlađe djece od 6 mj. sa nižim pH od 7,20 nego one starije od 6 mj. Što je duže trajao poremećaj svijesti to je pH bio niži i najveći broj niskog pH nađen je kod djece u besvjesnom stanju. Ni kod jednog djeteta nismo našli niži pH od 7,25 ako je cijelo vrijeme bolesti bilo svjesno ili je poremećaj svijesti kratko trajao, tj. manje od 1 h. U studiji smo imali 24 djece sa nižim pH od 7,0, a umrlo je 13, ili 53%. Kod vrijednosti pH 7,00 — 7,25 smrtnost je bila 16%, a kod pH iznad 7,25 smrtnost je bila samo 9%. Slične rezultate imali su i drugi autori (17).

Kada nagli gubitak tjelesne težine zbog dehidracije dostigne 15% i više, jasno se ispolje klinički znaci cirkulatornog šoka, pa i poremećaja svijesti (29). Gubitak svijesti je naročito dugo trajao kod one djece koja su na kontroli bila oštećena. Tako je 82,14% bolesnika iz ove grupe na dolasku u bolnicu bila u soporu ili komi, a u grupi preživjelih i na kontroli zdravih bolesnika samo 61,70%, što smo i statistički dokazali da je signifikantno.

U grupi umrle djece i one koja su na kontroli bila zdrava nije nađena signifikantna razlika u dužini trajanja gubitka svijesti. Različit ishod objašnjavamo različitim stepenom dehidracije, odnosno nesigurnim podacima koje su davali roditelji u grupi umrle djece.

THE INFLUENCE OF METABOLIC CHANGES ON THE COURSE AND OUTCOME OF ENTEROLITIC DEHYDRATATION TOXICOSIS OF INFANTS

Summary

The author investigated the influence of single metabolic changes on the course and outcome of severe enterocolitic dehydration in 161 infants and small children. He observed the letality rate, survival rate and the quality of survival.

Beside he high letality rate (24.22%), he found a low quality of survival as a disturbance of normal growth and development in 17.39% of survived and controlled children.

The prognosis was negatively influenced by a high degree of dehydration, especially if the dehydration was sudden. A worse prognosis was noticed in children with low pH-value, high body temperature and long duration of hypoxia — which was observed by means of EEG and ECG. A specially bad prognostic sign was deep and lasting disturbance of conciene.

The author found no correlation between bad prognosis and blood minerals values.

LITERATURA

(1) Stadler, G.: *Acute hyperpyretische Toxikose und hypernäträmische Dehydratation.* Helv Paed Acta 1975; 30: 453—7.

(2) Kačić, M.: *Akutni prolitivi dojenčadi i djece.* U: Mardešić D., Kačić M.: *Prehrana i bolesti probavnih organa u pedijatriji.* Zagreb: Jumena, 1979: 140—153.

(3) Iancovici, F., Museteanu, C., Pavelescu, M.: *Metabolische Behandlung der akuten hyperpyretischen Toxikose.* Mschr Kinderblk 1970; 118(7): 447—450.

(4) Papajan, A. V., Cibulkn, E. K.: *Ostrie tokskozi u ranem detskom vozraste.* Moskva: Medicine, 1984: 5—11.

(5) Walker-Smith, J. A., Hamlton, J. R., Walker, W. A.: *Practical Paediatric Gastroenterology.* London: Butterworths, 1971: 148—184.

(6) Tripp, J. H., Candy, D. C.A.: *Mannual of Pediatric Gastroenteroolgy.* London: Churchil Livingstone, 1985: 24—8.

(7) Beitzke, A.: *Die acute hyperpyretische Toxikose.* Mschr Kinderhlk 1972; 120(10): 421—4.

(8) Paneth, N.: *Hypernatremic Dehydration in Infancy.* J Dis Child 1980; 134: 785—791.

(9) Belhocine, Z., Mahiont, B., Laraba A.: *La lutte contre diarhee: experience d'une equipe de santé adns une unité de soins primaires* — Algerie. L'enfant miliu tropical 1985; 158: 1—25.

(10) Ćosć, B., Dimitrijević, D., Mihajlović, A., Pešić, M.: *O neuro-psihičkim sekvelama kod toksikoza dojenčadi.* Jug Pedijarija 1962; 2.

(11) Finberg, I., Harrison, H. E.: *Hypernatremia in Infants. An Evaluation of the Clinical and Biochemical Findings Accompaning Ahis State.* Pediatrics 1955; 16:1.

(12) Finberg, L.: *Hypernatremic Dehidration.* Adv in Pediatr 1960; 16: 325—344.

(13) Morris-Jones, P. H. Houtson, J. B., Evans, R. C.: *Prognosis of the Neurological Complications of Acute Hypernatremia.* Lancet 1967; 30: 385—391.

(14) Chambers, T. L.: *Hypernatremia: A Prevenatble Cause of Acquired Brain Damage.* Dev Med Child Neurol 1975; 17:91—4.

(15) Mermešić, D., i sar.: *Pedijatrija,* Zagreb: Školsak knjiga, 1984: 167—185.

(16) Nadaždin, D., Topuzović, N.: *Neurotoksični sindrom u periodu 1959—1963. godine na dječijem odjelu bolnice u Mostaru.* V pedijatrijski dani, Zenica, 1964: 149—159.

(17) Najdanović, R.: *Karakteristike acidobaznih poremećaja u dojenačkom periodu.* Pedijatrijski dani BiH, Foča, 1977: 73—81.

(18) Golubović-Ćurćić, V., Nešić, A., Cucić, Z.: *Hipernatremija i konvulzivni sindrom.* IX pedijatrijski dani, Mostar, 1969: 71—73.

(19) Kiss, P. G.: *Uber die bypermobile Form der Säglings »Toxikoze«.* Anr Ped 1960; 194: 11—36.

(20) Stadler, G.: *Acute hyperpyretische Toxikoze und hypernäträmische Dehydratation.* Helv Paed Acta 1975; 30: 453—7.

(21) Ahmed, J., Agusto, T. B.: *Hipernatremia in Diarrheal Lufants in Lagos,* Arch Dis Child 1970; 45:97.

(22) Macaulay, D., Blackball, M. I.: *Hypernatremic Dehydration in Infantile Gastroenteritis.* Arch Dis Child 1961; 36: 543.

(23) Franz, M. N., Segar, W. E.: *The Association of Varions Factors and Hypermatremic Diarrheal Dehydration.* J Dis Child 1959; 97: 298—301.

(24) Finberg, I.: *Pathogenesis of Lesions in the Nervons System in Nupernatremic States.* Clinical observations in infants. Pediatrics 1959; 23: 40—5.

(25) Comay, S. C., Karabus, C. D.: *Peripheral Gangrene in Nupernatremic Dehydratin of Infancy.* Arch Dis Child 1975; 50: 679—688.

(26) Habel, A. H., Simpson, H.: *Osmolar Relaton Between Cerebrospnial Fluid and Serum in Hyperosmolar Hypermatremic Dehydration.* Arch Dis Child 1976; 51: 660—6.

(27) Khuffash, F. A., Majeed: *Hypernatremic Dehydration in Infants with Gastroenteritis.* Clin Ped 1984; 23: 255—8.

(28) Finberg, I., Cheung, C., Fleishman, E.: *The Significance of the Concentration of Electrolytes in Stool Water During Infantile Diarrhea.* Am J Dis Child 1960; 100: 809—813.

(29) Stojanov, LJ., Vulović, Đ., Savić, J., Janković, I., Kovačević, B., Popović, S.: *Metabolička njega i terapija vitalno ugroženog djeteta. Problemi u pedijatriji 1983.* Naučna knjiga, Beograd 1984: 305—320.

(30) Vulović, D., Stojanov, Lj., Baničević, M.: *Poremećaji metabolizma ketonskih spojeva. Problema u pedijatriji 1983.* Naučna knjiga, Beograd 1984: 291—304.

ANU
BiH
АНУ
БиХ

UDIO MELATONINA U USMJERAVANJU ULTRASTRUKTURNIH PROMJENA TIREOCITA EPIFIZEKTOMISANIH I OZRAČENIH PACOVA

ZLATA KUNDUROVIĆ
Institut za histologiju i embriologiju Medicinskog fakulteta, Sarajevo

UDC 615.849.2 : 599.32

Apstrakt. Prije jednokratnog ozračenja dozom od 8 Gy gama zraka Albino pacovi soja Wistar su pinealektomisani i podijeljeni u dvije eksperimentalne grupe. Grupa I je primala kroz 14-dnevni period u prijepodnevnim satima po 0,5 ccm hidroalkoholnog rastvarača-solvensa, dok je grupa II za isti period i u isto vrijeme primala melatonin u dnevnoj dozi od 0,2 mg rastvorenih u 0,5 ccm solvensa. Dvanaestog dana postiradijacionog toka životinje su žrtvovane, a njihove štitnjače pripremljene za elektronomikroskopska ispitivanja. Folikularne ćelije životinja grupe I pokazuju veoma burne i dominantno izražene involutivne promjene. Tireociti kod životinja grupe II pokazuju, mada izmijenjenu, vidno očuvaniju građu.

Konstatuje se da je melatonin ispoljio u datim uslovima tireoradioprotektivno svojstvo.

Ključne riječi: pacov, melatonin, pinealektomija, gama zračenje, tireociti.

UVOD

Sumirajući rezultate velikog broja autora čiji se radovi odnose na ispitivanje djelovanja jonizujućeg ozračenja na štitnu žlijezdu, može se zaključiti da ono izaziva promjene na pomenutom organu u vidu hiper ili hipofunkcionalne reakcije, zavisno od jačine primijenjene doze, kao i dužine postiradiacionog perioda. Werner i sar. (1961) i Milin i sar. (1963) opisuju progresivne histofiziološke promjene štitnjače nakon aplikacije doze od 6 Gy X zraka, dok od njih primijenjena doza 8 Gy uzrokuje, nasuprot, deprimirajuće efekte. Brayer i sar. (1969), Pantić i sar. (1966), Pantić (1974) i Jovanović i sar. (1965) su pokazali rezultatima svojih istraživanja da velike doze radioaktivnog joda izazivaju poremećaje funkcije štitnjače i prije vidljivih morfoloških promjena.

Funkcionalni i histološki aspekt štitnjače u uslovima epifizektomije i melatoninskog tretmana opisali su brojni autori. Ishibashi i sar. (1966) opisuju povećano uzimanje hrane i pojačanu hormonsku

sekreciju (TSR) nakon epifizektomije, dok je od njih primijenjeni melatonin anulirao ove efekte. Vriend i sar. (1980) konstatuju povećanje težine tireoidne žlijezde i kaptacije radioaktivnog joda nakon hroničnog melatoninskog tretmana.

Iako postoje brojni literaturni podaci koji ukazuju na radioprotektivne efekte serotonina — prekurzora melatonina i nekih drugih biogenih amina (Rixon i sar., 1968; Szabo, 1968; Altman i sar., 1970; Strelkov, 1980), u nama dostupnoj literaturi skoro da nismo naišli na podatke koji bi ukazali na pomenuto svojstvo melatonina. Ellis i sar. (1973) citiraju Jermonenka i Turganova iz 1964., prema čijim radovima melatonin pokazuje radioprotektivne efekte kod čovjeka. Prema našim dosadašnjim iskustvima, melatonin je ispoljio radioprotektivno dejstvo što se manifestovalo kroz vidno očuvaniju histološku sliku štitnjače i bolje preživljavanje u odnosu na označene, ali i tretirane životinje (Kundurović i sar., 1985, 1987; Kundurović, 1988).

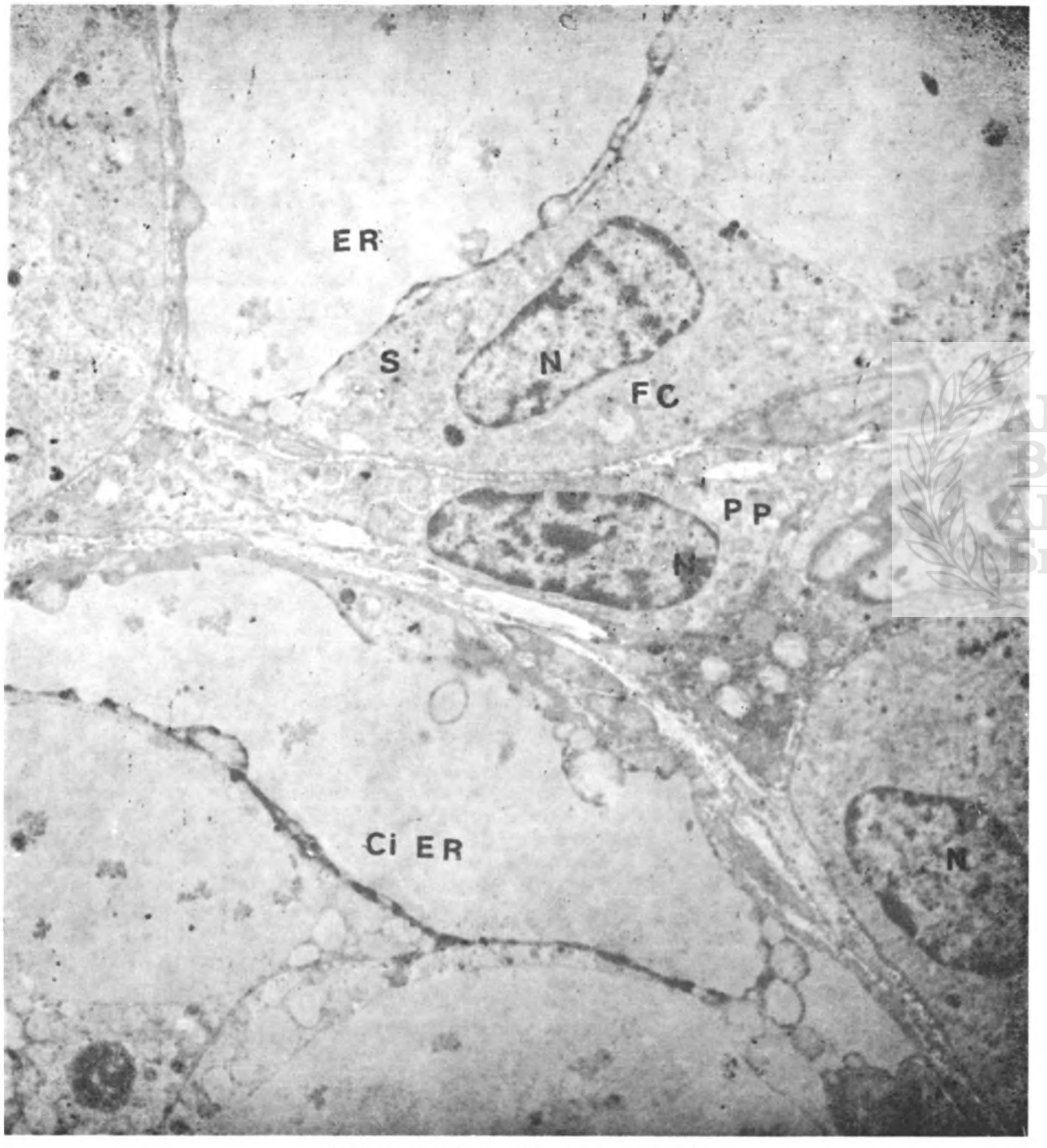
Na osnovu iznesenog, cilj rada je bio da se prezentira ultrastrukturna slika tireocita epifizektomisanih pacova sa i bez melatorinskog tretmana prije jednokratnog in toto ozračenja.

MATERIJAL I METODOLOGIJA

Eksperiment je izveden na bijelim, polno zrelim laboratorijskim pacovima, soja Wistar, prosječne težine 150—175 gr. Svi su poticali iz istog legla i odgajani pod istim uslovima. U prvoj fazi eksperimenta izvršena je ablacija pinealne žlijezde kod svih životinja. Zatim su iste podijeljene u dvije eksperimentalne grupe. Grupa I se sastojala od 12 epifizektomisanih životinja koje su tokom 14 dana u prijepodnevnim satima primale po 0,5 ccm hidroalkoholnog rastvarača, intraperitonealno, koji je ujedno korišten i za rastvaranje melatonina. Grupa II se sastojala od 13 epifizektomisanih pacova koji su za isto vrijeme primali po 0,2 mg melatonina rastvorena u 0,5 ccm rastvarača. Nakon tretmana obje grupe životinja su ozračene jednokratnom dozom od 8 Gy gama zraka. Ozračenje je obavljeno aparatom Theraton 780 za tele Co terapiju, gama zračenje energije 1,25 MeV, u vremenu od 4,87 min. Distanca je iznosila 65 cm, a veličina polja ozračenja 3x30. Zračenje je obavljeno na Institutu za radiologiju i onkologiju Medicinskog fakulteta u Sarajevu. Dvanaestog dana po ozračenju životinje su žrtvovane. Dok su desni lobusi štitnjače fiksirani za histološku analizu, komadići lijevog lobusa žlijezde su u intervalu od 10 min. prefiksirani u puferovanom 3% glutaraldehidu (0,2 Mcocodilat pufer pH 7,4) tokom 4 časa i ponovo ispirani u istom puferu 16 časova na sobnoj temperaturi. Materijal je zatim fiksiran u puferovanom 2% O_sO_4 u trajanju od 4 časa. Dehidratacija je izvršena u seriji alkohola a kalupljenje u EPON-u 812. Materijal je rezan na LKB ultramikrotomu III. Presjeci su kontrastirani u uranil-acetatu i olovnom citratu. Analiza i mikrosnimci urađeni su na elektronskom mikroskopu JEM 100, JOEL Yapan, kao i na OPTON 9-S-2, »Opton«, Obercochen.

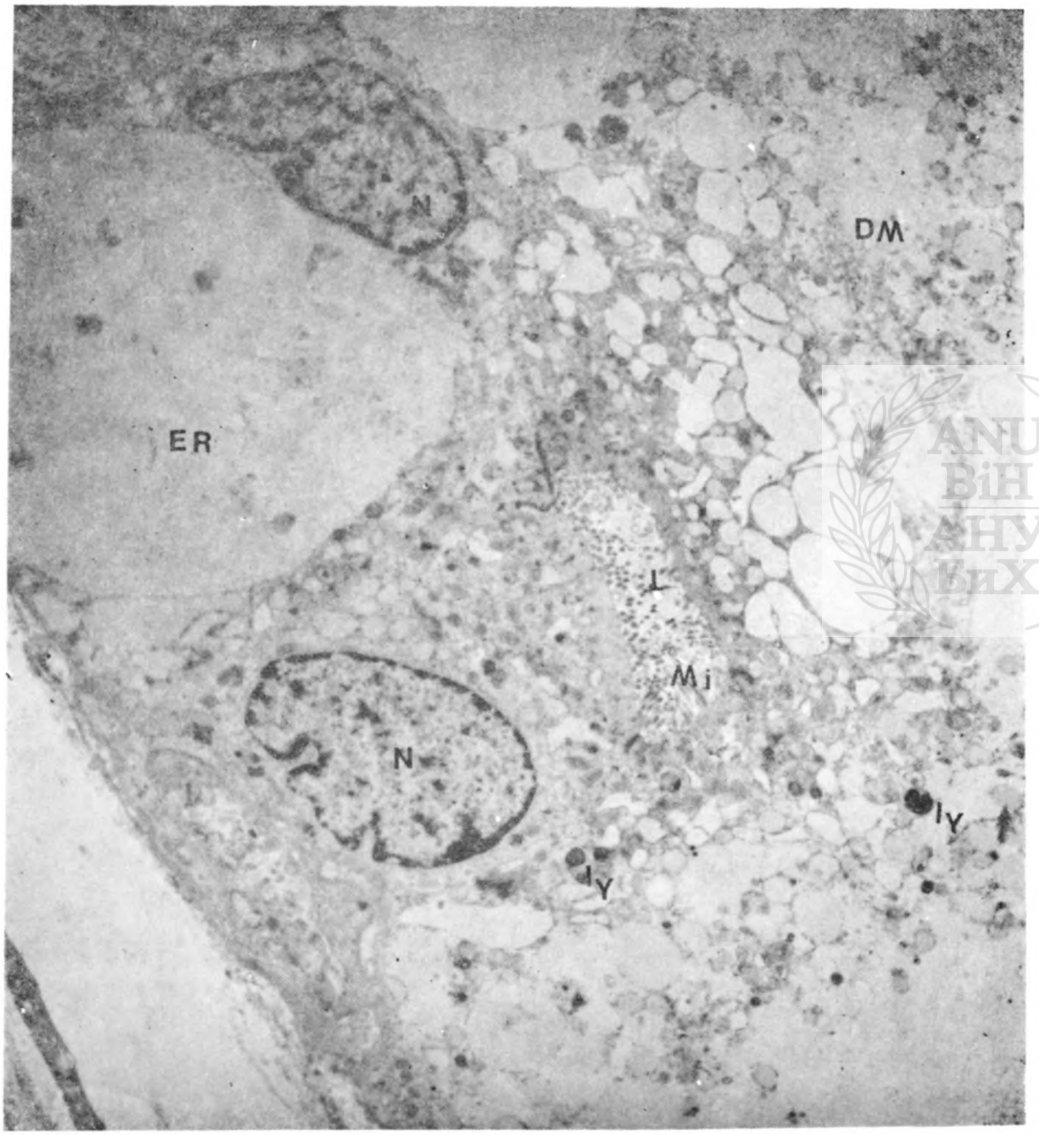
REZULTATI

Žljezdane ćelije štitnjače epifizektomisanih i ozračenih životinja (grupa I) pokazuju veoma naglašene promjene. Pored rjeđe prisutnih jedara veoma svijetle unutrašnjosti i velikih dimenzija, u tireocitima se zapažaju iregularna, razbacana i neujednačeno građena jedra. Ona su često hiperhromatična, skvrčena, sa dubokim incizurama. U citoplazmi, pored izraženog edema, dominira prisustvo golemih, raznoobličnih cisterni granuliranog endoplazmatskog retikuluma, koje su



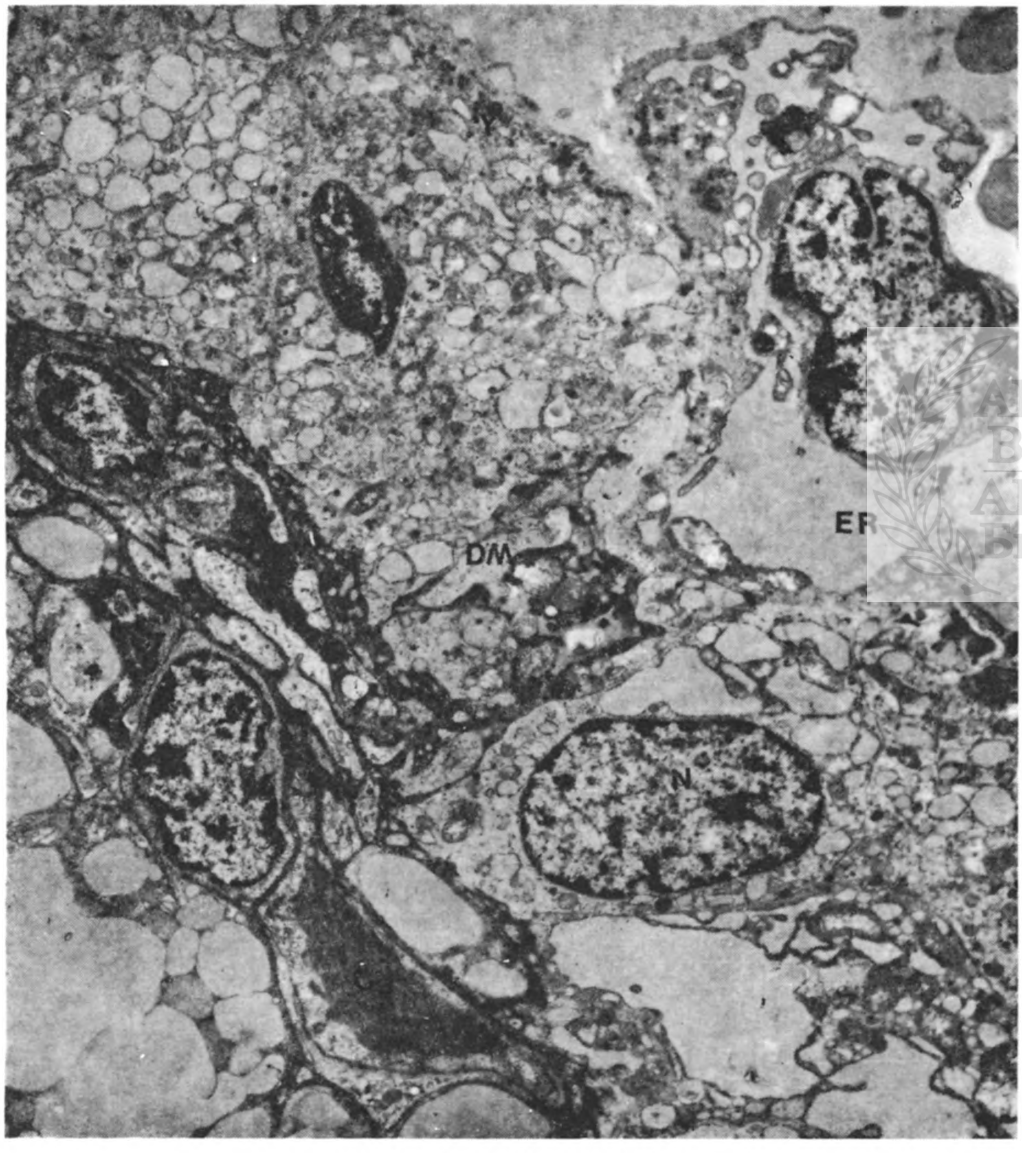
Slika 1. Tireociti pacova gr. I
Ogromne cisterne endoplazmatskog retikuluma (ER) ispunjavaju veliki dio ćelijskog tijela, potiskujući pripadajući sadržaj (S) uz periferiju; N-jedro folikularne ćelije (FĆ); PP-perifolikularni prostor; (Fm. 1.900 x 2,5)

mjestimično lišene ribosoma na vanjskom listu. Nerijetko cisterne konfluiraju među sobom formirajući goleme, elektronski veoma razrijeđene šupljine. U tom slučaju one nerijetko ispunjavaju veliki dio ćelijskog tijela potiskujući preostali žljezdani materijal (sl. 1). Mjestimično se u njihovoj unutrašnjosti zapažaju paučinasti ostaci elektronski gušćeg materijala Mitohondriji su edematozni, naglašenih dimenzija. Njihova unutrašnjost djeluje elektronski ispražnjeno uslijed visokog stepena oštećenja njihovog matriksa.



Slika 2. Tireociti pacova gr. I
Granice između susjednih ćelija ne postoje. Cisterne endoplazmatskog retikuluma iz jedne ćelije spajaju se sa istim iz susjedne; brojni lizosomi (Ly); N-jedro; L-lumen, Mi-mikrovili; DM-dezorganizirana masa; (Fm. 1.900 x 2,5)

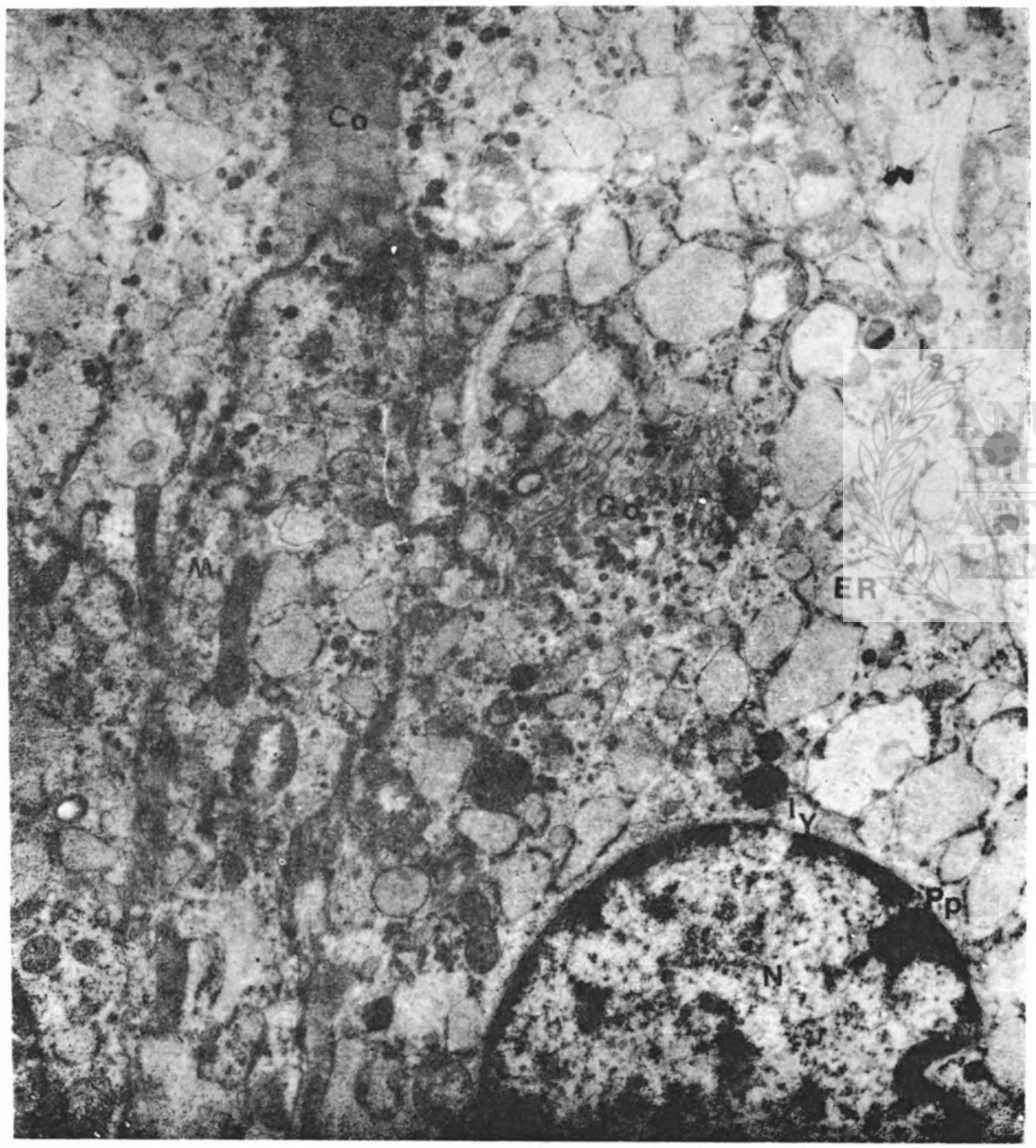
Kriste mitohondrija u velikom broju u potpunosti nedostaju. Brojni i raznoobličnі lizosomi i fagosomi pokazuju visok stepen elektronske gustoće. Oni su razbacani po cijeloj citoplazmi mada im je predilekciono mjesto apikalno područje. Mikrovili su zdepasti i veoma kratki. Golgi zona se u velikom broju tireocita i ne zapaža usljed opšte dezorganizacije ćelija. Bazalna površina pokazuje duboke invaginacije. Pojačana je debelim naslagama kolagenih vlakana i raznoobličnih izmijenjenih vezivnih ćelija. Budući da najveći broj tireocita pokazuje prekid kontinuiteta svojih granica prema okolini, žljezdani sadržaj jed-



Slika 3. Tireociti pacova gr. I
Niz folikularnih ćelija potpuno izmijenjene građe djeluju poput dezorganizirane mase; Ca-kapilar; (Fm. 1.900 x 2,5)

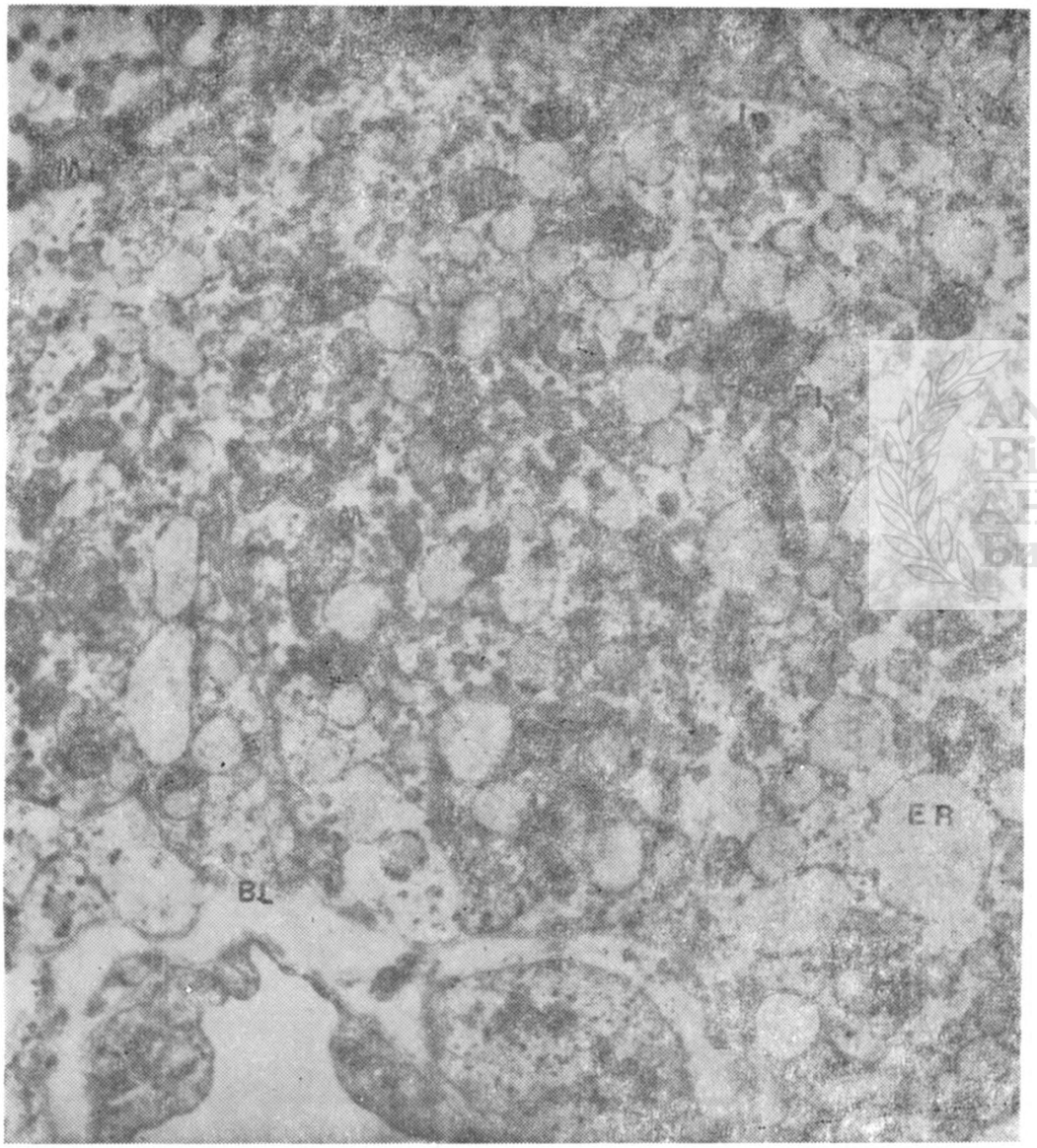
ne ćelije stapa se sa istim u susjedstvu. U tom slučaju nizovi folikularnih ćelija djeluju kao dezorganizirana masa u kojoj se uobičajeni elektronomikroskopski detalji veoma teško raspoznaju (sl. 2, 3).

Folikularne ćelije štitnjača epifizektomisanih i ozračenih životinja koje su pretretirane melatoninom (grupa II) pokazuju u svojoj ultrastrukturi blaže izražene promjene. Njihove granice su u najvećem broju slučajeva jasne i uočljive. Jedra su im većih dimenzija, no ujednačene veličine i oblika. Perinuklearni prostori su uglavnom ravnom-



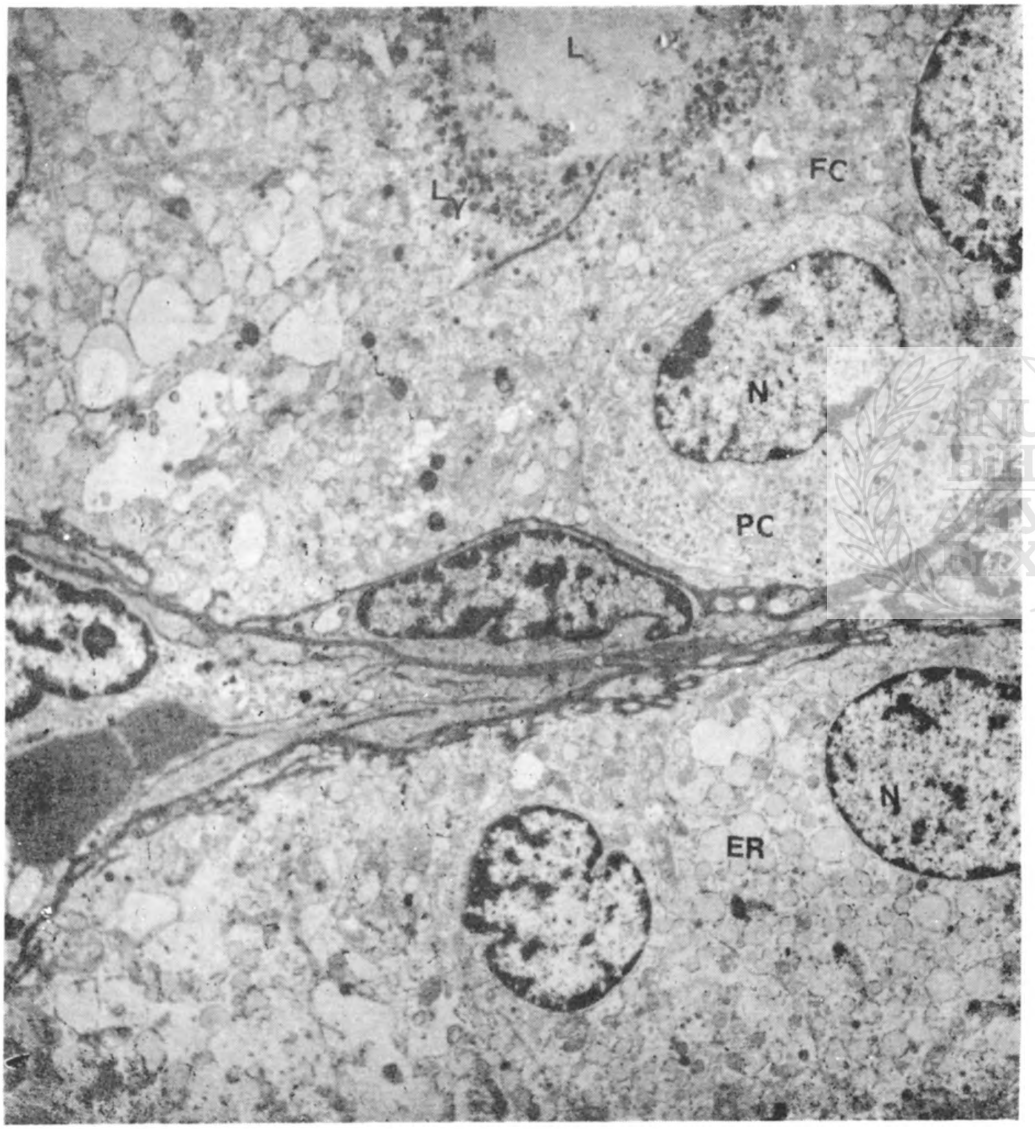
Slika 4. Tireociti gr. II
Detalj: apikalni pol ćelije: očuvanija građa ultrastrukturnih elemenata; PP-perikapilarni prostor; N-jedro; Ly-lizosomi; Go-Golgi zona; Co-koloid; IS-intercelularni prostor; Mi-mitohondriji; o (Fm. 4.900 x 2,5)

jerno prošireni (sl. 4). Uz jedrovu opnu zapaža se naglašenija količina hromatina, dok je unutrašnjost jedara elektronski razrijeđena. Cisterne endoplazmatskog retikuluma su razbacane po citoplazmi. One su manjih dimenzija, okruglastog ili ovalnog oblika. Elektronska gustoća njihove unutrašnjosti varira. Slobodni ribosomi se javljaju u vidu razbacanih nakupina. Mitohondrije su znatno očuvanije građe. Njihov matriks posjeduje naglašeni elektronski denzitet. Njihova veličina je varijabilna. Ponegdje su izduženi poput traka pokazujući različit ste-



Slika 5. Tireociti gr. II
Detalj: bazalno područje: bazalna površina lagano talasasta, kontinuirana; BL-bazalna lamina; M-mitohondriji; (Fm. 4.900 x 2,5)

pen oštećenja. Golgi zona je očuvanije građe. Razuđena je i smještena u supranuklearno područje ćelije (sl. 4). U njenoj blizini zapaža se prisustvo brojnih, okruglastih elektronski gustih tijela. Mikrovili su sitni, zdepasti i gusti. Bazalna površina je blago talasasta sa mjestimično nepravilnim izdancima (sl. 5). Perikapilarni prostori su prošireni, mada slabije nego kod životinja lišenih epifize bez melatoninskog tretmana. U nizu folikularnih ćelija čest nalaz predstavljaju i druge ćelijske populacije očuvanije građe (sl. 6).



Slika 6. Tireociti gr. II
Niz ćelija dva susjedna folikula očuvanije građe; Perikapilarni prostor proširen; Ca-kapilar; L-lumen; (Između tireocita zapaža se prisustvo parafolikularne ćelije očuvanije građe) (PC); (Fm. 1.900 x 2,5)

DISKUSIJA

Na osnovu iznešenih nalaza može se konstatovati da je jednokratna doza od 8 Gy gama zraka dvanaestog dana po ozračenju dovela do veoma burnih ultrastrukturnih promjena tireocita epifizektomisanih i melatoninom netretiranih pacova (grupa I). Te promjene se svakako manifestuju kroz narušavanje integriteta ćelije. U ovakvom slučaju ćelije su kompletno blokirane za bilo koju svoju funkciju. I u ćelijama sa nešto očuvanijom ultrastrukturom građom koje također pripadaju ovoj grupi životinja zaključujemo da je došlo do dubokih poremećaja. Nalaz naglašenih perikapilarnih prostora odgovara nalazu koji opisuju Dimitriu i sar. (1986) kod folikulo-papilarnog karcinoma tireoidne žlijezde.

Po izgledu opšte ultrastrukturne organizacije ćelija može se zaključiti da su sinteza, sekrecija i reapsorcija, ako ne onemogućene, a ono svedene na minimum. Naši nalazi su u saglasnosti sa nalazima Pantića i sar. (1966) premda ima i određenih neslaganja. Ona najvjerovatnije leže, između ostalog, u različitoj dužini postradijacionog perioda.

Tireociti u folikularnom nizu štitnjače epifizektomisanih i melatoninom tretiranih pacova (grupa II) pokazuju blaže reagovanje uz očuvaniju građu. Ovi nalazi donekle podsjećaju na nalaze tireocita kod difuzne toksične strume (Heimann, 1966). Izgled jedara i raspored hromatina u njima uz jedrovu opnu ima za posljedicu poremećenu izmjenu tvari na relaciji jedro — citoplazma. Sličnu segregaciju jedra opisuje Bietly (1975) kod ćelija epiderma nakon ozračenja sa 10 Gy X zraka. Znatnije nakupljanje lizosoma kao svojevrsnih regulatora sekrecionih procesa ipak ne bismo mogli shvatiti kao odraz stimulirane aktivnosti, nego prije kao znake, mada slabije, izraženih destruktivnih procesa. Oni su svakako uslovljeni poremećenom homeostazom kao posljedicom zračenja.

Premda je ultrastrukturna slika tireocita pacova grupe II daleko »smirenija« sa promjenama slabijeg inteziteta, mi ipak tvrdimo da ćelije nisu sposobne da učestvuju u neizmijenjenoj hormonosintezi. Nasuprot, konstatujemo da je taj složeni proces poremećen. Jovanović i sar. (1965) su opisali rane poremećaje u funkciji žljezdanih ćelija štitnjače nakon endogene iradijacije, a koji su bili prisutni i prije vidljivih morfoloških promjena. Prihvatajući njihov stav o nemogućnosti izlučivanja jodiranog tireoglobulina iz tireocita u koloid pri još uvijek očuvanoj koncentracionoj sposobnosti tireocita za jod, mi smatramo da je stepen morfoloških promjena djelovao na jačinu funkcionalnih poremećaja tireocita. Budući da je stepen tih promjena u našim uslovima znatno slabije naglašen kod melatoninskog tretmana, zaključujemo da je melatonin pokazao tireoradioprotektivni efekat.

SHARE OF MELATONIN IN DIRECTING OF ULTRASTRUCTURAL THYREOCYTE CHANGES OF EPIPHYZECOTOMISED AND X-IRRADIATED RATS

Summary

Before treatment with radiation in dose 8 Gy gamma rays, Albino rats, Wistar, were pinealectomized and devided in two experimental groups. Group I received for fourteen days the 0,5 ccm ethanol solvent, and group II received melatonin in dose of 0,2 mg/0,5 ccm of solvent. 12th day of postirradiation period all the animals were decapitated, and the glandular parenchyma were analyzed by electron microscop. Thyreocytes of the group I reacted with destructive changes, while those which had been given melatonin (group II) reacted with less emphasised changes of the same type. The differences between thyreocytes of group I and group II suggest the possibility of radioprotective affects of melatonin.

LITERATURA

Altman, K. I., Gerber, G. B. and Okada, S.: *Hormones and Systemic Effects-Radiation Biochemistry,* vol. II Tissues and body fluid, 1970.

Bietly, A., Gomot, L. et Arche, P.: *Etude des effects des rayons X sur des explants du peau humaine adulte.* Arch. Biol., (Bruxelles), 86, 399, 1975.

Brayer, F. T. and Glasser, S. R.: *Indirect Effect of X Irradiation J^{131} Uptake in Chick Embryos.* Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 101, 390, 1969.

Dimitriu, L., Stefaneanu, L. and Tasca, L.: *An Ultrastructural and Cytoenzymological Study on the Folliculo-Pappilary Thyroid Carcinoma.* Rev. Roum. Med. Endocrinol., 19, 7, 39, 1981.

Ellis, L., C. Jaussi, W. A., Tait, R. G. and Urry, R. L.: *In Vivo and in Vitro Effects of X Irradiation and Histamine-PO_4 on Rat and Bovine Pineal HIOMT Activity and Melatonin Synthesis.* Life sci., 13, 835, 1973.

Heimann, P.: *Ultrastructure of Human Thyroid — a Study of Normal Thyroid, Untreated and Treated Diffuse Toxic Goiter.* Acta endocrinol., suppl., 110, 53, Copen. 1966.

Ishibashi, T., Hanh, D. W., Strivastava, L., Yumaresan, P. and Turner, C. W.: *Effects of Pinealectomy and Melatonin on Freed Consumption and Thyroid Secretion rate.* Proceedings of society of experimental Bioloby and Medicine, 122, 644, 1966.

Jovanović, M., Đurđević, Đ. and Sinadinović, J.: *Some Characteristics of the Iodine Metabolism in the Internal Irradiation Damage of the Thyriod Gland.* Jugoslav. physiol. pharmacol. acta, 1, 1, 3, 1965.

Kundurović, Z. i Šćepović, M.: *Utjecaj melatonina i pinealektomije na parenhim štitne žlijezde pacova ozračenih sa 8 Gy gama zraka.* Folia anat. iugosl. 15, 1, 25, 1985.

Kundurović, Z., Šćepović, M. i Mornjaković, Z.: *Značaj melatonina u determinizmu stresogenog odgovora štitnjače pacova ozračenih visokom dozom gama zraka.* Folia anat. iugosl., 17/1, 37, 1987.

Kundurović, Z.: *Ultrastructural Analysis of Thyroid Cells in Melatonin Treated Rats Before Radiation.* Godišnjak Biol. Inst., 41, 29, 1988.

Milin, R., Werner, R., Šćepović, M., Devečerski, V. et Krstić: *Contribution a l'etude de l'influence de l'organisme l'irradiation sur le ganglion de l'habenula et la glane pineale.* Ann. endocrinol., 24, 2, 380, 1963.

Pantić, V., Jovanović, M.: *Delovanje radiojoda na submikroskopsku organizaciju ćelija tiroideje.* Acta veterinaria, X, 4, 3, 1966.

Pantich, V.: *The Cytophysiology of the Thyroid Cells.* International review of cytology, 38, 1974.

Rixon, R. H. and Baird, K. M.: *Therapeutic Effects of Serotonin on the Survival of X Irradiation Rats.* Radiat. Res., 33, 395, 1968.

Strelkov, R. B., Kucherenkov, J., Vlasova, D., Kurochkina, O.: *Study of Radioprotective Effects of Adaptation to Hypoxia in Experiments on Rats.* Radiobiologia, 20, 1, 763, 1980.

Szabo, S., Kepsz, I., Lubacs, E. and Kapusi, A.: *Experimental Studies on Blood Protein and Imunogeneticy P^{32} Irradiated Animal-Radioprotective Effects of Serotonin.* Strahlentherapie, 135, 63, 1968.

Vriend, J., Russel, J., Reiter, J. and Anderson, R.: *Effects on Pineal and Melatonin on Thyroid Activity of Male Golden Hamsters.* General. and comparat. endocrinol., 38, 189, 1980.

Werner, R., Milin, R., Ciglar, M., Petruševska, M.: *Prilog proučavanju uticaja X zraka na štitnu žlijezdu.* Med. arhiv, 3, 53, 1961.

ANU BiH АНУ БиХ

ANU
BiH
АНУ
БиХ

MEHANIČKA TEORIJA KAUZALNE HISTOGENEZE KAO PODLOGA TUMAČENJA OSIFIKACIJE PRI DISTRAKCIJI KOSTI

IVO RUSZKOWSKI, OSMAN MUFTIĆ, TOMO PAVIĆ
Klinika za ortopediju Medicinskog fakulteta, Zagreb

UDC 617.3 : 616.71

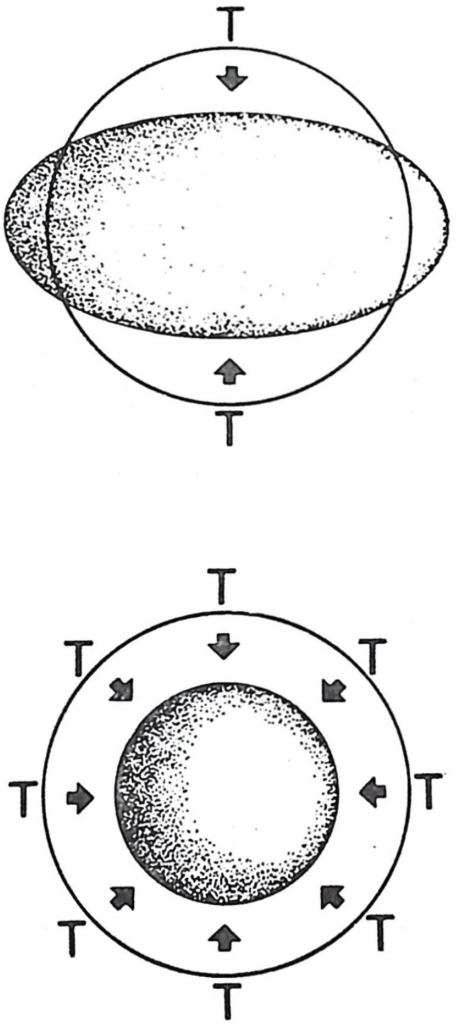
Apstrakt. U radu se daje pregled istraživanja mehaničkih činilaca na diferencijaciju potpornog tkiva u specifičnim uvjetima osifikacije pri distrakciji kosti. Od više teorija o nastanku koštanog tkiva osnovno mjesto ima Pauwelsova teorija o kauzalnoj histogenezi. Po njoj se, kao rezultat svih osnovnih naprezanja (tlak, vlak ili smik), stanica može samo deformirati ili se u njoj može povisiti hidrostatski tlak. Kombinacijom djelovanja različitih deformacija stanica uvjetovana je i diferencijacija potpornog tkiva. Druga teorija o djelovanju mehaničkih činilaca na hondrogenezu, kao osnovu osteogeneze, postavljena je od Krompechera. Po njoj nastaje kost zbog pritiska i hipoksije u granulacijskom tkivu, te se poremećajem mijene tvari stvara hrskavica. Autori su pokušali primjeniti te dvije osnovne teorije o kauzalnoj histogenezi i osifikaciji i dati tumačenje mehaničkih uzroka stvaranja koštanog tkiva pri distrakciji kod elongacija kosti. Zaključuju da Pauwelsova teorija, premda ne još potpuno razjašnejna, odgovara više mogućnosti osifikacije defekta nastalog distrakcijom kosti. U radu se naglašava važnost uzajamnog biomehaničkog i kliničkog istraživanja u rješavanju općenite problematike diferencijacije mikrostrukture potpornog tkiva.

Ključne riječi: kauzalna histogeneza, osifikacija, distrakcija kosti.

Prvi pokušaj tumačenja uloge mehaničkih činilaca u histogenezi potječe od Rouxa (1895), koji je, uglavnom spekulativno, teleološkim pristupom došao do zaključka o ulozi mehaničkih faktora na diferencijaciju potpornog tkiva. Po njegovoj hipotezi, vlačna naprezanja uzrokuju stvaranje vezivnog tkiva, izolirana tlačna ili vlačna naizmjenično s tlačnim kost, a smična s tlačnim ili vlačnim hrskavicu. Diferencirani mehanički podražaji mezenhimalne stanice, kako ih je u svojem istraživanju prikazao Roux, osnova su kasnijih tumačenja o mehaničkim utjecajima na formiranje potpornog tkiva (Benninghoff, 1942, Pauwels, 1940, 1960; Krompecher i Toth, 1964). Naročito se Krompecher bavio kauzalnom hondogenezom kao osnovom osifikacije i zaključio da pritisak stvara u sanaciji kosti hrskavični kalus.

Pauwels je u oštroj diskusiji osporio Krompecherove tvrdnje i nazvao njegova istraživanja kao »slučajna zapažanja«, tj. da, kako tvrdi Krompecher, stvaranje hrskavične stanice nastaje zbog pritiska i hipoksije granulacijskog tkiva.

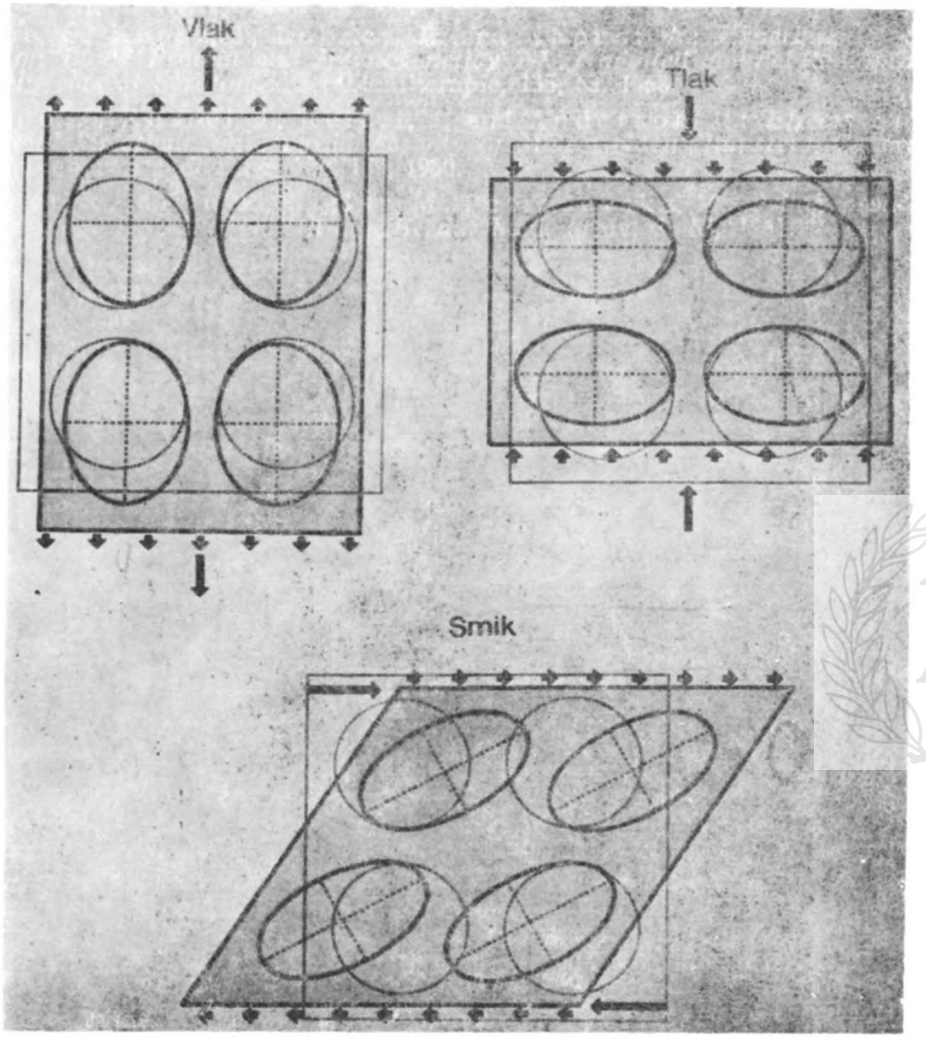
Pauwels je teorijski, grafički i matematski dokazao da različite osnovne kvalitete naprezanja (tlačna, vlačna i smična) ne mogu biti uzrok diferencijacija mezemhimalnog tkiva u potporno. Ta naprezanja se svode samo na dvije komponente elastične deformacije, i to na promjenu oblika i promjenu hidrostatskog tlaka u stanici (slika 1). Oslanjajući se na teoriju hidrodinamike, svoje mišljenje bazira



Slika 1. Deformacija idealizirane stanice (gore), povišenje hidrostatskog pritiska u stanici (dolje)

na činjenici da se elastično kuglasto tijelo, komparirajući ga pojednostavljeno s mezenhimalnom stanicom ponaša u okolnoj supstanci tako da se u jednom smjeru splošti i okomito na taj smjer rastegne bilo da na njega djeluje vlak, tlak ili smik (slika 2). Razvlačenje stanice čini mehanički podražaj za stvaranje kolagenih fibrila, koje se

postavljaju u smjeru najjačeg vlaka i tako osiguravaju otpornost za dalje rastezanje. Ako tako zamišljena stanica bude podvrgnuta utjecaju sile koja tlačno djeluje sa svih strana podjednako, doći će u stanici do povišenog hidrostatskog tlaka, a da se oblik stanice bitno

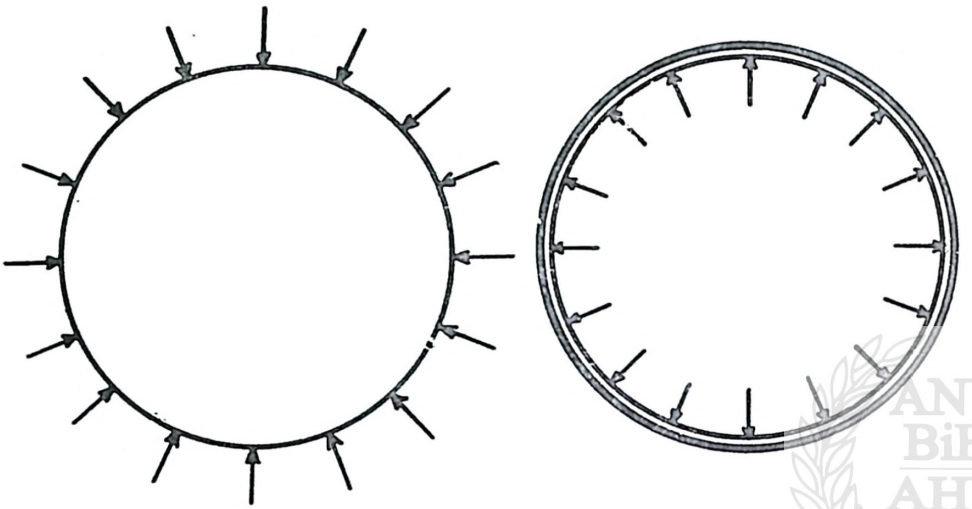


Slika 2. Deformacija idealizirane stanice u međustaničnoj supstanci djelovanjem vlaka, tlaka i smika

ne promijeni (slika 3). Drži se da to stanje povišenog hidrostatskog tlaka provocira bubrenje stanica i promjenu njene tvari s produkcijom hondromukcida. To je, po mišljenju Pauwelsa i Kummera, osnova diferencijacije mezenhimalne stanice u hrskavičnu stanicu. Isti autori misle da povišenje hidrostatskog tlaka u stanici može uzrokovati i unutrašnja sila koja nastaje biološkim potencijalom rasta stanice. Pretpostavljaju da i dijeljenja mezenhimalnih stanica u jednom ograničenom području mogu dovesti do rastezanja staničnih struk-

ANU BiH АНУ БиХ

tura na površini toga područja sa stvaranjem vezivnih fibrila. Na taj bi način trebala nastati, na rastezanje otporna ovojnica, a daljim razmnaženjem stanica bi se povisivao hidrostatski tlak u samim stanicama. Ako intermitentna naprezanja, odnosno promjena oblika stanice nestane, dolazi do stvaranja koštane stanice enhondralnom ili dezmalnom osifikacijom. Prema tome, koštano je tkivo sekundarno tkivo, koje nastaje iz hrskavičnog ili vezivnog tkiva, koje kasnije preuzima po obliku i strukturi mehaničku zadaću kosti uključivanjem procesa funkcijske prilagodbe.



Slika 3. Prikaz djelovanja povišenog hidrostatičkog tlaka u idealiziranoj stanici

Mehanički uzročnici diferencijacije potpornog tkiva nisu još potpuno razjašnjeni. Međutim očito je da se mehaničko tumačenje diferencijacije stanice, koje je Pauwels nazvao kauzalnom histogenezom, uklapa u niz endogenih i egzogenih, manje ili više razjašnjenih zbivanja. Taj teorijski pristup ima svoju potvrdu i u tumačenjima više funkcijskih poremećaja i deformacija sustava za kretanje, a pogotovo se uklapa u kliničke mehanizme funkcijske prilagodbe skeleta.

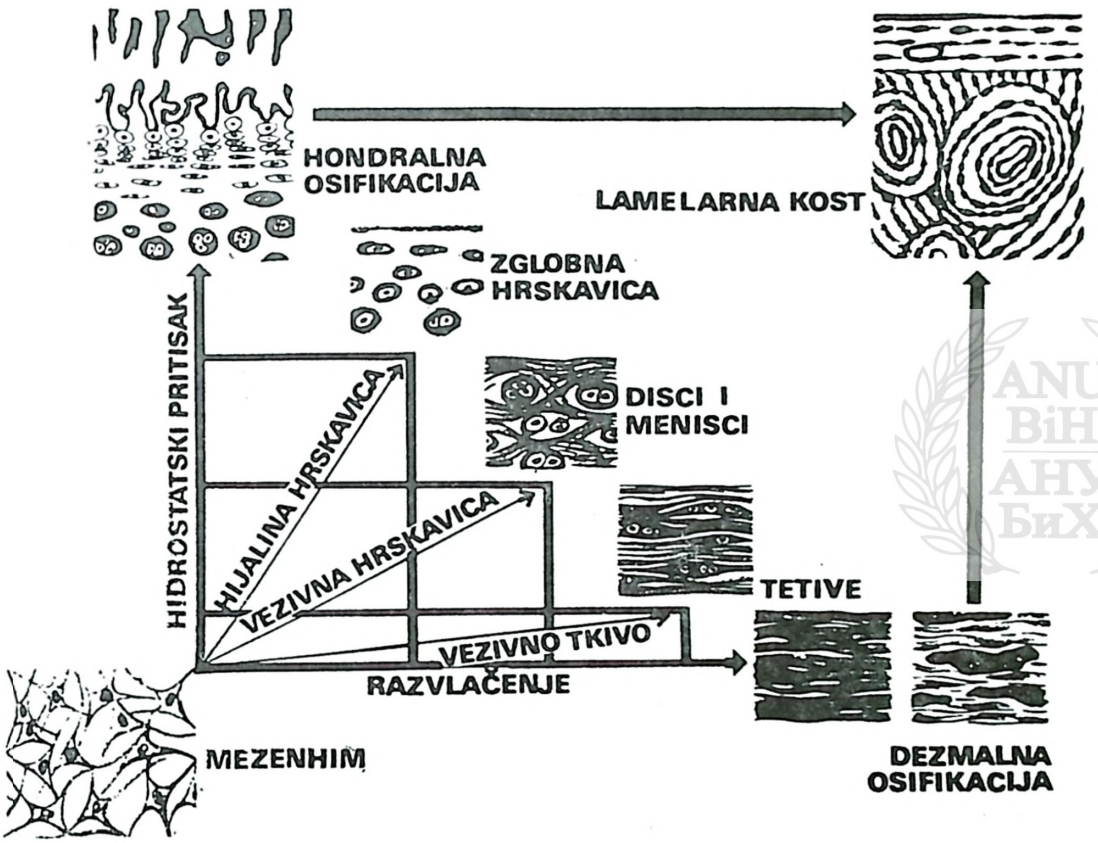
Iz teorijskih postavki i kliničkih zapažanja se može zaključiti da je proces osifikacije multifaktorijalno uzrokovan i da postoje pluripotentni procesi isprepletenih bioloških i mehaničkih zbivanja (R u s z k o w s k i).

Ako sada želimo razmatrati ulogu mehaničkih činitelja u okoštavanju pri distrakciji kosti treba konstatirati:

Mehanički se podražaji u procesu osifikacije uklapaju u niz poznatih, djelomično poznatih, a i nepoznatih zbivanja. Tu spada općenito genetski kodeks s dominantnim utjecajem na oblikovanje i strukturu kosti. Zatim tu spadaju hormonski, biokemijski i metabolički uzročnici, te procesi elektrobiološke stimulacije esteogeneze, posebno utjecaji pizoelektričnog potencijala na rast i deferencijaciju stanica.

Ti se efekti, kako se drži, javljaju u molekulama stanica, a uzrokovani su mehaničkom stimulacijom. Nadalje tu spadaju još nedovoljno istraženi utjecaji enzimsko-metaboličke transformacije, molekularno-jonski procesi, te osnovni mehanizmi molekularne cirkulacije.

Mehanički podražaji imaju dominantni i protumačeni utjecaj u kasnijoj fazi osifikacije, što se tiče poznatih načina funkcijske prilagodbe u klinici, a koji se mogu opetovano evidentirati i u mikrostrukturi kosti.



Slika 4. Diferencijacija potpornog tkiva uzrokovana deformacijom (rastezanjem) i povećanjem hidrostatskog pritiska u stanici

Tumačenje uloge mehaničkih podražaja na diferencijaciju potpornog tkiva i osifikaciju pri distrakciji kosti može se djelomično dovesti u vezu s Rouxovom hipotezom, kao i Pauwelsovom teorijom o kauzalnoj histogenezi. Primjena Pauwelsove teorije o diferencijaciji mikrostrukture potpornog tkiva, za razliku od Krompecherove, može se, barem teorijski, uklopiti u te procese, što se tiče definicije sile u vezi s biološkim zbivanjima i u osifikaciji pri distrakciji kosti.

ANU BiH АНУ БиХ

Od pretežno bioloških pristupa tumačenjima ostegeneze treba spomenuti istraživanja T r u e t e. Radi se o dezmalnoj i angiogenoj osifikaciji, u kojoj se podređuje mehaničko djelovanje u procesu osteogeneze.

U vrlo interesantnoj i još nerazjašnjenoj osifikaciji pri distrakciji kosti nisu još znanstveno dokazani osnovni uzroci stvaranja, odnosno diferencijacije hrskavičnih stanica s odlaganjem hrskavičnog matriksa. Također nije razjašnjen ni neposredni uzrok degeneracije hrskavičnog matriksa sa stvaranjem i aktivnošću osteoblasta, a isto tako ni kalcifikacija organskog matriksa.

Mišljenja smo da će se objektivna znanstvena provjera direktnog utjecaja mehaničke sile na diferencijaciju potpornog tkiva, odnosno na stvaranje koštanog tkiva teško moći ostvariti. Trebalo bi naime u osnovi odrediti interreakciju sile, odnosno naprezanja u pojedinim stanicama i tkivima s njihovim biološkim reakcijama. Zbog toga su eminentno važna eksperimentalna istraživanja u korelaciji s kliničkim istraživanjima. To se posebno odnosi i na istraživanja procesa osifikacije pri distrakciji kosti primijenjenoj u elongaciji dugih kostiju sa svrhom dobivanja saznanja postupkom usklađivanja teorijskih postavki, eksperimentalnih istraživanja i kliničkih zapažanja. Takva interdisciplinarna biomehanička i klinička istraživanja bi mogla biti i jedan od mogućih pristupa u tumačenjima ispravnosti teorije o kauzalnoj histogenezi u diferencijaciji mikrostrukture potpornog tkiva.

MECHANICAL THEORY OF CAUSAL HISTOGENESIS AS A BASE OF THE EXPLANATION OF OSSIFICATION WITH DISTRACTION OF BONES

S u m m a r y

The work presents the research view of mechanical factors on supporting tissue differentiation in a specific ossification conditions in the case of bone distraction. Among many theories of bone distraction genesis, the basic place takes the Pauwels theory of causal histogenesis. According to this theory — and as the results of all the basic strains (pressure, tension, or shear) the cell itself may only be deformed or the hydrostatic pressure in it my be heightened. The influence combination of different cell deformations stipulates for the supporting tissue differentiation as well. The second theory about the influence of mechanical factors upon hondrogenesis, as the osteogenesis basis, is given by Krompecher. According to this theory the bone is produced because of pressure and hypoxis in granulous tissue, and under the influence of the substance change disturbance the cartilage is formed. The authors has tried to apply these two basic theories about causal histogenesis and ossification, and to explain the mechanical causes of bone-tissue performing in distraction of bone elongation. The authors conclude that Pauwels theory, although not yet completely explained, corresponds more to the ossification possibility of a defect proceeded by bone distraction. In the work the importance of mutual biomechanical and clinical research is stressed in solving the common problems of microstructure supporting tissue differentiation.

LITERATURA

Benninghoff, A. (1924): *Experimentelle Untersuchungen über den Einfluss verschiedenartigen Beanspruchung auf den Knorpel,* Verh Anat Ges; 195: 114—21.

Kummer, B. (1959): *Bauprinzipien des Säugerskeletes,* Stuttgart: Thieme, 163.

Krompecher, St., Tóth, L. (1964): *Die Konception von Kompression, Hypoxie und konsekutiver Mucopolysacharidbildung in der kausalen Analyse der Chondrogenese; Biophysikalische Versuche als Kritik der »hydrostatischen« Theorie von Pauwels,* Z. Anat Entwickl Gesch; 124:124—20.

Pauwels, F. (1960): *Eine neue Theorie über den Einfluss mechanischer Reize auf die Differenzierung der Stützgewebe,* Z Anat, 121:478—385.

Roux, W. (1985): *Gesammelte Abhandlungen über Entwicklungsmechanik der Organismen B. II,* Leipzig: Engelmann.

Ruszkowski, I. (1989): *Osnove primijenjene biomehanike zgloba kuka,* Medicinski fakultet. Zagreb, 48.

ANU BiH АНУ БиХ

ANU
BiH
АНУ
БиХ

ISKUSTVA I PROBLEMI KOD PRODUŽAVANJA EKSTREMITETA NA UNIVERZITETSKOJ ORTOPEDSKOJ KLINICI U LJUBLJANI

FRANC SRAKAR
Univerzizetska ortopedska klinika, Ljubljana

UDC 617.3 : 617.5

Apstrakt. Na osnovu 25-godišnjeg iskustva kod produžavanja ekstremiteta i analize 223 elongacije iznosimo iskustva i kritički ocjenjujemo naš rad na tom području. Iskustvom su prevaziđeni mnogi problemi i smanjio se broj komplikacija. Istovremeno su se proširile indikacije, pa pokušavamo izjednačiti dužine i kod razvojno teško pogođenih udova. Kod njih se pojavljuju novi i veći problemi i nove komplikacije.

Ključne riječi: produžavanje ekstremiteta, problemi i komplikacije.

UVOD

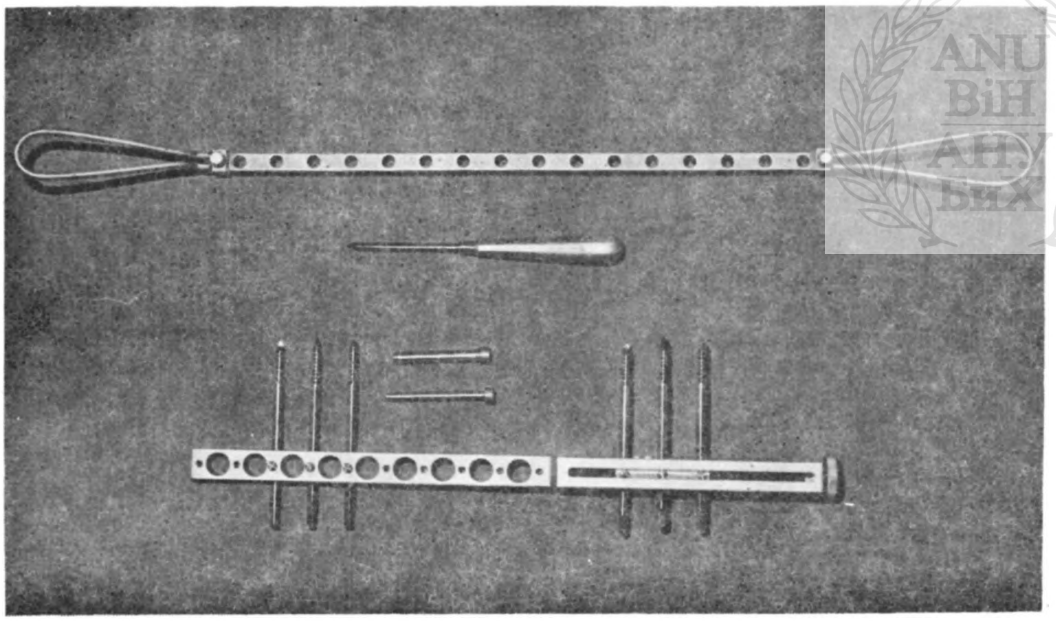
Razlika u dužini donjih ekstremiteta je ozbiljna funkcionalna i morfološka smetnja. Zbog nje su promijenjeni shema hoda, opterećenje i funkcije zglobova donjih ekstremiteta i kičme, povećan je utrošak energije. Asimetrija tijela, odnosno držanje, šepanje, nejednaka visina koljena, nagnuta zdjelica i druge kompenzatorne promjene često prouzrokuju i teško psihičko opterećenje. Naročito su osjetljive djevojke u pubertetu i žene uopće. Razvijaju se kompleksi, a kasnije često i neuroze. Zato moramo kod odluka za rješavanje nejednakosti u dužini ekstremiteta poštivati ne samo funkcionalne nego i estetsko-psihološke faktore (5).

Funkcionalno rješavanje skraćenja savremenim ortopedskim pomagalima može biti jako uspješno. Problem je u tome da ga bolesnici nerado prihvaćaju kao trajno rješenje i uporno traže izjednačavanje dužine operacijom.

Na Univerzitetskoj ortopedskoj klinici u Ljubljani smo počeli sa prvim operacijama za smanjenje razlike u dužini prije skoro 40 godina (3), a od 1963. vršimo mehanička produžavanja kosti. Usvojili smo metodu Andersona (1), koja je bila osnov i za sve druge metode i modifikacije koje se danas upotrebljavaju. Bit Andersonovog metoda je da se pomoću vanjskog distraktora postepeno razvlače krajevi subperiostalno prekinute kosti. Kost istovremeno zarasta i rasteže se.

Kopijom Andersenovog bipolarnog distraktora smo produžavali samo potkoljenice. Najčešći uzrok skraćenja je bio u to doba dječija paraliza. Skelet paralitičnih udova je bio atrofičan, pa je bilo dosta problema zbog sporog stvaranja kalusa i komplikacija u vidu preloma produženih kostiju poslije odstranjenja distraktora. Da bismo to sprečili, primjenjivali smo dodatne zahvate radi bržeg i boljeg stvaranja kalusa. Sa mioperiostalnom dekortikacijom za vrijeme osteotomije postigli smo brže i obilnije stvaranje kalusa. Dalje smo uveli transplantaciju spongiozne kosti iz koštane banke kada smo po završenoj distrakciji zamijenili distraktor osteosintezom. Taj metod smo primjenjivali ranije nego je to bilo publicirano u stručnoj literaturi i ostalo poznato kao Wagnerova metoda (6).

Bipolarni distraktor po Andersonu smo mogli upotrebljavati samo na potkoljenici. Problemi prekratkih natkoljenica su tražili rješenje i za tu regiju. Izradili smo prototip unipolarnog distraktora, koji smo počeli primjenjivati 1972. godine. Prvi prototip je bio usavršen i g. 1973. je bio usvojen kao distraktor po Srakaru, a proizvodila ga je firma Instrumentaria iz Zagreba (kataloški broj 74-403). Taj

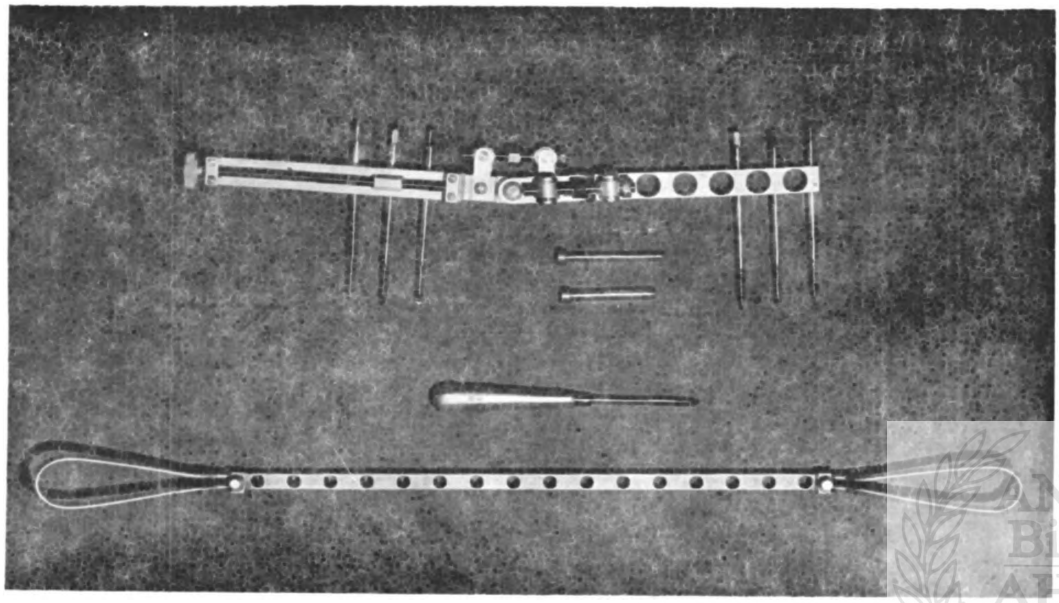


Sl. 1.

distraktor sa pomoćnim instrumentima za aplikaciju (sl. 1) se pokazao kao primjeren za produženja na kostima gornjeg i donjeg ekstremiteta. Njime smo izvršili pretežni dio elongacija.

Prateći novosti na području elongacija, uveli smo i druge distraktore: Wagnerov 1974. g., AO cijevni sistem 1983, Ortofix 1986, Ilizarov (Lima) 1986. godine. Od 1978. upotrebljavamo i drugu verziju

Srakarovog distraktora, koji omogućava korekcije osi (sl. 2) (kataloški broj 74-420). Pogodan je naročito kada su kosti i angulirane. Kod većih deformacija i angulacija sve više upotrebljavamo elongacijski sistem po Ilizarovu. Njegova prednost je prije svega u tome da možemo fiksacione žice staviti blizu zgloba, što omogućava i osteotomije u predjelu metafiza (4).



Sl. 2.

Analiza našeg materijala je učinjena za period od 25 godina (1963—1987). U to doba smo izvršili 223 elongacije dugih kosti kod 187 bolesnika. Prosječna starost je bila 13,9 godina sa rasponom od 5—30 godina.

Tabela 1. ETIOLOGIJA SKRAĆENJA

	n	%
Poliomielitis	40	21,4
Hipoplazija	19	10,1
Dismelija	39	20,9
Infekcija kosti	21	11,2
Trauma	31	16,6
Smetnje cirkulacije	20	10,7
Ahondroplazija	4	2,1
Dishondroplazija	13	7,0
	187	100,0

Na tabeli je prikazana etiologija skraćenja. Dječja paraliza, koja je bila po učestalosti vodeća je nestala. U porastu je broj kongenitalnih anomalija sa skraćenjem i posttraumatskih uzroka.

Tabela 2. PRIKAZ ELONGACIJE KOSTI

Lokalizacija	n	%
Femur	87	39,0
Tibija	118	52,9
Fibula	4	1,8
Humerus	4	1,8
Radijus	3	1,4
Ulna	7	3,1
	223	100,0

Na tabeli 2 su prikazane lokalizacije i broj elongacija. Kod 10 pacijenata je elongacija na istoj kosti bila ponovljena. Kod jednoog bolesnika smo ponovili elongaciju na obje kosti istog ekstremiteta sa ukupnim produženjem 38 cm.

Tabela 3. DUŽINE ELONGACIJE U mm

Lokalizacija	Prosjek	Maksimum	Minimum
Femur	66	120	35
Tibija	46	100	18
Fibula	22	30	15
Humerus	66	80	60
Radijus	21	45	15
Ulna	31	47	17

Na tabeli 3 su prikazana produženja u mm na pojedinim kostima.

Tabela 4. KOMPLIKACIJE

	n	%
Osteomielitis	2	0,9
Non-union	6	2,7
Prelom kosti	10	4,5
Ozljeda nerva	2	0,9
Kontraktura	18	8,1
Prelom ploče	3	1,3
Kasno iščašenje kuka	2	0,9
Subluksacija kuka	1	0,5
Subluksacija koljena	2	0,9
	46	20,7

Na tabeli 4 su prikazane značajnije komplikacije kod produžavanja ekstremiteta.

Kod oba primjera osteomielitisa posrijedi je reaktivacija procesa na kosti skraćenoj zbog osteomielitisa.

Problemi zarastanja preloma su iz ranije dobi, većinom nastali na atrofičnim kostima paretičnih udova.

Oštećenja nerva su bila prolazna. Uporne kontrakture smo rješavali produženjima tetiva. Rješavanje luksacija i subluksacija je bilo najteže, ali smo uspjeli postići dobre repozicije sa očuvanjem funkcije. Tako nije ni kod jednog našeg pacijenta došlo do toga da je konačna situacija bila lošija od ishodne.

Kod elongacija nisu glavni problem distraktori i njihova aplikacija, nego čitav postupak od indikacije za zahvat, pa do konačnog funkcionalnog rezultata. Postupak mora biti takav da vodi do optimalnog funkcionalnog rezultata sa što manje operativnih zahvata, sa što manje subjektivnih poteškoća i komplikacija.

DISKUSIJA

Kod elongacije ekstremiteta nije od odlučujućeg značaja tip distraktora. Kod svih se koristi princip koji je izradio Anderson. Isto tako se mogu i mnogo kasnije usvojene metode i modifikacije više ili manje uspješno koristiti kod svih distraktora. Tako se može izvoditi dinamizacija kalusa ne samo kod »Ortofixa« nego i kod ostalih aparata, s time da se skraćivanjem distraktora stavi kalus pod opterećenje. Isto tako su moguće osteotomije ili kortikotomije u metafizarnom predjelu i kod unipolarnih distraktora, naročito onih sa modifikacijama za poprečno postavljanje vijaka. Ako kritički ocjenjujemo, vidimo da nije problem i poteškoća u postavljanju distraktora i rastezanju kosti (unutar realnih granica). Problem može biti postizanje zarastanja kosti bez komplikacija. Već kod postupka produžavanja se mogu pojaviti mnogi problemi. Ako ih ne shvatimo pravilno i ako ne postupamo racionalno, mogu dovesti do komplikacija. Zato je iznimno važno poznavanje problematike elongacije i iskustvo (4).

Na osnovu našeg više od 25-godišnjeg iskustva ćemo nabrojiti sve najvažnije probleme koji se javljaju kod produžavanja ekstremiteta kao i načine kako da ih savladamo.

Infekcija

Za sprečavanje infekcija su odlučujuće rigorozne higijenske mjere. Ako se pojavi površinska infekcija uz žicu ili vijak, potrebno je prestati sa produžavanjem za koji dan i staviti lokalno hladni, antiseptični oblog. Ako je koža kod žice ili vijka napeta, nužna je incizija na strani pritiska u lokalnoj anesteziji. Samo ako se infekcija ne smiri i prijeti da se proširi u dubinu, indicirana je terapija antibioticima.

Kontrakture

Spora adaptacija mišića na novu dužinu vodi do kontraktura. Iznimno je važno da eventualne postojeće kontrakture odstranimo već prije elongacije. Za vrijeme produžavanja je potrebno vježbama i upo-

trebom posebnih sprava sprečavati nastanak kontrakture. Ako se one ipak pojave i uvećaju, moramo pravovremeno odlučiti usporenje ili prekid elongacije. U suprotnom slučaju će nastati kontrakture koje se mogu odstraniti samo operacijama, a mogu prouzrokovati i kasnija iščašenja.

Naravno da postoje mogućnosti da kod produžavanja kod nekih kongenitalnih anomalija fiksiramo u elongacioni sistem i susjedni predio (na primjer stopalo kod elongacije potkoljenice). Time sprečavamo promjenu položaja (nastanak kontrakture) za vrijeme elongacije, ali to »nasilje« može prouzrokovati kasnije posljedice u vidu rigidnosti skočnog zgloba i pojave naknadne deformacije.

Stvaranje kalusa i njegovo remodeliranje

Kod atrofičnih kostiju, naročito kod paralitičnih udova, manjkavo je stvaranje kalusa česti problem. Mioperiostalnom dekortikacijom se može poboljšati stvaranje nove kosti. Važno je i da ne oštetimo tkiva na mjestu gdje počinje reparatorni proces. Da spriječimo termičnu ozljedu, preporučujemo kod osteotomije dlijeto umjesto oscilirajuće pile. Do sada nije sa sigurnošću dokazana prednost kortikotomije pred osteotomijom, ali je dokazano da je stvaranje kalusa brže u spongioznom dijelu nego u kortikalnom.

Dalje je dokazano da početak elongacije 7—10 dana iza osteotomije (Callotasis italijanskih autora) ima prednosti. Eksperimentalno (4) i klinički je dokazano brže stvaranje kalusa ako je dnevno razvlačenje podijeljeno na više faza (na primjer 4 x 1§4 mm umjesto 1 x 1 mm).

Pozitivni uticaj stimulusa opterećenja je dokazan kod reparacije kosti uopšte, isto tako i kod elongacije u fazi razvlačenja kalusa, kao u fazi remodelacije kalusa. Česti problem kod toga je kako postići da pacijenti pravilno i dovoljno opterećuju.

Kod velikih produžavanja, gdje odlučujemo da osteosintezom zamijenimo distraktor, kod usporenog stvaranja kalusa spongioplastika nam bitno poboljšava uslove za brže zarastanje i konsolidaciju kalusa.

Sprečavanje frakture novostvorene kosti

Novostvorena kost može rendgenski izgledati dovoljno mineralizirana i sposobna je za uzdužno opterećenje, ali nije dovoljno i pravilno armirana kolagenim vlaknima, pa nije dovoljno otporna na torziju. Zbog toga je potreban oprez najmanje pola godine po odstranjenju vanjske fiksacije. Kod osteosinteza nastaje spongiozacija kortikalne kosti, pa može doći do frakture po oduzimanju osteosintetskog materijala. To sprečavamo ako najprije odstranimo veći dio vijaka, da kost preuzima funkciju, pa za nekoliko mjeseci odstranimo i preostalo.

Mjesto drugih metoda za izjednačenje dužine

Biološke metode stimulacije i zaustavljanja rasta imaju svoje mjesto kod manjih skraćenja ili kod naročito velikih, gdje moramo koristiti sve mogućnosti da razliku smanjimo. One su vezane samo za određeni period u dobu rasta.

Od ostalih mehaničkih metoda sve više koristimo skraćenje kosti. S obzirom da su pacijenti mlade generacije dovoljno visoki, to je najracionalniji metod. Rizika komplikacije skoro da nema, adaptacija mekih tkiva je idealna, hospitalizacija je kratka i vrijeme funkcionalne nesposobnosti (pacijent je pokretan na štakama) traje samo 2 mjeseca.

ZAKLJUČCI

Mogućnosti savremene koštane hirurgije, usvojeno znanje i iskustva omogućuju nam uspješno operativno rješavanje nejednakosti u dužini ekstremiteta i njihovo produžavanje kod patuljastog rasta. S obzirom na uzrok skraćenja, imamo najviše poteškoća i ograničenja kod kongenitalnih malformacija ekstremiteta.

Kod izjednačavanja dužine, odnosno produžavanja ekstremiteta važnije je od izbora distraktora poštivanje i korištenje svih faktora koji vode do bržeg i boljeg stvaranja nove kosti i sprečavanja kontraktura. U tome su odlučujući: pravilna indikacija, optimalno mjesto i oblik osteotomije, pravilna taktika produživanja, sprečavanje kontrakture, te rano i dosljedno opterećivanje.

EXPERIENCES AND PROBLEMS WITH EXTREMITY LENGTHENING AT THE UNIVERSITY ORTHOPEDIC CLINIC IN LJUBLJANA

Summary

The work presents our 25-year experience with lengthening of extremities at the University Department of Orthopedic Surgery in Ljubljana. A total of 223 lengthening procedures, performed on 187 patients, have been reviewed. On the basis of this analysis, the problems attending the procedures and ways of avoiding and reducing complications are discussed. The importance of knowledge and experience in all phases of the lengthening procedure is emphasized in the conclusion.

LITERATURA

(1) Anderson, W. V.: *Leg Lenghtening*, J. Bone Jt. Surg., 1952 34-B, 150.

(2) De Bastiani, G., Aldeghieri, R., Renji-Privio, L., Trivela, G., *Limb Lenghtening by Callus Distraction (callotasis)*, J. Pediatr. Orthop. 1987, 7: 129—134.

(3) Derganc, F.: *Doprinos k operativnom tretmanu nejednako dugih ekstremiteta kod djece*, Radovi III kongresa JUOT, Zagreb 1965, 216.

(4) **Paley, D.:** *Current Techniques of Limb Lenghtening,* J. Pediatr. Orthop., Vol. 8, 1988, 73—92.

(5) **Radulović, B.:** *Hirurška korekcija nejednakosti donjih ekstremiteta,* Medic. fak. Beograd, Disertacija, Beograd, 1972.

(6) **Wagner, H.:** *Technik und Indikation der operativen Verkürzung und Verlängerung von Ober und Unterschenkel,* Der Orthopäde, Band 1, Heft 1, 1972, 59—74.

ANU BiH АНУ БиХ

METODA ILIZAROVA — OSOBENOSTI TEHNIKE I MOGUĆNOST PRIMJENE

NIKOLA MILIĆEVIĆ
Ortopedska klinika, Sarajevo

UDC 617.3:617.5

Apstrakt. Tehnika vanjske fiksacije, sa mogućnostima kompresije i distrakcije su glavne karakteristike tehnike Ilizarova.

Postupna distrakcija poslije kortikotomije i aplikacija aparata preko Kirschnerovih igala pod tenzijom daju mogućnost sukcesivnog stvaranja nove kosti »regenerata«, a istovremeno omogućuju stalno, potpuno ili djelimično opterećivanje.

U radu su prikazane naše mogućnosti aplikacije aparata i primjene tehnike te postignuti rezultati kod 324 aplikacije, raznih patoloških stanja.

Ključne riječi: distrakcija, kompresija, kortikotomija, regenerat, aparat Ilizarova, egealizacija.

UVOD

Da bi čovjek mogao normalno da hoda neophodno je da ima jednaku dužinu oba donja ekstremiteta. Zbog ove postavke i želje kao i potrebe svakog čovjeka da normalno hoda, želja ortopedskih hirurga da operacijom postignu egalizaciju ekstremiteta potiče od Dmitrova (1882) i Maxa Schedea (1980) godine.

Prije pokušaja operativnih egaliteta, ovaj problem je rješavan uz pomoć protetske nadoknade inegaliteta.

Prvi aparat konstruisan za distrakciju potiče od Larga Abolteа iz 1927. godine. Od 1927. pa do pojave publikacije o vanjskom fiksatoru koji je konstruisao Ilizarov 1954. godine, kao i kasnije, bilo je »bezbroj« pokušaja da se pronađu metode koje bi unaprijedile dotadašnje načine u liječenju inegaliteta (La Coer, Merle D'Aubigne, Andersen, Trueta, Wagner i dr.). Sve ove metode su bile vezane za vrlo opsežne operativne zahvate, i to ne samo u jednom aktu nego, već od početka isplaniranih, dva do tri operativna zahvata. I pored opsežnih i više operativnih zahvata, mogućnost dobivene dužine je ograničena — ne možemo dobiti koliko nam treba, nego smo limitirani samom tehnikom.

G. A. Ilizarov je konstruisao i počeo upotrebljavati svoj aparat 1952. godine, a publikovao je prve rezultate o vrijednosti primjene aparata u liječenju pseudoartroza 1954. Primijenjena je kombinacija lokalne kompresije praćene distrakcijom i na kraju kompresijom.

1964. godine Ilizarov je primijenio tehniku distrakcije uz kortikotomiju kosti radi prolongacije. Ovakva tehnika u prolongaciji je prva bez dodatne operacije i bez upotrebe koštanog grafta. Svoja prva iskustva na većem broju primjene autor je (12, 7, 13) publikovao 1969. godine. Ilizarov je na osnovu eksperimentalnog rada i kliničkog iskustva dorađivao tehniku, a sve na postavkama distrakcije i kompresije.

Tako je 1979. godine počeo raditi kortikotomiju na dva nivoa: formiranje stopala od dijelova amputiranih potkoljenica, prolongacija stopala od ostatka bataljaka pri amputiranim stopalima; produžavanje prstiju na šakama kod ostatka amputiranih bataljaka te potom kod hipofalangija.

Iste godine počinje raditi uporišne osteotomije kod neliječenih luksacija zgloba kuka.

Indikacije za primjenu aparata Ilizarova:

— *niski rast* (nanosomia i achondroplazia);
— *inegaliteti ekstremiteta* (postupalni, posttraumatski, kongenitalni, kao posljedica neuromuskularnih oboljenja);
— *druge kongenitalne malformacije na lokomotornom aparatu* (cong. pseudoartroza tibije, perimelije, ektomelije);
— *svježi prolemi* (zatvoreni i otvoreni);
— *nezarasli prelomi* (inflamirane i neinflamirane pseudoartroze).

MATERIJAL I METOD

Moji lični kontakti sa G. A. Ilizarovim počinju od 1983. godine, a preko literature od 1976. godine. Od 1983. godine upoznajem tehniku, kao i njene osobenosti u ličnom kontaktu sa autorom i odmah počinjem primjenu.

U čemu je osobenost i različitost tehnike u odnosu na do tada primjenjivane tehnike u rješavanju određenih patoloških stanja (1, 3, 9, 11, 14, 18, 20, 31)?

Razlika je u tome što se aparatom Ilizarova može provoditi distrakcija i kompresija na istom segmentu u toku tretmana, a prema potrebi, sve u zavisnosti od patološkog stanja i potrebe (distrakcija ili kompresija).

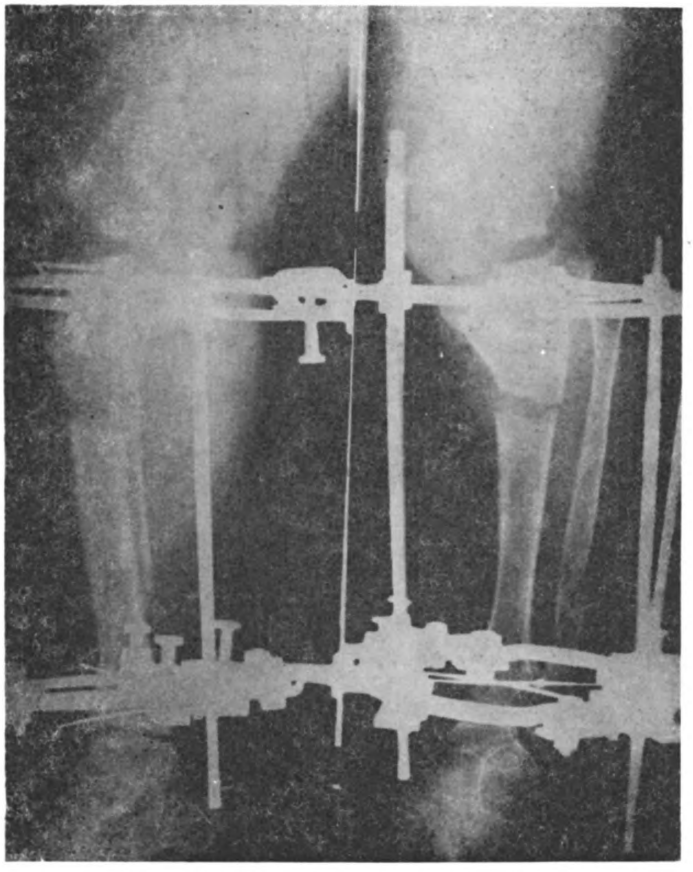
Kod aplikacije aparata, za provlačenje kroz kost koriste se Kirschnerove igle debljine 1,5; 1,8 ili 2,00 mm. Igle se dovode pod tenzi-

ju pri fiksiranju za mehanizam na krugu do 30 kg. Krugovi se spajaju sa deblima ili spojnicama koje su različite forme i dužine prema potrebi primjene.

Operacije su najčešće kortikotomija, tj. presjecanje koorteksa bez da se povrijedi medularni kanal kosti, a još važnije je (sl. 1) da se ne povrijedi periost.

Važna novina je da operacije nisu opsežne i vrlo rijetko zahtijevaju transfuziju krvi, što pokazuje opsežnost samog zahvata.

Ako je tretman inegaliteta dužine ekstremiteta, po završnoj aplikaciji aparata, 5 do 7 dana se započinje sa distrakcijom (7, 9, 22). Distrakcija može biti na jednom ili dva nivoa, a prema tome distrakcija se provodi na jedan ili dva milimetra dnevno, što je 3 do 6 cm za mjesec dana. Prostor — praznina dobivena distrakcijom popunjava se spontano — stvaranjem regenerata.

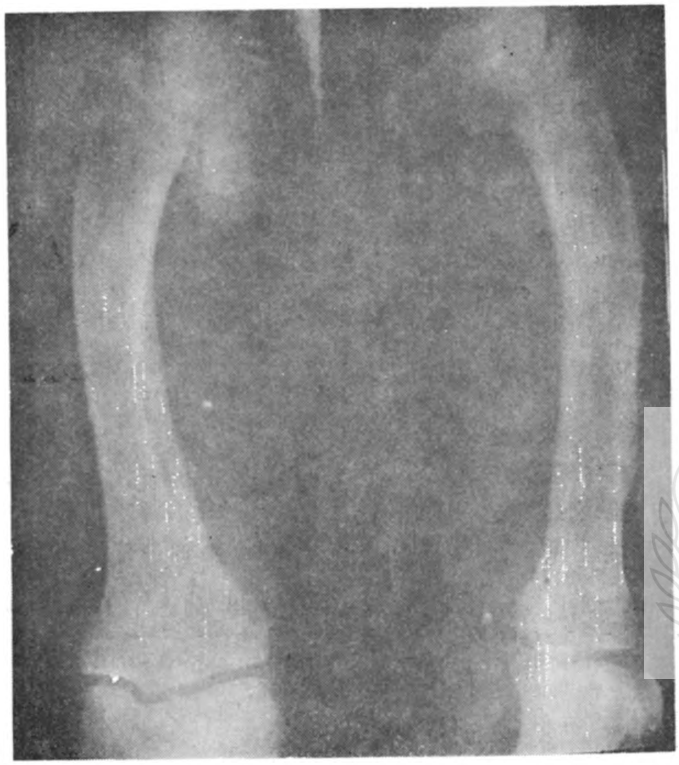


Sl. 1. Aparat Ilizarova apliciran na potkoljenici i započeta distrakcija

Nova kost se stvara spontanom osteogenezom i do 27 cm, kao u jednom našem slučaju (sl. 2. a, b, c) bez dodatnih transplantacija spongioze i koštanih graftova.

BROJ APLIKACIJA APAARTA KOD RAZNIH PATOLOŠKIH STANJA PO GODINAMA

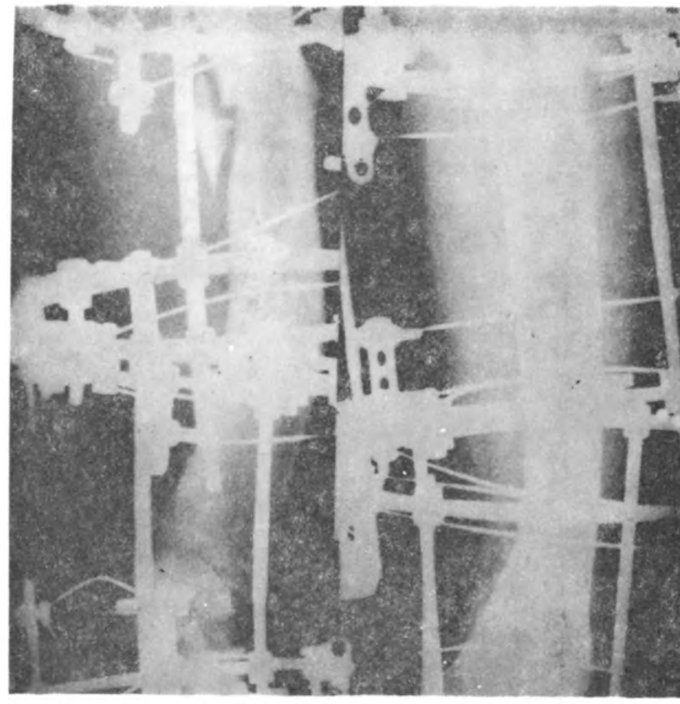
1984.	1985.	1986.	1987.	1988.	ukupno
19 slučajeva	69	97	81	84	324 slučaja
(5,864%)	(21,296%)	(29,938%)	(25%)	(25,925%)	(100%)



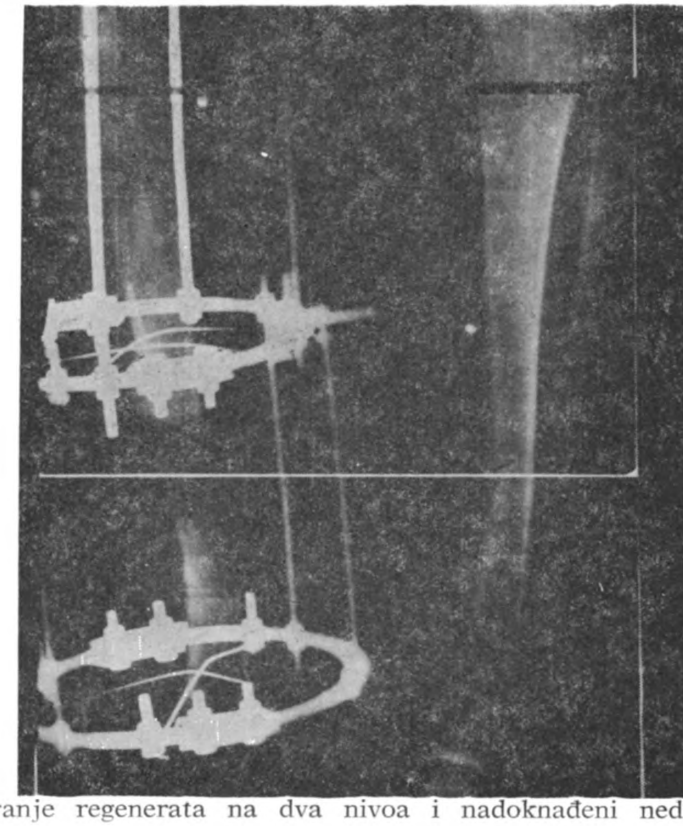
Sl. 2. Slučaj ektomelije sa luksacijom tibiotalarnog zgloba i sa nedostatkom dužine od 27 cm

ETIOLOŠKI UZROČNICI KOJI SU DOVELI DO POTREBE LIJEČENJA APARATOM ILIZAROVA

— Niski rast	21	(6,481%)
— Kongenitalna luksacija kuka i posljedice liječenih luksacija i druge kongenitalne malformacije	175	(54,012%)
— Posttraumatska skraćenja, deformiteti i pseudoartroze	27	(8,333%)
— Posljedice neuromuskularnih oboljenja	31	(9,567%)
— Ostale etiologije	70	(21,604%)
U k u p n o	324	(100%)



Sl. 2a. Stanje poslije aplikacije aparata i kortikotomije

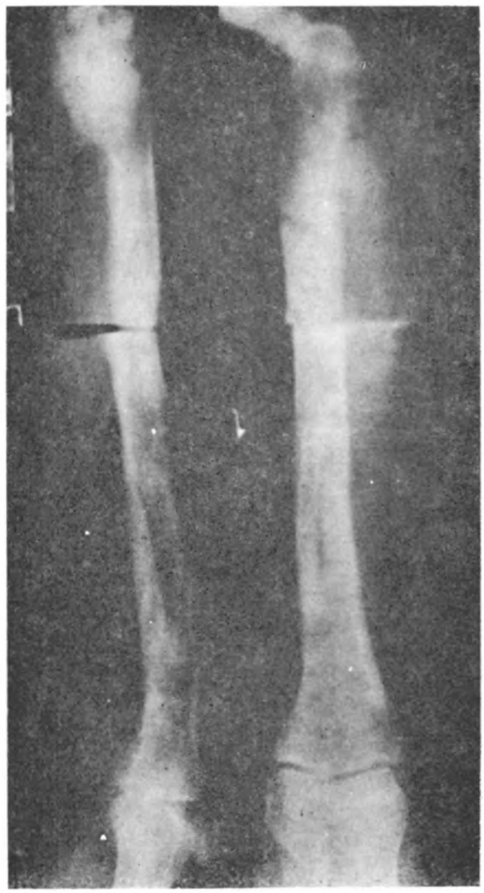


Sl. 2b. Stvaranje regenerata na dva nivoa i nadoknađeni nedostatak dužine

ANU BiH АНУ БиХ

Deficit dužine koju smo nadoknadili opisanom tehnikom kod naših pacijenata je iznosio:

do 4 cm je bilo 35% slučajeva (sl. 3);
od 5 do 8 cm je bilo 35% slučajeva (sl. 4);
od 9 do 27 cm je bilo 29,629% slučajeva (sl. 2).



Sl. 2c. Slučaj definitivno, po skidanju aparata i regenerat čvrst kao prava normalna kost

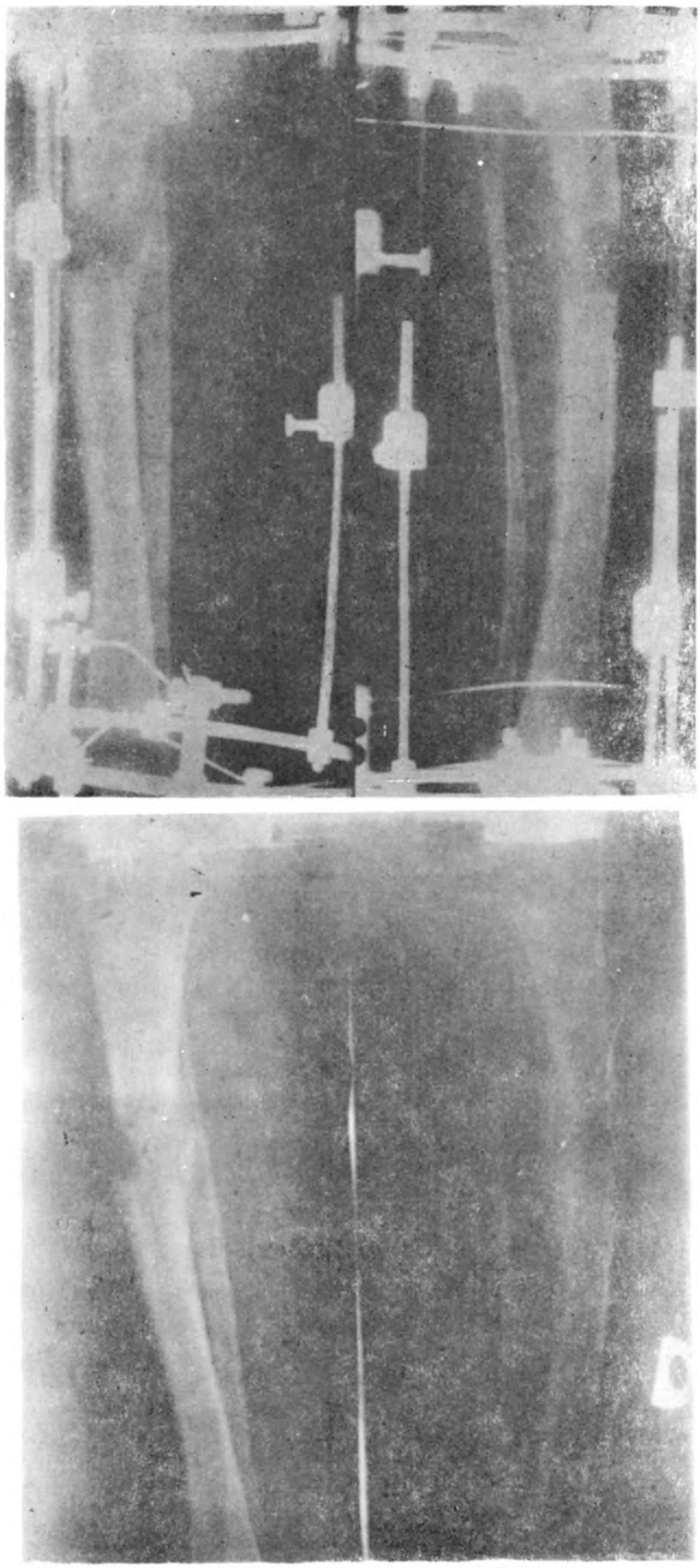
ANU BiH АНУ БиХ

TEHNIKA RADA

Za svaki segment se pravi posebni program, kao što se pravi program za svaki patološki entitet.

Najčešći segment (u 70%) koji smo produžavali je potkoljenica, pa ću ukratko opisati tehniku.

Apliciraju se Kirschnerove igle kroz proksimalni okrajak tibije, s tim da žice idu kroz sredinu debljine tibije i da zatvaraju ugao između sebe najmanje od 30 stepeni. Potom se stavi krug odgovarajućeg



Sl. 3. Slučaj nadoknađene dužine od 4 cm

ANU
ВіН
АНУ
БиХ



Sl. 4. Nadoknađena dužina od 8 cm

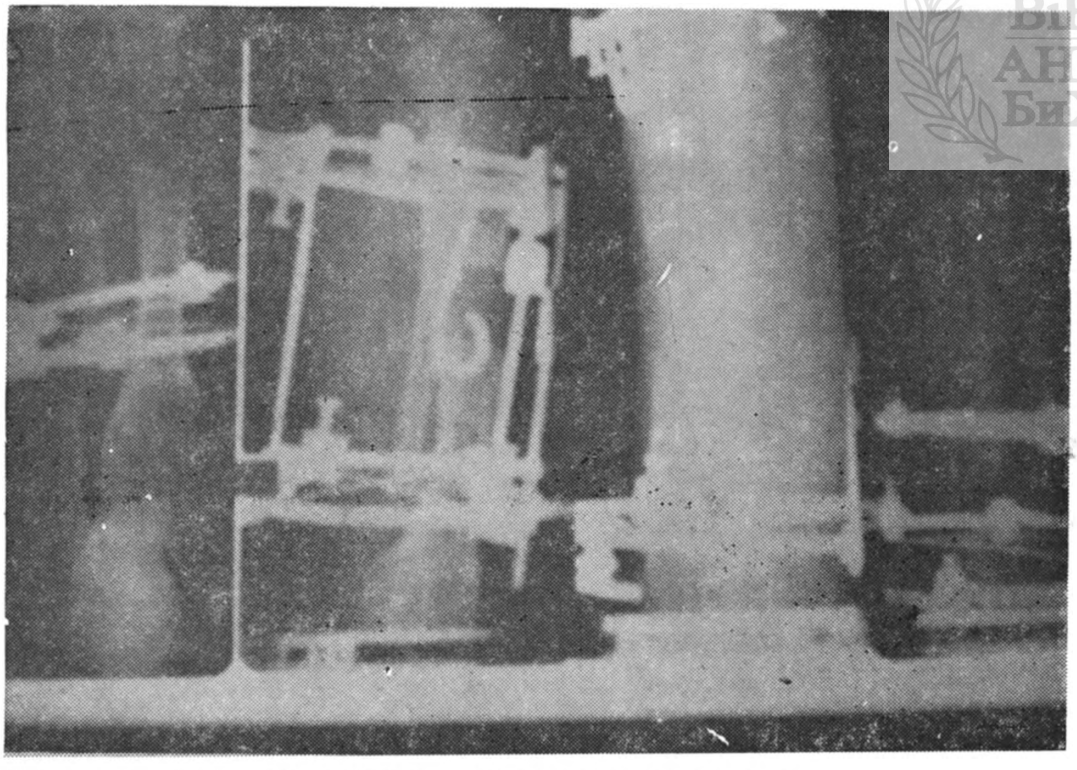
promjera za koji se fiksiraju igle pod tenzijom do 30 kg. Postavlja se još jedna Kirschnerova igla distalno od ravni dvije prethodne i kruga za 2 do 5 cm horizontalnoj ravni i fiksira za krug, te tako cijelu konstrukciju čini čvršćom, jer je to treća tačka.

Potom se apliciraju Kirschnerice kroz distalnu metafizu s tim da se jedna igla sa olivom mora provući kroz fibularni maleolus i tibiju da održava viljušku skočnog zgloba. Uradi se osteotomija fibule u supramaleolarnoj regiji.

Corticotomia tibiae se izvodi u distalnoj regiji proksimalne metafize — ispod distalne Kirschnerove igle na 2 cm. Posebna pažnja se obraća da se očuva periost intaktnim, a i nepovredivost medularnog kanala.

Montaža spojnica krugova, suturae periosta i kože. Distrakcija se započinje petog do sedmog dana. Svakodnevno se provodi distrakcija po 1 mm, a sa distrakcijom na dva nivoa po 2 mm dnevno. Četrnaesti dan uradimo rendgen—snimak, te na osnovu kvaliteta regenerata procjenjujemo brzinu dalje distrakcije. Sa distrakcijom na dva nivoa u jednog našeg pacijenta smo za svega 4 mjeseca dobili čitavih 27 cm nove kosti.

Regenerat je bio izuzetnog kvaliteta (sl. 4a i 4b).



Sl. 5. Slučaj nadoknađene dužine od 17 cm

REZULTATI

Uspoređivati rezultate dobivene ovom vrstom tretmana sa takozvanim »klasičnim« metodama sa uobičajenim skorovima vrlo je teško. Zbog toga sam odlučio procjenjivati rezultate na osnovu komplikacija i rezultata drugih autora, koji su slična patološka stanja tretirali drugim metodama (15, 17, 23, 39).



KOMPLIKACIJE KOD 324 SLUČAJA TRETIRANA METODOM ILIZAROVA

— Krvarenje iz magistralnih krvnih sudova	3	(0,92%)
— Paraliza i pareza n. peroneii	6	(1,85%)
— Fraktura regenerata po skidanju aparata	3	(0,92%)
— Luksacija koljena i zgloba kuka	3	(0,92%)
— Zaostale kontrakture koljenog i skočnog zgloba	9	(2,77%)
— Usporeno stvaranje regenerata	4	(1,23%)
— Površne infekcije	7	(2,16%)
Ukupno	35	(10,80%)

ANU BiH АНУ БиХ

Ovo znači da smo u 10,80% dobili nezadovoljavajuće rezultate iako se u (površne infekcije 2,16%, usporeno stvaranje regenerata 1,23%, frakture regenerata 0,92%) komplikacije dodatnom brigom anuliraju i praktično nijesu komplikacije koje imaju reperkusije na definitivni rezultat, pa se nezadovoljavajućim rezultatom može smatrati svega u 5% slučajeva.

Tri komplikacije koje su bile posljedice povrede krvnih sudova povoljno su riješene operativnim zahvatima (0,92%), tako da se može reći da su rezultati nezadovoljavajući u svega 4%. Čak i kod ovog procenta, ili 13 slučajeva stanje se u odnosu na prvobitno znatno popravilo, osobito u funkcionalnom smislu. Kada kažemo da je kod svih 6 kongenitalnih pseudoartroza tibije postignuta sanacija, dok u usporedbi sa rezultatima drugih autora (15, 16, 25, 27, 30) gdje je u preko 50% slučajeva liječenje završeno amputacijom, dovoljno govori o vrijednosti metode i našem ovladavanju njom.

DISKUSIJA

U radu je opisana primjena metode Ilizarova, kao i aplikacija samog aparata kod raznih patoloških stanja. U jednom ovakvom prikazu nije se moglo sve do detalja prikazati niti analizirati, osobito ne patofiziološki aspekti same tehnike, ali i ovo je dovoljno za onoga ko se bavio pomenutim patološkim stanjima da vidi šta znači pomenuta tehnika i kakve mogućnosti pruža. Prvi opisi aparata i tehnike za liječenje pseudoartroza potiču još iz 1954, ali glavne novine potiču iz 1968. i 1978. godine, tako da se, prema vremenu našeg upoznavanja, može vidjeti da smo među prvima primijenili tehniku i ovladali njom. Vrijednost tehnike se vidi posebno kada se uporedi broj slučajeva i rezultati drugih autora (1, 3, 4, 16, 31) koji su na druge načine tretirali slučajeve sa patološkim stanjima koje smo iznijeli u radu.

Posebna vrijednost ove tehnike je što je aparat takve konstrukcije da dozvoljava za svaki slučaj kod aplikacije i u toku da se mijenjaju detalji i ostvaruju nove ideje te time poboljšava tretman.

ZAKLJUČAK

U radu su analizirana 324 slučaja raznih patoloških stanja, ali uglavnom su to stanja kod kojih se ranijim poznatim tehnikama moglo samo ograničeno pomoći. Primjenom tehnike i aparata Ilizarova kod teških slučajeva postigli smo odlične, dobre i zadovoljavajuće rezultate u 96% slučajeva.

Samo u 4% slučajeva nijesmo bili zadovoljni postignutim rezultatom iako je i kod ovih 13 pacijenata tretmanom došlo do znatnog poboljšanja u odnosu na stanje prije početka tretmana.

Sve ovo nas navodi na zaključak da sa puno odgovornosti zaključimo da tehnika Ilizarova, koja ima moto »prirodu treba imitirati

i potpomagati«, daje neograničene mogućnosti u tretmanu određenih patoloških stanja, a za čije su liječenje do pojave pomenute tehnike mogućnosti bile vrlo skromne.

Sve ovo postignuto je uz potpuno ovladavanje tehnikom i aplikacijom aparata, a što se može postići samo i direktnim kontaktima i boravkom na Institutu, gdje radi autor sa svojim saradnicima.

ILIZAROV'S TECHNIQUE FOR LENGTHENING OF LIMBS AND ITS APPLICABILITY

Summary

The author presented Ilizarov's technique and apparatus as an external fixator. This external fixator had been conctuted for compression and distraction.

The author treated 324 cases with Ilizarov's distraction-compressive external fixator.

The cases were:

— Shorthening of the limb-congenitalu etiology, traumatic etiology, post unaddecvately treated congenital luxation of the hip joint.

— Unstabile fractures with a free fragment and open fractures with decolman of soft tissue.

— Pseudoarthrosis with of without defects of the bones.

In all the cases satisfactory results were obtained.

Keys words: distraction, compression, corticotomy, regeneration of the bone, bengthening, Ilizarov's apparatus.

ANU BiH АНУ БиХ

LITERATURA

(1) Bjerkereeim, I. (1989): *Limb Lengthening by Physeal Distraction,* Acta Orthopaedica Scandinavica, 60 N° 1, 140—143.

(2) Bronghton, N. S, Olney, B. W, Manleö M. B. (1989): *Tibial Shorthening* for Leg Lenght Discrepancy, J. B. and J. S. 71-B, 242—245.

(3) De Bastijani, G., Aldegberi, R., Renzi, Brivio, L., Trivellog, G. (1986): *Limb Lengthening by Distraction of the Epiphyseal Plate a Comparasion of Two Techniques in the Rabbbits,* J. of B. and J. S. 68-B, 545—549.

(4) Brusko, A. T. (1983): *Narušenost strukture epifizarne hrskavice rasta dugih kosti kod funkcionalnog preopterećenja,* Ort. Trauma. Protez. N° 8, 38, 42.

(5) Ćibo, S., Milićević, N., Tunović, D. (1978): *Fractures of Lower Legs Treated by Fixataer Extern by Ilizarov,* XVI World congress (SICOT) Minchen 25.

(6) Kojimoto, Harnio, Yosui, Natsuo, Gato, Tatsuhiko, Matsuda, Shigezo, Shimomura, Yutaka (1988): *Bone Lengthening in Rabbits by Callus Distraction,* J. B. and J. S. 70-B, 404.

(7) Ilizarov, G. A., Šved, S. I., Šigorov, V. M. (1983): *Čereskostnij osteosintez pri perelome šajki bedrenoj kosti,* Ortope. trauma. i protezir. N° 9., 46—48.

(8) Ilizarov, G. A., Barobat, A. P., Imernubulii, I—A. (1984): *Morfološkaja karakteristika stvaranija i pregradnji kostnoj tkanii pri nadomjestitelji baljših defektov kosti,* Ort. Traum. i Protez. N° 1, 16—20.

(9) Ilizarov, G. A. (1989): *The Tension Stress Effect on the Genesis and Growth of Tissues, part I,* Clinic Orthopaedic 233, 167—86.

(10) Ilizarov, G. A. (1989): *The Tension Stress Effect on the Genesis and Growth of Tissues, part II.* Clinic Orthopaedic 239, 167—86.

(11) Ilizarov, G. A., Barabas, A. P., Lorionov (1983): *Eksperimentalno — kliničeskaja aprobacija sposoba zamešćenija obširnih defektov dlinih trubčastih kostjej,* Ort. Traum. i Protez. № 4, 6—9.

(12) Ilizarov, G. A., Berko, V. C. (1976): *Rengenologičeskaja dinamika razvitija kostnog regenerata pri udlineii bedra u eksperimente,* Ort. Traum. i Prot. № 12, 25—31.

(13) James Akonson, Eric Johnson and John Harp (1989): *Local Bone Transportation for Defects by the Ilizarov Tehnique,* Clinic Orthopaed. № 243, June, 71—85.

(14) Kojimoto, H. Yasui, N., Goto, T. (1988): *Bone Lengthening in Rabbits by Callus Distraction,* J. B. and J. S. 70B, 543— .

(15) Lowrence Crossette, James Beasty, Randal Benz (1989): *Congenital Psudoarthrosis of the Tibia, Longtermfollow up study,* Clinic Orthopaed. № 245, 16—23.

(16) Leonard, G., Chin, E. (1988): *Treatment of Infected Won-Union and Segmental Defects of the Tibia with Staged Microvascular Muscle Transplantation and Bone Grafting,* J. B. and J. S. 70-A, 377—86.

(17) Mazeti, R. J. (1986): *Syme's Amputation; a Follow -up Study of Fifty One Adults and Thirty — Two Children,* J. B. and J. S. 50-A, 159—63.

(18) Miličević, N., Tunović, D., Pavlodić, D., E. Jerlagić (1986): *Prolongacija i korekcija stopala metodom lizarova,* IX Kongres YUOT-a, Novi Sad, 159—63.

(19) Miličević, N., Obradović, R., Tunović, D. (1977): *Kongenitalne anomalije lokomotornog aparata uz analizu petogodišnjeg vlastitog materijala,* Medicinski arhiv 31, 69—72.

(20) Milićević, N., Obradović, R., Stančić B. (1978): *Deformiteti na ekstremitetima uzrokovani povredom epifize rasta i njihov tretman,* Zbornik VII. Kongresa YUOT-a Sarajevo, 69—72; *Korekcija i prolongacija stopala,* Zbornik radova Priština, 128—31.

(21) Milićević, N. (1985): *Savremena mogućnost hirurške egalizacije ekstremiteta,* III. Kongres ljekara BiH-a, Sarajevo, 773—77.

(22) Monticelli, G., Spinelli R. (1981): *Distraction Epiphysiolysis as a Method of Limb Lengthening,* Clin. Orthopae. 154274—85.

(23) Milićević, N. (1987): *Leg Lengthening in Cases with Deficiances of More Than 40 cm,* Scientific meeting-perspectives of the development of orthopaedic surgary, SANU, Beograd, st. 15.

(24) Milićević, N., Tunović, D., Stančić, B. (1979): *Postupci u tretmanu inficiranih pseudoarthrosa vanjskim fiksatorima.* XII. OTD Jugoslavije, Novi Sad, 313—319.

(25) Nesbakken, A., Albo, A,. Bjersuad, J., Jensen, D. K. (1988): *Open Tiial Fractures Treated with Hoffman External Fixation,* Arch. Orthopaed. Traum. Surg., 107, 248—52.

(26) Ogansjan, B. O., Katanskij, J. N. (1983): *Lečenje perelomov i pseudoartrosi dlinih trubčastih kostejej repoziciono-kompresionim aparatom Volkov-Oganisjan,* Ortop. Traum. Prtoez. № 4, 24—27.

(27) Radulović, B. (1979): *Inegalitet donjih ekstremiteta,* Beograd, Medicinska knjiga.

(28) Svetnikov, A. A., Šahotin, D. B., Smotrova, A. L. (1983): *Radioizotpskoj isledovanije sastava kostnovo tkanja i krvosnabdjevanije pri prolongaciji i uotlščeniju baljšebercavoj kosti po Ilizarovu,* Ortoped. Traumatol. i Prtez. № 2, 48—52.

(29) Svenningsen, B. P. (1982): *Tibial Fractures Treated with Hoffman's External Fixation,* Acta Orth.Scand. 53, 471—6.

(30) Westin, G. W., Sakai, D. N., Wood, W. L. (1976): *Congenital Longitudinal Deficiencec of the Fibula Followup Treatment by Syme Amputation,* J. B. and J. S. 58-A, 492—6.

ANU BiH АНУ БиХ

ELONGACIJA EKSTREMITETA KOD KONGENITALNIH I RAZVOJNIH ANOMALIJA

BOŽO LJUBIĆ, MIHAJLO MILAŠEVIĆ, ZDRAVKO TROLIĆ
Ortopedska klinika, Sarajevo

UDC 617.3 : 617.5

Apstrakt. Od početka 1984. do kraja 1989. na Ortopedskoj klinici u Sarajevu uradili smo elongaciju ekstremiteta po metodi Ilizarova kod 280 pacijenata. U jednoj trećini slučajeva uzrok skraćenja je bila neka vrsta kongenitalne ili razvojne anomalije.

Posebnosti produženja ekstremiteta ovdje se sastoji u tome što se redovito radi o rastućim osobama, te je, pored tačnog mjerenja skraćenja, nužno odrediti koštanu zrelost, dinamiku rasta zdravog, odnosno potencijal rasta skraćenog ekstremiteta. Nadalje, radilo se najčešće o ekscesivnim skraćenjima udruženim sa raznim deformitetima, te smo radi egalizacije uvijek pristupali produženju kraćeg umjesto skraćenju dužeg ekstremiteta.

Tri glavna indikaciona područja su bila:
a. defektivne anomalije, uglavnom razni tipovi ektromelija, a najčešća među njima fibularna ektromelija sa skraćenjem i deformitetom tibije (25 pacijenata);
b. sekvele prirođenog iščašenja kuka, a najčešće od njih postredukciona oštećenja proksimalnog femura (20 pacijenata);
c. poremećaji rasta, odnosno patuljasti rast razne etiologije (18 pacijenata).

Ostalo se odnosi na rjeđe indikacije kao što su: ostale vrste ektromelija, kongenitalna pseudoartroza tibije, sekvele prirođenog ekvinovarusa stopala i druge.

U svim slučajevima smo uspjeli postići egalizaciju, a najveći iznos produženja u jednom segmentu iznosio je 16 cm. Uz veći broj manjih komolikacija, imali smo i dvije ireparabilne i to obje kod elongacije patuljastih pacijenata.

Ključne riječi: elongacija, skraćenje, Ilizarov, kongenitalne mane, razvojne mane, aplazija fibule, kongenitalna luksacija kuka, patuljasti rast.

UVOD

Egalizacija ekstremiteta provodi se u principu na dva načina; produženjem kraćeg ili skraćenjem dužeg ekstremiteta. Ova druga metoda, mada jednostavnija, za pacijenta je uglavnom neprihvatljiva (smanjenje visine, promjena proporcija), dok je u slučaju ekscesivnih skraćenja (čest slučaj kod kongenitalnih anomalija) i potpuno nemoguća. Daleko prihvatljiviji postupak je produženje kraćeg ekstremiteta, odnosno oba u slučaju patuljastog rasta.

Brojnost metoda elongacije govori o tome da ovaj problem još nije bio zadovoljavajuće riješen. Naime, biološka stimulacija rasta, bilo konzervativna (toplota, elektromagnetski valovi, elektrostimulacija), bilo operativna (Trueta-Chigot, lumbalna simpatektomija, arteficijelna a-v fistula) dala je skromne rezultate (3, 14). Metoda epifizarne distrakcije, koju je 1958. eksperimentalno začeo Ring (15), a u humanoj praksi realizovali 1968. Zavjalov i Plaskin (18) te Ilizarov (1969), praktički je rezervirana samo za period neposredno pred zatvaranje hrskavica rasta zbog neizvjesne sudbine distrahiranih hrskavica u pogledu ponovnog prihvatanja rasta.

Metoda imedijatne elongacije Pol le Coera i slične, tehnički je delikatna i skopčana sa dosta komplikacija (neurovaskularne, pseudoartroze), a pogotovu je problematična na natkoljenici zbog jakih dvozglobnih mišića i periosta.

Daleko bolje rezultate su dale metode temporerne elongacije. Progresivno produženje tibije prvi je preporučio Abbot 1927. (1), a kasnije modificirao Anderson 1952. (2). Metod temporerne elongacije po Ilizarovu (1954) predstavlja korak naprijed u elongaciji ekstremiteta jer u sebi akceptira biološki potencijal endoostalne osifikacije koji ostaje nesmanjen, budući da se radi samo o interrupciji korteksa, i zato što iskorištava princip elastične fiksacije, što podstiče jačanje regenerata. To su potvrdila i naša dosadašnja iskustva (11, 12, 13).

Cilj ovog rada je da sintetizirano pokaže naša iskustva sa metodom temporerne elongacije po Ilizarovu kod kongenitalnih i razvojnih anomalija u intervalu između 1984. i 1990. Također ćemo ukazati na specifičnosti postupka kod tri najzastupljenija indikaciona područja:

a. kongenitalni nedostatak fibule sa skraćenjem tibije;
b. kongenitalna luksacija kuka, odnosno njene sekvele;
c. generalizirani zastoj rasta, odnosno patuljasti rast.

Što se tiče prve dvije grupe oboljenja, o njima postoje izvjesni radovi u svjetskoj literaturi. Tako su Farmer i sur. (1960), Kruger i sur. (1961), Wood i sur. (1965), Hootnick i sur. (1977) te Thomas (1987) objavili radove koji se odnose na tretman kongenitalne aplazije fibule. Mi smo također iznijeli vlastita iskustva i o prvoj i o drugoj grupi oboljenja (11, 13).

Što se tiče elongacija ekstremiteta kod patuljastog rasta, jedini relevantni radovi potječu od samog autora metode G. A. Ilizarova.

METOD RADA I REZULTATI

Specifičnosti elongacije kod kongenitalnih i razvojnih anomalija uvjetovane su nekim posebnostima samih oboljenja:

— u većini slučajeva radi se o rastućim osobama;
— skraćenja su udružena sa raznim vrstama deformiteta;
— skraćenja su često ekscesivna;
— psihička alteracija pacijenta je često pridružena.

Ove specifičnosti, prema tome, diktiraju i neke zajedničke elemente u metodi rada. U preoperativnoj pripremi, na osnovu ortorendgenograma određivali smo tačan iznos skraćenja. Pored toga, uvijek smo određivali koštanu zrelost (Greulich i Pyle, 1959), dinamiku rasta zdravog i potencijal rasta skraćenog ekstremiteta, te nastojali predvidjeti konačan iznos inegaliteta na kraju rasta. U slučajevima gdje bi zbog iznosa inegaliteta (preko 25 cm) egalizacija elongaciom kraćega bila preriskantna, kombinirana je i abrevijacija zdravog ekstremiteta, ali samo u manjem iznosu.

Smatramo da je na neke specifičnosti pojedinih indikacionih područja potrebno i posebno ukazati.

A. Kongenitalni nedostatak fibule i skraćenje tibije

Fibula je najčešće kongenitalno odsutna kost, a slijede je po učestalosti: radius, tibija, ulna i humerus.

Coventry i Johnson (1952) su podijelili kongenitalnu aplaziju fibule u 3 osnovna tipa da bi olakšali orijentaciju u pogledu tretmana. S druge strane, Frantz i O'Rahilly su predložili anatomske termine koji bi bili primjenjivi i kod ostalih kongenitalnih defektnih anomalija (tab. 1).

Tabela 1. KONGENITALNI NEDOSTATAK FIBULE SA SKRAĆENJEM TIBIJE

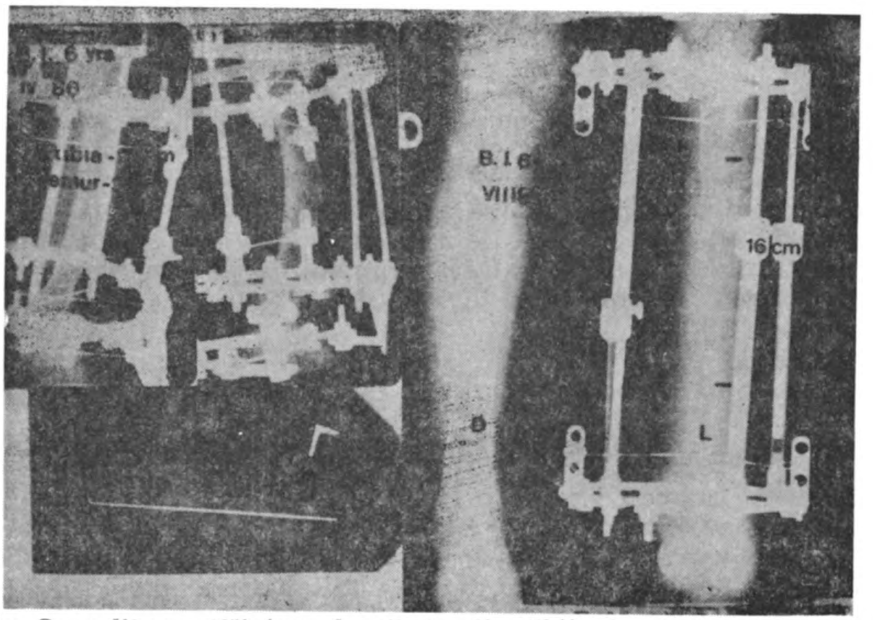
Frantz-O'Rahilly anatomska klasifikacija	Coventry-Johnson klinička klasifikacija	No.
	Tip—I	6
— Intermedijerna nepotpuna	P.F.H.*(Parcijalni unilat. nedostatak)	
— Terminalna potpuna	P.F.H.* Tip—II	
— Terminalna nepotpuna	P.F.H.*(Tipična anomalija)	19
— Intermedijerna potpuna	P.F.H.*	
	Tip—III (Obostrana anomalija)	/
* P.F.H. Paraxialna fibularna hemimelia		25

Tip—I, po Coventryju, parcijalni unilateralni nedostatak fibule, predstavlja najlakši oblik deformiteta, gdje je fibula samo hipoplastična a tibija skraćena, dok je deformitet stopala odsutan ili minimalan. Od ukupno 25 pacijenata ovaj tip deformiteta je imalo samo 6.

Tip—II je tipični oblik mane; u našem materijalu zastupljen je kod 19 pacijenata. Ovdje je fibula potpuno odsutna ili zastupljena samo u vidu fibrokartilaginoznog rudimenta, tibija je skraćena i izvijena prema naprijed, femur skraćen i sa poremećenom torzijom. Stopalo se nalazi u ekvinovalgusu sa anomalijama tarzalnih i metatarzalnih kostiju (slučaj 1, sl. 1).

Tip—III je najteži, ali srećom i najrjeđi oblik mane a predstavlja obostrani deformitet tipa I ili II udružen sa kongenitalnim anomalijama drugdje u tijelu. Mi srećom nismo imali ovakvih slučajeva.

Tehnika elongacije tibije, ukratko, sastojala se u sljedećem. Plasman 2 ukrštene Kiršnerove žice kroz proksimalnu metafizu tibije i njihovo zatezanje u cirkularnom ramu. Treća K. žica se priključuje

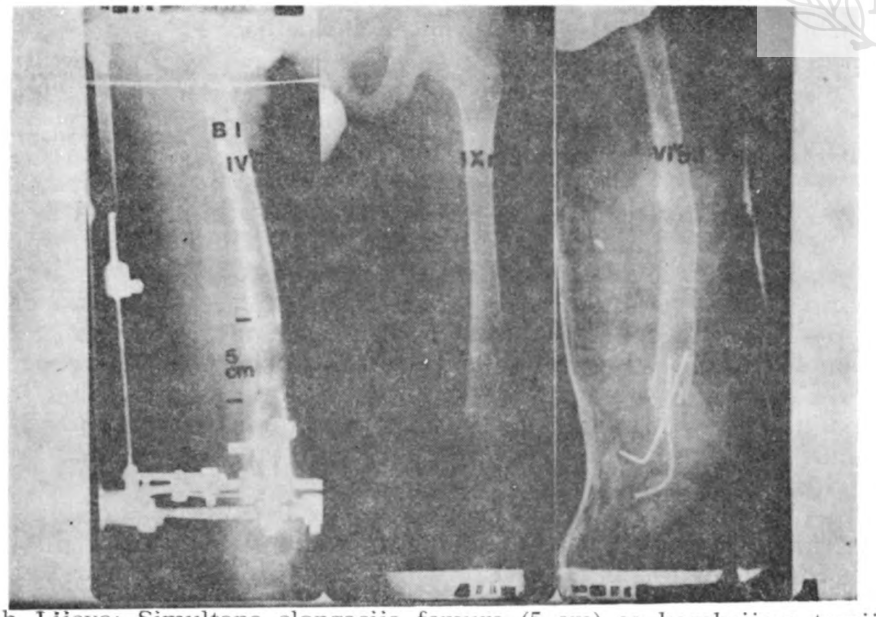


Slika 1a. Gore lijevo: Učinjena kortikotomija tibije i montiran Ilizarov aparat sa dodatnim ramom na stopalu. Desno: Postignuta egalizacija produženjem tibije od 16 cm, ispravljen antekurvatum. Dolje lijevo: Repozicija tibio-talo-kalkanearnog zgloba i fiksacija K. žicom.

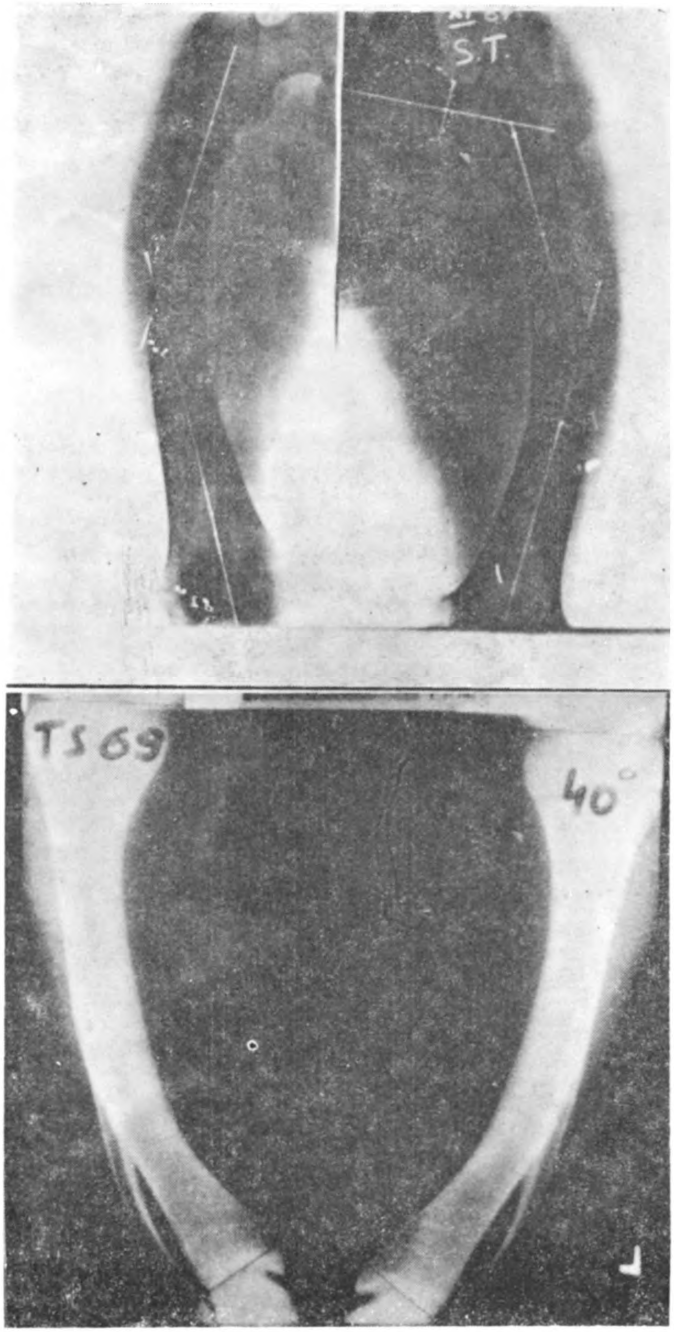
Slučaj 1. Pacijent B. I. 16. god.). Terminalna kompletna paraxialna fibularna hemimelia. Skraćenje tibije (13 cm) i antecurvatum, nedostatak fibule, skraćenje femura (3 cm) i retrotorzija gornjeg okrajka.

Fleksorna kontraktura koljena, kongenitalna luksacija patele. Subluksacija u tibio-talo-kalkanearnom zglobu. Slučaj je riješen, kao što je pokazano na sl. 1 a, b.

Pacijent sada ima 10 god.; hoda sa punim osloncem. U međuvremenu je došlo do relativnog zaostajanja lijeve noge za 2 cm.



Slika 1b. Lijevo: Simultana elongacija femura (5 cm) sa korekcijom torzije. Desno: Rješenje fleksorne kontrakture koljena suprakondilarnom osteotomijom, te repozicija i stabilizacija patele istovremeno.

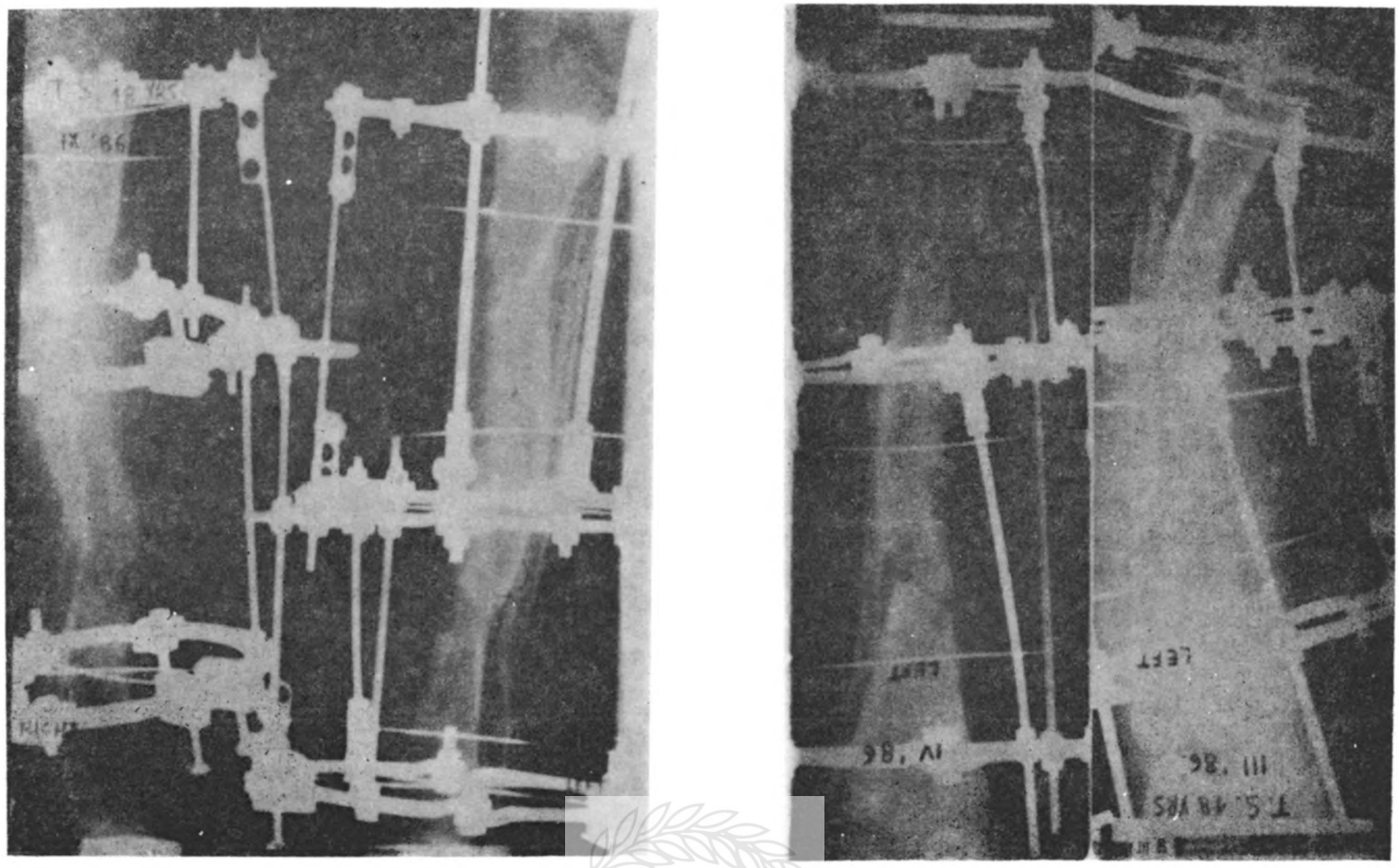


Sl. 2 a. T. S. (18 god.). Gore: Skraćenje natkoljenica i varus (30°)
Dolje: Skraćenje potkoljenica i varus deformitet (40°)

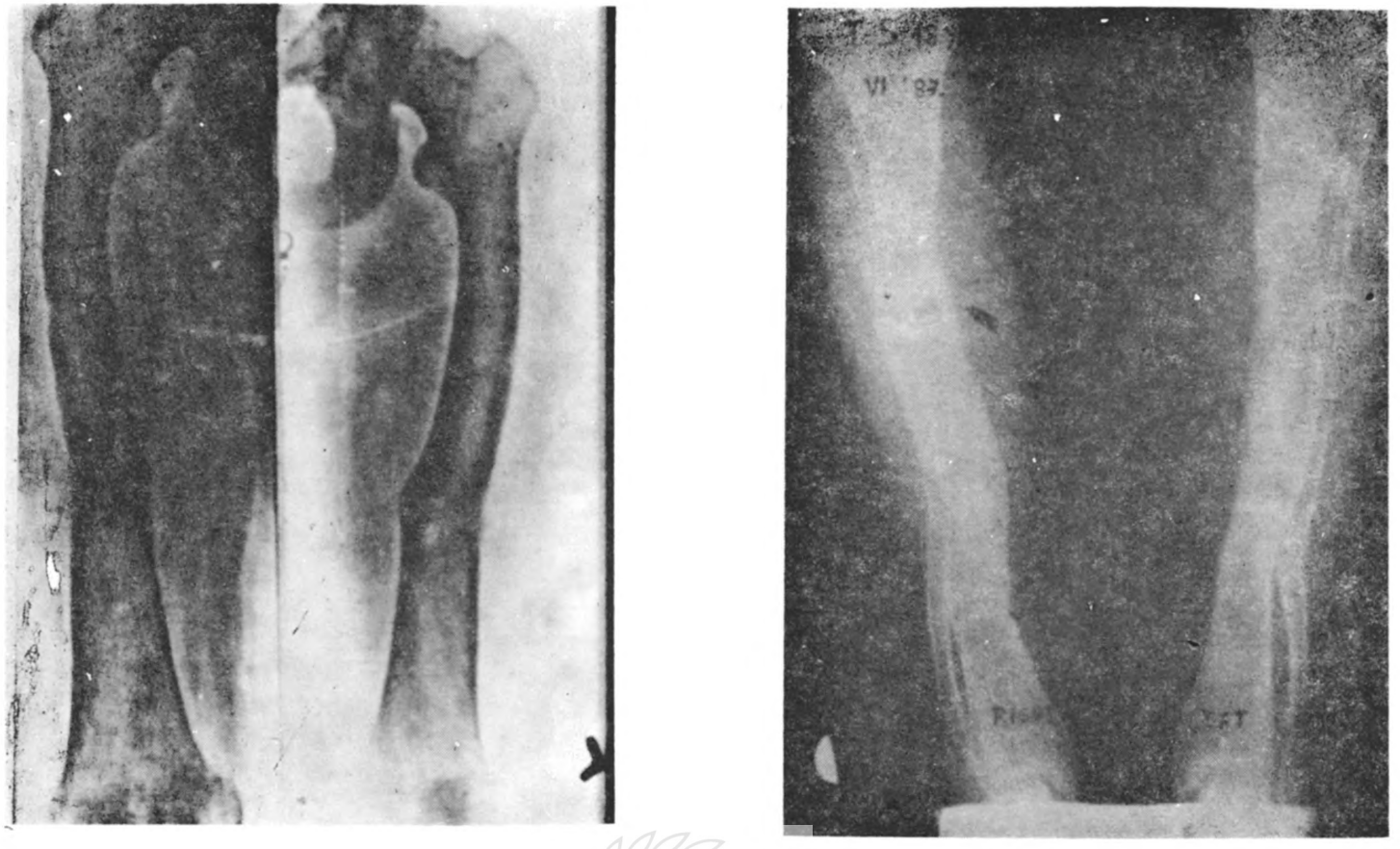
Slučaj 2. Pacijentica T. S. (18 god.). Patuljasti rast do kraja nerasvijetene etiologije sa varus deformitetima natkolejnica i potkoljenica.

Potkoljenice su korigirane i produžene metodom Ilizarova, a natkoljenice orektivnim osteotomijama otvaranja (Sl. 2a, b, c, d).

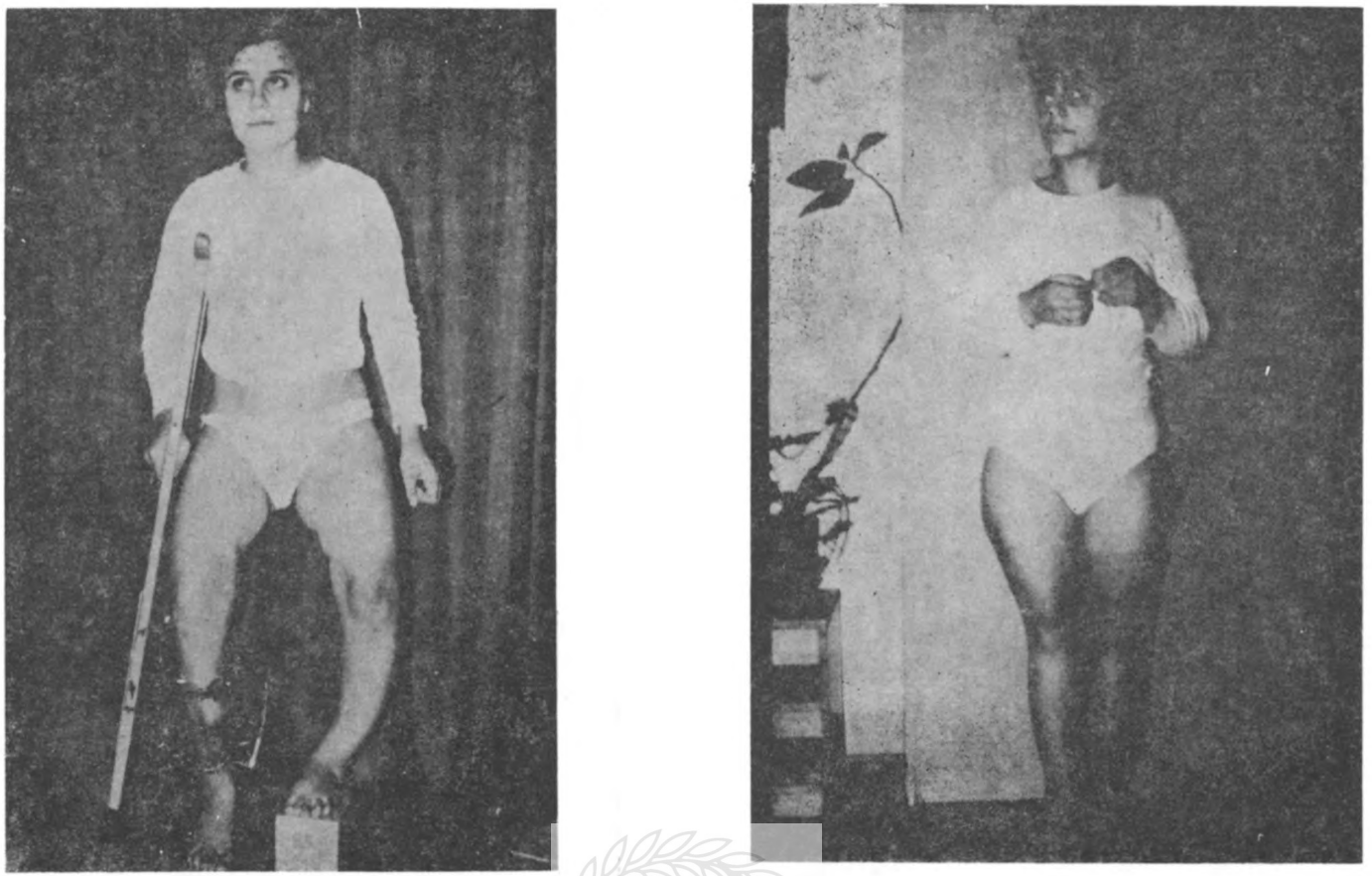
ANU BiH АНУ БиХ



Slika 2b. Obostrano dvostruka kortikotomija tibija, simultana elongacija i korekcija osovine u dva nivoa. Ukupno produženje po 13 cm



Slika 2c. Lijevo: Stanje nakon korekcije natkoljenica.
Desno: Stanje nakon korekcije potkoljenica



Slika 2d. Stanje na početku liječenja sa 18 god. Desno: Stanje na kraju liječenja sa 20 god. Ukupno povećanje visine iznosi 15 cm

na isti ram pomoću posebnog dodatka — »kronšata«. Zatim se na isti način plasiraju 3 K. žice kroz distalnu metafizu tibije s tim što jedna od njih obavezno transfiksira fibulu (ako je prisutna). Ovdje je također nužan i treći ram sa žicama u tarzalnim kostima radi stabilizacije tibiotalarnog zgloba. Slijedi osteotomija fibule (ako postoji), odnosno discizija fibrokartialginozne fibularne trake, komkaktotomija tibije u proksimalnoj trećini i montaža aparata. Elongacija počinje 7. postoperativni dan 1 mm dnevno uz simultanu korekciju devijacije. Ostale intervencije zavise od svakog konkretnog slučaja, kao što je pokazano na sl. 1. Kod naših 25 pacijenata učinjeno je ukupno 10 kirurških procedura. Iznos produženja tibije kretao se između 6 i 16 cm, a prosječno 9,5 cm. Težih komplikacija nismo imali.

B Skraćenje noge kod sekvela kongenitalne luksacije kuka

Skraćenje noge kod ovih pacijenata je bilo uzrokovano, bilo operativnim skraćenjem kod repozicije visokih luksacija, bilo zastojem rasta kod postredukcionih oštećenja proksimalnog dijela femura. U preoperativnoj pripremi ovih pacijenata neophodno je da se, između ostalog, orijeniramo o natkrovljenosti glave femura, za što nam je, pored standardnog AP radiograma, ponekad potreban i CT skan. Kod insuficijencije krova acetabuluma u prvom aktu je rađena osteotomija zdjelice po Salteru ili Chiariju, a tek u drugom aktu (što kasnije to bolje) elongacija femura. Sama elongacija onda ima sve značajke elongacije femura po Ilizarovu. Izuzetak je jedino u slučaju kad je i proksimalni femur insuficijentan, kada je potrebno osiguranje kuka dodatnim ramom na ilijačnoj kosti. Za sve detalje metode zainteresiranog čitaoca upućujem na originalne radove autora metode G. A. Ilizarova (9), kao i na vlastiti rad iz ove problematike (11).

U našem materijalu izveli smo elongaciju femura kod 20 pacijenata ovog indikacionog područja. U svim slučajevima je postignuta planirana elongacija u iznosu od 3 do 7 cm uz dobro stvaranje regenerata. Ako izuzmemo ekstenzornu kontrakturu koljena, koja je neposredno nakon elongacije bila redoviti nalaz, težih komplikacija nismo primjetili.

C Elongacija ekstremiteta kod patuljastog rasta

Metoda elongacije ekstremiteta kod patuljastog rasta ne razlikuje se bitno od elongacije kod drugih indikacija, međutim sam odabir pacijenata i taktika su od izuzetne važnosti za uspjeh. Simultana elongacija potkoljenica je najčešće rađena, dok je simultana elongacija obje natkoljenice vrlo nekomforna za pacijenta i rađena je izuzetno. Moguća je također simultana elongacija »po dijagonali«, tj. desna natkoljenica i lijeva potkoljenica i obratno. Zbog velikog iznosa produženja (10 i više cm u jednom segmentu), mora se striktno pridržavati tempa elongacije (1 mm dnevno u dvije doze). Pacijenti su čitavo vrijeme pokretni sa ili bez štaka. Kod većine pacijenata, a naročito hondrodistrofičnih patuljaka simultano sa elongacijom rađena je i korekcije osovine (varus) potkoljenice ili natkoljenice (sl. 2a — 2d).

Od početka 1984. do kraja 1989. kod 18 pacijenata patuljastog rasta rađena je elongacija ekstremiteta. Etiologija zastoja rasta bila je različita. Kod 10 pacijenata uzrok je bila Chondrodystrophia, 2 su bili hipopituitarni, 1 hipotireotični, 1 rahitični patuljak, dok su 4 označeni kao idiopatski. Žena je bilo 12 i 6 muškaraca. Najmlađi pacijent je imao 14 a najstariji 34 godine (prosječno 22 god.) Tjelesna visina kod dolaska na Kliniku kretala se između 118 cm i 155 cm. Najveće produženje u jednom segmentu (tibija ili femur) iznosilo je 14 cm a najveće ukupno (tibija plus femur) 22 cm. Procenat komplikacija kod ovih pacijenata je bio značajno veći nego kod onih sa inegalitetima, ali u samo 2 slučaja su bile ireparabilne.

U prvom slučaju radilo se o hondrodistrofičnom pacijentu kod koga je nakon jednog bezazlenog pada u toaletu došlo do paraplegije. Drugi slučaj je bila lezija n. ischiadicusa K. žicom koja se djelomično reparirala.

Veći procenat komplikacija kod elongacija patuljastih pacijenata lako je objasniti činjenicom da se radi o velikim produženjima, redovito na oba segmenta (tibija i femur). Pored skraćenja ovdje imamo i dodatne deformitete ekstremiteta (varus ili valgus) a kod hondrodistrofičara su zabilježene promjene u predjelu vertebralnog kanala.

DISKUSIJA I ZAKLJUČAK

Metoda temporerne elongacije po Ilizarovu polazi od sasvim originalne ideje da istezanje predstavlja stimulans za stvaranje novog koštanog tkiva pod uvjetom da je očuvana medularna cirkulacija. Naprijed je pokazano da je ovom metodom moguća elongacija i preko 16 cm u jednom segmentu, što je od izuzetne važnosti, pogotovu kod kongenitalnih anomalija kao što je kongenitalni nedostatak fibule. Delikatnost postupka elongacije kod kongenitalne aplazije fibule natjerala je mnoge autore da se zalažu za ranu amputaciju stopala i opskrbu ekstremiteta protezom. Tako Wood i sur. (18) preporučuju amputaciju po Symu čim aktuelni ili očekivani inegalitet prelazi 7,5 cm, odnosno gdje je deformitet stopala takav da nije podoban za oslonac. Sličan stav zastupaju i Hootnick (7), Farmer i Laurin (5) te Kruger i Talbott (10). Thomas i Williams (16) iz Royal Children's Hospital iz Melburna preporučuju isključivo konzervativan stav kod najblažih oblika deformiteta (gdje konačno skraćenje ne prelazi 7,5 cm), amputacija po Symeu kod najtežih oblika terminalne paraxialne fibularne hemimelije, a u slučajevima koji se nalaze između ova dva ekstrema preporučuju zahvat za kreaciju zglobne viljuške po Grucai. Mi na osnovu sedmogodišnjeg iskustva smatramo da ranoj amputaciji nema mjesta, jer je moguće egalizirati skoro svaki inegalitet. Neophodna je naravno stabilizacija skočnog zgloba, a često i zahvati na femuru i koljenom zglobu.

Iznos elongacija kod posljedica kongenitalne luksacije kuka u usporedbi sa prethodnim nije velik i ne predstavlja poseban tehnički problem.

Ovdje je važnija normalizacija biomehaničkih odnosa. Relativni magatrohanter rješava se (zavisno od dobi) imedijetnom kaudalizacijom velikog trohantera ili trohanternom epifizeodezom. Poseban problem predstavlja visoka neliječena luksacija poodmakle dobi (iznad 20 god. života), gdje je krvava repozicija teška ili čak nemoguća, a pacijent premlad za totalnu aloartroplastiku. U ovim slučajevima izvjesne šanse nudi originalni postupak G. A. Ilizarova (9, 11).

Elongacija ekstremiteta kod patuljastih pacijenata je poseban problem zbog velikih iznosa produženja, udruženih deformiteta i promjene proporcija. Po našem mišljenju, jedini mogući kandidati za produžavanje bili bi aproporcionalni patuljci (Chondrodystrophia, Rachitis), kod kojih je ligamentarni aparat relativno stabilan a tjelesna visina iznad 130 cm. Preduvjet da elongaciji uopće pristupimo je maksimalna motivacija, emocionalna stabilnost i psihička zrelost. To naravno bitno reducira broj pacijenata pogodnih za operaciju, ali reducira i broj neuspjeha i komplikacija.

THE LENGTHENING OF EXTREMITIES IN CONGENITAL AND DEVELOPMENTAL ANOMALIES

Summary

The lengthening of extremities in congenital anomalies represents a special problem due to large shortenings combined with other deformities in cases of growing patients.

From the beginning of 1984 to the end 1989 we performed, at Orthopaedic Clinic, elongation in 280 cases, almost one third of which suffered from congenital anomalies. The majority of patients belonged to 3 main indication areas: congenital absence of fibula (and other ectromelies), congenital dislocation of the hip (CDH) and its sequelae and generalized arrest of the growth.

The largest lengthening gained at one segment of extremity was 16 Cm. Egalisation was achieved in all the cases of congenital absence of the fibula as well as in those with CDH.

The largest lengthening at one segment in cases of dwarf patients was 14 cm (tibia), and as a total (tibia plus femur) 22 cm. The percent of the complications in cases with dwarf patients was considerably greater then in those with inequalities of ewtremities.

LITERATURA

(1) Abbot, L. C.: *The operative Lengthening of the Tibia and Fibula,* J. bone and Joint surg. 9 (1927)128—152.

(2) Anderson, W. V.: *Leg Lengthening,* J. bone and Joint surg 34-B (1952) 150.

(3) Bobič, R.:*O biološkoj stimulaciji rasta,* VII kongres ortopeda i traumatologa Jugoslavije, Zbornik radova, 235—5236, Sarajevo 1978.

(4) Coventry, M. B., Johnson, E. W.: *Congenital Absence of the Fibula,* J. bone and Joint surg, 34-A (1952), 941—945.

(5) Farmer, A. W., Laurin, C. A.: *Congenital Absence of the Fibula,* J. bone and Joint surg. 42-A (1960) 1—12.

(6) Greulich, W. V., Pyle, S. I.: *Radiographic Atlas of celatal Development of the Hand and Wrist*, Second Edition, Stanford, Calif., Stanford University Press 1959.

(7) Hootnick, D., Boyd, N. A., Fixsen, J. A., Lloyd-Roberts, G. C.: *The natural History and Management of Congenital Short Tibia with Dysplasia or Absence of the Fibula*, J. bone and Joint surg., 59-B (1977), 261—271.

(8) Ilizarov, G. A.: *Novi principi osteosinteze pomoću ukrštenih žica i krugova*, Iz kolekcije naučnih publikacija, Kurgan 1954.

(9) Ilizarov, G. A., Kaplunov, A. G., Terješćjenko, V. A.: *Vostanovljenije ustojčivosti v tazobedrenom sustave s adnovremenim udlinjenijem nogi pri adnostornjem vraždjenom vivihe bedra u vzroslih*, Metodičeskie rekomandacii, Kurgan 1978.

(10) Kruger, L. M., Talbott, R. D.: *Amputation and Prosthesis as Definitive Treatment in Congenital Absence of the Fibula*, J. bone and Joint surg. 43-A (1961) 625—642.

(11) Ljubić, B., Milašević, M., Trolić, Z.: *Rješavanje inegaliteta donjih ekstremiteta uzrokovanih patološkim procesima u predjelu kuka*, 9. kongres Udruženja ortopeda i traumatologa Jugoslavije sa internacionalnim učešćem, Zbornik radova, Novi Sad (1986) 163—170.

(12) Ljubić, B., Pšorn, V., Milašević, M., Trolić, Z.: *Elongation and Deformity Correction of Lower Limbs Using the Method of Ilizarov*, S. I. C. O. T. World Congress, München, 1987.

(13) Ljubić, B., Milašević, M., Trolić, Z.: *Treatment of Leg Shortening Caused by Longitudinal Paraxial Hemimelia by Means of Method of Ilizarov*, East and West combined Orthopaedic Meeting under Auspices of S. I. C. O. T., Beograd 1988, 167.

(14) Petty, W., Winter, R. B., Felder, D.: *Arteriovenous Fistula for Treatment of Discrepancy in Ley Length*, J. bone and Joint surg., 56-A (1974), 581—586.

(15) Ring, P. A.: *Experimental Bone Lengthening by Epiphyseal Distraction*, Britisch Journal of Surgery, 46 (1958), 69—73.

(16) Thomas, I. H., Williams, P. F.: *The Gruca Operation for Congenital Absence of the Fibula*, J. bone and Joint surg., 69-B (1987), 587—592.

(17) Westin, G. W., Sakai, D. N., Wood, W. L.: *Congenital Longitudinal Deficiency of the Fibula*, J. bone and Joint surg., 58-A (1976), 492—496.

(18) Wood, W. L., Zlotsky, N., Westin, G. W.: *Congenital Absence of the Fibula (treatment by Syme amputation)*, J. bone and Joint surg., 47-A (1965), 1159—1169.

(19) Zavijalov, P. V., Plaskin, J. T.: *Distrakciona epifizeoliza donjeg ekstremiteta kod djece*, Khirurgija (Moskva) (1968), 44—121.

MODELIRANJE I PROLONGACIJA POTKOLJENICE PRIMJENOM METODE ILIZAROVA

NIKOLA MILIĆEVIĆ, SAFET ĆIBO
Ortopedska klinika, Sarajevo

UDC 617.3:617.5

Apstrakt. U radu smo opisali tehniku modeliranja i zadebljavanja potkoljenice sa potrebnom prolongacijom. Ova kompleksna tehnika je primijenjena kod 16 slučajeva.

Prolongacija je rađena radi nadoknade dužine od 1,5 do 4 cm.

Zadebljavanje je rađeno multiplom osteotomijom fibule i povlačenjem u stranu segmenata koji su dobiveni osteotomijom. Medijalno se otkleše lamina medialis tibije, te montiranjem konstrukcije za potezanje u stranu. Na ovaj način smo anulirali sve defekte dužine tretiranih potkoljenica, a masu dobili u cirkumferenciji do 14 cm.

Ključne riječi: zadebljavanje, potkoljenica, apparat Ilizarov.

UVOD

Modeliranje i zadebljavanje potkoljenice kod posljedica neuromuskularnih oboljenja i prirođeno krivog stopala, a osobito posljedica poliomielitisa je želja ortopeda i protetičara od vremena registracije pomenutih bolesti, što znači od postanka ljudskog roda.

Takve želje sve do prvih godina posljednje decenije bile su samo želje bez mogućnosti realizacije.

Tek poslije 1980. godine, poslije eksperimentalnih radova G. A. Ilizarova (1) postignuti su uslovi za istovremeno prolongiranje potkoljenice i njeno zadebljavanje. Zadebljavanje kosti i povećavanje mišićnih grupa, ukupne mišićne mase.

TEHNIKA RADA

Poslije neophodne pripreme i obrade slučaja radi etiološkog razjašnjavanja posljedice nedostatka dužine i mišićne mase, pristupali smo stvaranju plana za operativnu terapiju.

Prvo apliciramo odgovarajući krug u proksimalnom dijelu metafize tibije uz dodatnu Kirschnerovu iglu radi ojačanja konstrukcije (1, 3).

Potom učinimo osteotomiju fibule na dva ili tri mjesta, sve u zavisnosti od stepena nedostatka mišićnih masa.

Potom se montiraju igle sa olivama radi montiranja konstrukcije, odnosno bočnog povlačenja osteotomiranih dijelova fibule.

Pristupa se na medijalnu stranu, osteotomira se medijalna lamina dužine prema potrebi i dlijetom odvoji do posteriornog dijela periosta.

Provuku se Kirschnerove igle sa olivama (2 do 3) radi montiranja konstrukcije za bočno povlačenje.

Potom se pristupi aplikaciji kruga kroz distalni dio.

Uradi se kortikotomija u predjelu distalnog dijela proksimalne metafize tibije — radi prolongacije.

Montiraju se spojnice krugova te konstrukcija za bočna povlačenja radi zadebljavanja; suture mekih tkiva (1, 2, 3).

Sl. 1. pokazuje shemu, kao i rendgen-snimak apliciranog aparata za zadebljavanje i produžavanje.

Sedmog dana započinjemo distrakciju po dužini, a desetog do dvanaestog dana započinjemo bočna povlačenja.

Ritam uzdužne distrakcije je kao i kod slučajeva gdje se vrši samo produžavanje, eventualno može biti nešto sporije.

Bočno povlačenje se vrši sporije, uz kontrolu tenzije kože da ne dođe do nekroze.

Mjereći obim operisane i zdrave potkoljenice, prema potrebi se doziraju bočna povlačenja.

MATERIJAL

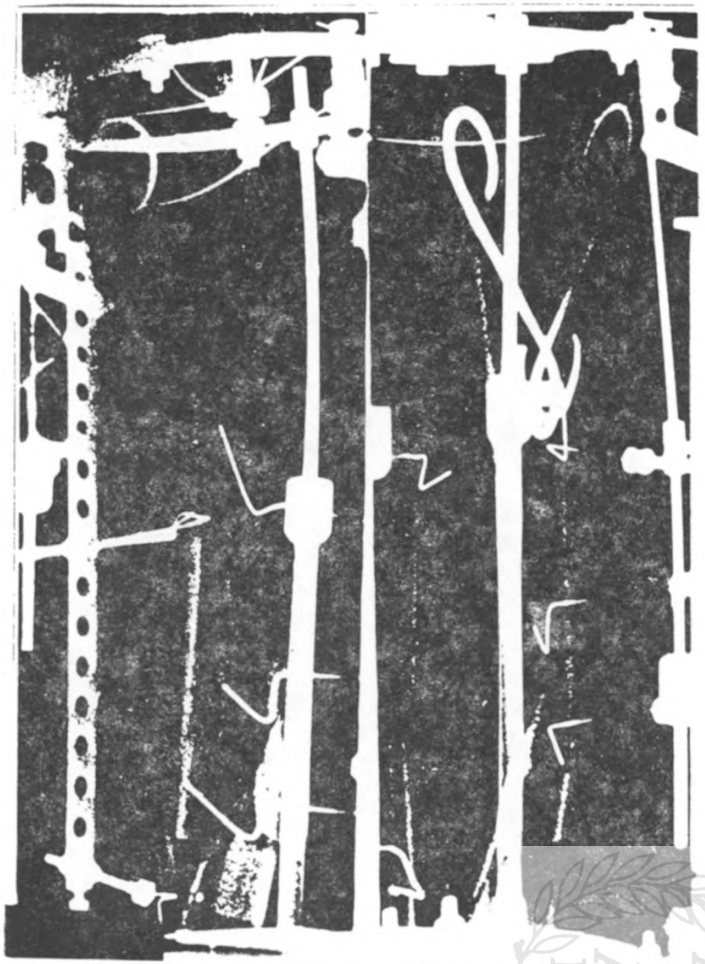
Tretirali smo šesnaest pacijenata, od kojih se radilo o posljedicama dječije paralize kod 11 slučajeva, a kod pet o posljedicama neadekvatnog i nepravovremenog liječenja prirođenog ekvinovarusa. Nedostatak dužine je bio 1,5 do 4,5 cm, a cirkumferencija mišićne mase i do 14 cm.

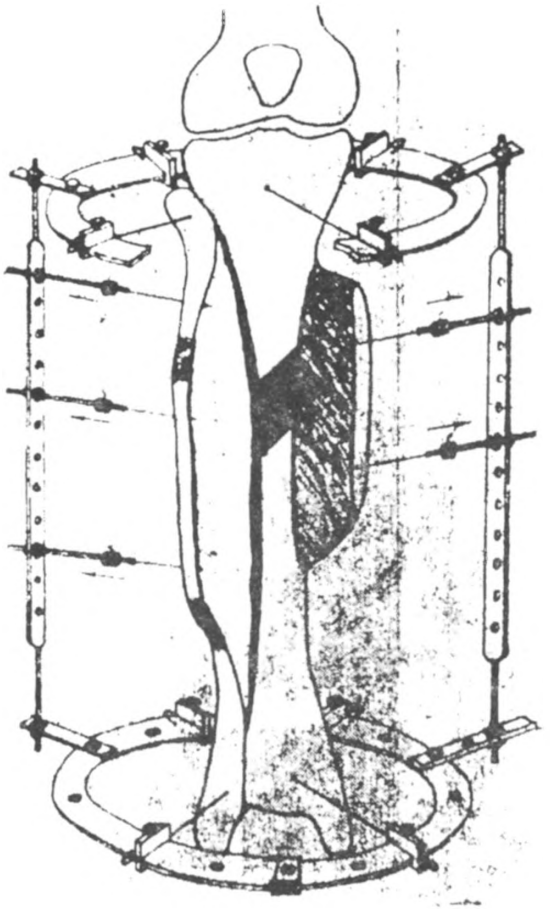
Prezentiramo dva slučaja — početni i definitivni nalazi:

Slučaj H. V., rođ. 1959. god.

(Dg. *Abreviatio cruris sin.*, 4,5 cm. et *Hypotrophia cruris sin.*, 14 cm)

Nalaz 22. 04. 1987.		Operacija 28. 04. 1987. Nalaz 07. 10. 87.		Skinut aparat 15. 01. 1988. Nalaz	
D	L	D	L	D	L
47	36	47	39	47	41,5
P-46	38	P-46	39	P-42	41,5
37	23	36	31	37	35,5
36	23	36,5	25,5	36,5	29
24	18	24	21	24	22,5





Slika 1. Shema aplikacije aparata, kao i rendgenogram jednog našeg slučaja poslije aplikacije aparata

Kao što se iz gornje sheme vidi, razlika obima od 14 cm svedena je na svega 2 cm na potkoljenici.

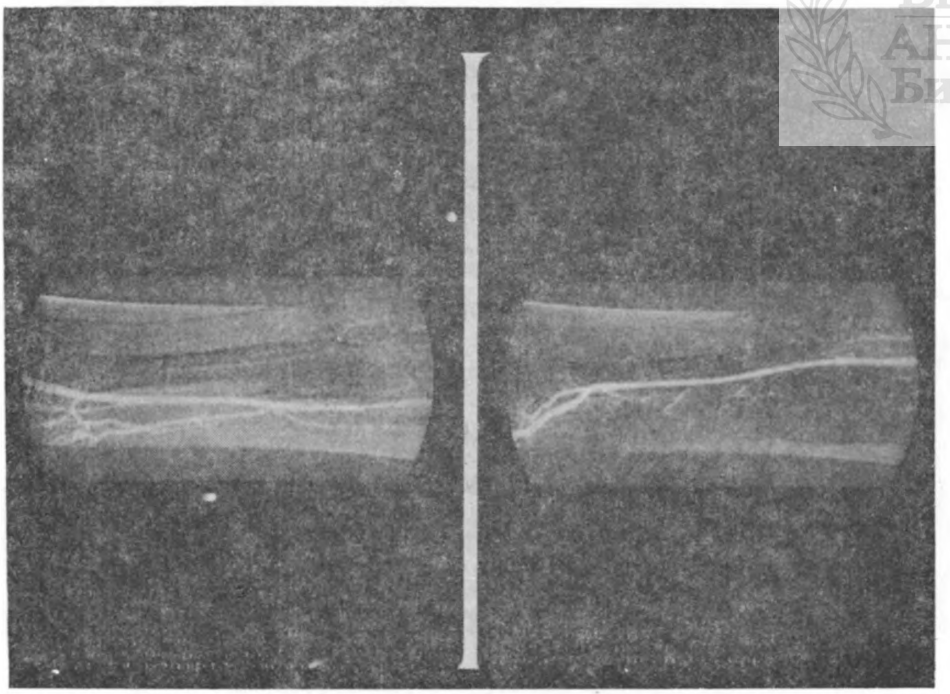
Još jedan slučaj prezentiramo sa gore navedenim parametrima.

Slučaj N. J. rođ. 1968. god.

(Dg. *Aberviatio cruris sin.* 4 cm; *Atrophio gravis,* 16 cm)

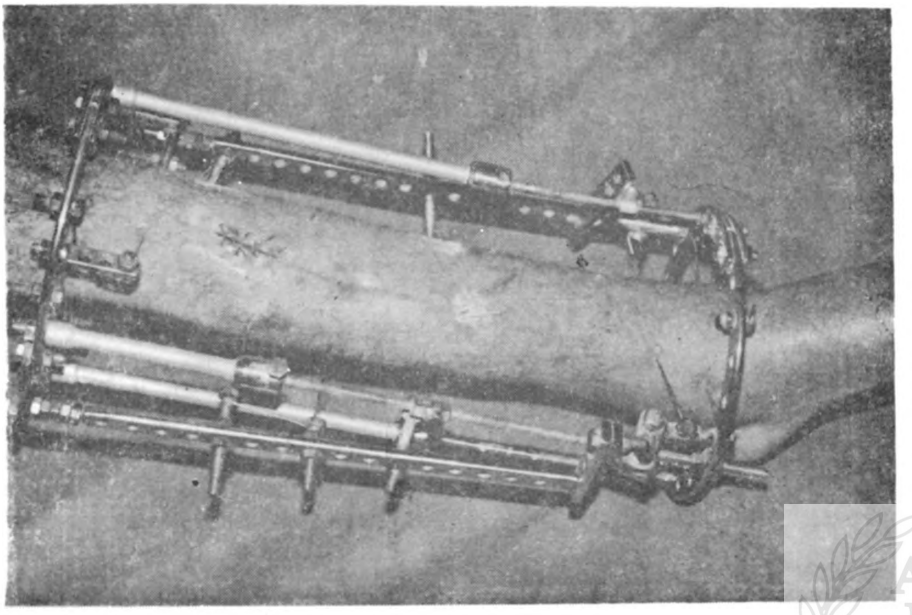
Nalaz 01. 07. 1987.		Operacija 14. 07. 1987. Nalaz 25. 10. 1987.		Nalaz 06 01. 1988.	
D	L	D	L	D	L
47	37	44	44	47,5	45
P	P	P	P	P	P
36	23	36	29	36	33,5
37	21	37	27	37,5	33,5
29	19	29	21	29,5	27

Od nedostatka 16 cm sveli smo ga na svega 3 cm, a deficit dužine je u potpunosti anuliran.

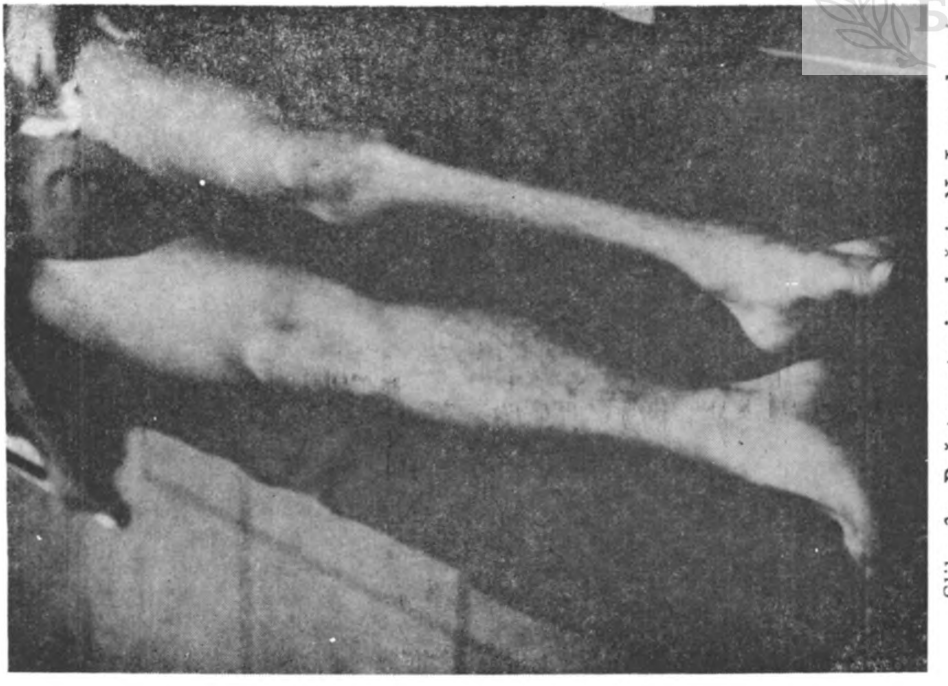


Slika 2. Angiogram potkoljenice. Vidi se bogata vaskularizacija na mjestu gdje se lamina odvoji vučenjem u stranu

Slika 2 pokazuje angiogram potkoljenice po završenom zadebljavanju, gdje se vidi bogata mreža krvnih sudova, gdje se vrši razvlačenje radi zadebljavanja.



Slika 3b Stanje u toku terapije



Slika 3a. Početno stanje slučaja N. J. na shemi

ANU BiH АНУ БиХ

Slika 3, a, b i c pokazuje stanje prije, u toku i na kraju tretmana slučaja N. J.



Slika 3c. Stanje na kraju

ANU BiH АНУ БиХ

REZULTATI

Kod svih šesnaest tretiranih pacijenata postigli smo kompletnu nadoknadu deficita dužine, a deficit mišićne mase smo anulirali na svega minus do tri cm u cirkumferenciji u uporedbi sa zdravom potkoljenicom.

Pokreti, aktivni i pasivni, u zglobu koljena su ostali potpuni, dok je u skočnom zglobu zaostala dorzalna fleksija reducirana za 25% kod osam pacijenata. Ovaj zaostatak nije posljedica tretmana nego je posljedica prethodnog stanja, koji terapijom nije mogao biti anuliran.

Direktnu uporedbu rezultata sa drugim autorima je nemoguće izvršiti, jer ovu metodu za sada, koliko je poznato nama iz literature i ličnih kontakata, nije radio niko sem nas i inauguratora (1, 2, 3).

DISKUSIJA

Nadoknada dužine potkoljenice je neophodna otkako postoji ljudski rod, jer za normalnu biomehaniku hoda je neophodna i egalizacija oba donja ekstremiteta. Masivnost mišića je takođe neophodna za potpuni normalni hod. Nadoknađena dužina je dugo bila protetska i ovo je bila dominantna metoda sve do početka ovoga vijeka. Početkom ovoga vijeka počinju operativna produženja potkoljenice radi egalizacije, ali mogućnosti su vrlo ograničene sve do 1969. godine, kada G. A. Ilizarov radi prvu kortikotomiju i postupnu prolongaciju onoliko koliko nam je potrebno.

Prva zadebljavanja potkoljenice je uradio G. A. Ilizarov 1981. godine, da bismo i mi proučili i počeli primjenjivati metodu već 1986. godine zahvaljujući ličnim kontaktom sa autorom i uvidu u raspoloživu literaturu.

Iako smo pioniri u primjeni pomenute metode, ni kod jednog od 16 slučajeva nije bio rezultat loš. Kod svih slučajeva smo postigli poboljšanje, a prema iznesenom u prethodnom tekstu, anulirali smo u cjelini nedostatak dužine, a masivnost mišića gotovo u cjelini nadoknadili.

ZAKLJUČAK

Opisana tehnika je vrlo suptilna, a daje velike mogućnosti popravka stanja insuficijentnosti potkoljenice, kako u smislu nadoknade dužine tako i mišićne mase, sve to radi normalnog hoda — normalne funkcionalnosti.

Tretiranih šesnaest slučajeva, kada je ova patologija u pitanju, vrlo je veliki broj i, s obzirom na postignute rezultate, razvijaćemo tehniku i proširivati njenu primjenu.

THICKENING OF THE TIBIA BY USING THE ILIZAROV METHOD

Summary

The thickening technique and results of shin thickening and lengthening are presented in the paper. The deficiency of shin length varied from 1,5 to 4,5 Cm. The thickening was done with multiple osteotomies of fibula and lateralisation of it as well as separation of the tibia medial lamina and »pulling« it to the medial side succesively. The results were: equalisation of shin lengths completely and inlargement of muscle circumference up to 14 Cm..

LITERATURA

(1) Ilizarov, G. A. (1984): *Spravočkaja za utolšćenije golenii,* Medicine Moskva.

(2) Ilizarov, G. A. (1987): *Research Institute of Experimental and Clinical Orthopaedies and Traumatology in Kurgan, Sovjet Union,* The homeland of Proffesor G. A. Ilizarov's method widely used by soviet orthopaedists and their collegues abroad.

(3) Milićević, N. (1989): *Deficit potkoljenice — nadoknada deficita,* Yugoslovensko-Francuski sastanak, Beograd 1989, str. 6.

ANU BiH АНУ БиХ

ELONGACIJA DONJIH EKSTREMITETA METODOM EPIFIZARNE DISTRAKCIJE

ZDRAVKO TROLIĆ, NIKOLA MILIĆEVIĆ
Ortopedska klinika, Sarajevo

UDC 617.3 : 617.5

Apstrakt. Autori iznose rezultate rada na produženju donjih ekstremiteta putem metode epifizarne distrakcije. Prikazani su rezultati liječenja 14 bolesnika. U svim slučajevima je postignuta egalizacija ekstremiteta — produženja su se kretala od 3 do 14 cm. Posebno se signalizira redovito zatvaranje hrskavice rasta kao najznačajnija hipoteka ove jednostavne metode.

Ključne riječi: elongacija ekstremiteta, distrakcija epifize, hrskavica rasta.

UVOD

U bogatom arsenalu metoda kojima se danas služimo u egalizaciji ekstremiteta epifizo-metafizarna distrakcija u dobro odabranim slučajevima ima svoje mjesto kao jednostavna i nekrvava metoda.

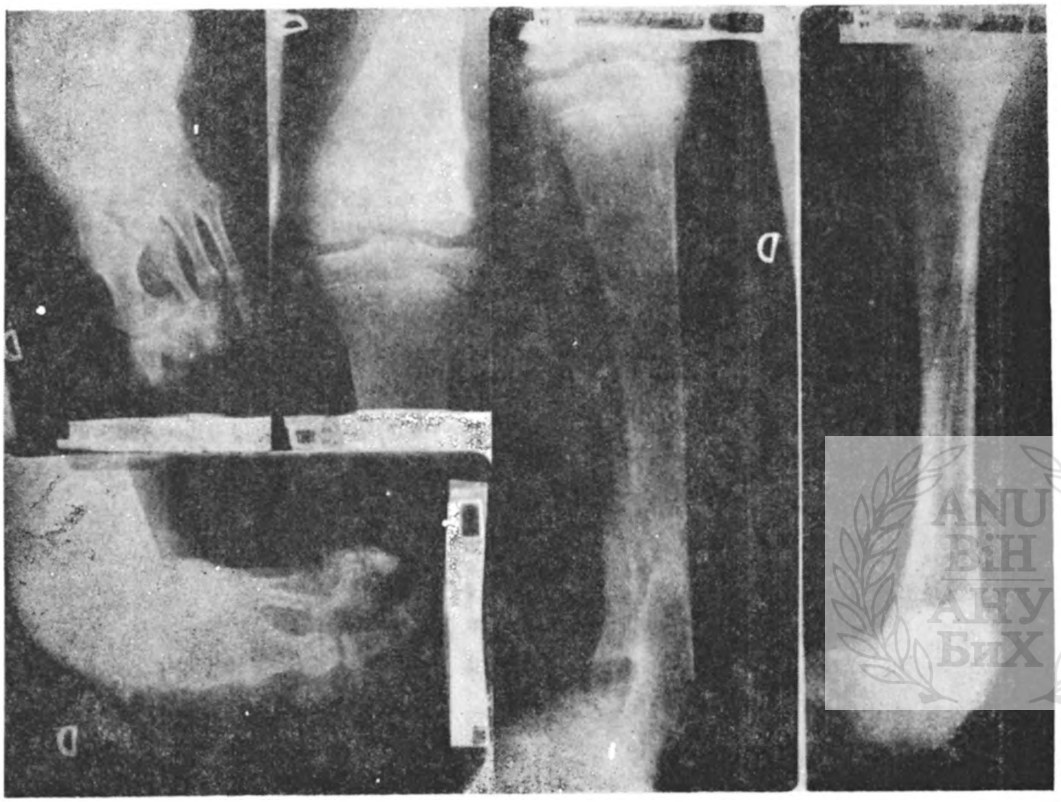
Ovaj postupak je poznat od 1958. g., kada je P. A. Ring (1) u eksperimentu na 20 pasa putem distrakcije epifiza dugih kostiju upotrebom vanjskog fiksatera uspio da dobije produženja. 1969. g. G. A. Ilizarov iznosi svoja eksperimentalna i klinička iskustva (2). Na našim prostorima prvi je ovaj metod počeo da primjenjuje B. Radulović 1969. g. (3). Naše iskustvo datira od 1980. g.

METOD

Upotrebom vanjskog fiksatera primjenjuje se vlak na nivou još nezatvorene hrskavice rasta do postizanja epifizeolize. Koristimo standardni vanjski fiksater tvornice »Instrumentaria« — Zagreb, modificiran u toj mjeri da dozvoljava postavljanje kroz epifizut dva Steimanovog klina u horizontalnoj ravni. Ova dva klina su okomita na stablo vanjskog fiksatera (sl. 1).

Dnevno povećanje raspona je 1 mm. 3-eg i 5-og dana epifizeoliza se očituje bolnom reakcijom. Zbog toga zaustavljamo distrakciju u toku 1—2dana; inače je postupak u kasnijem toku bezbolan.

Ustajanje i hod u rasterećenju, kao i aktivne vježbe mobilizacije zgloba, počinjemo već sutradan nakon operativnog zahvata.



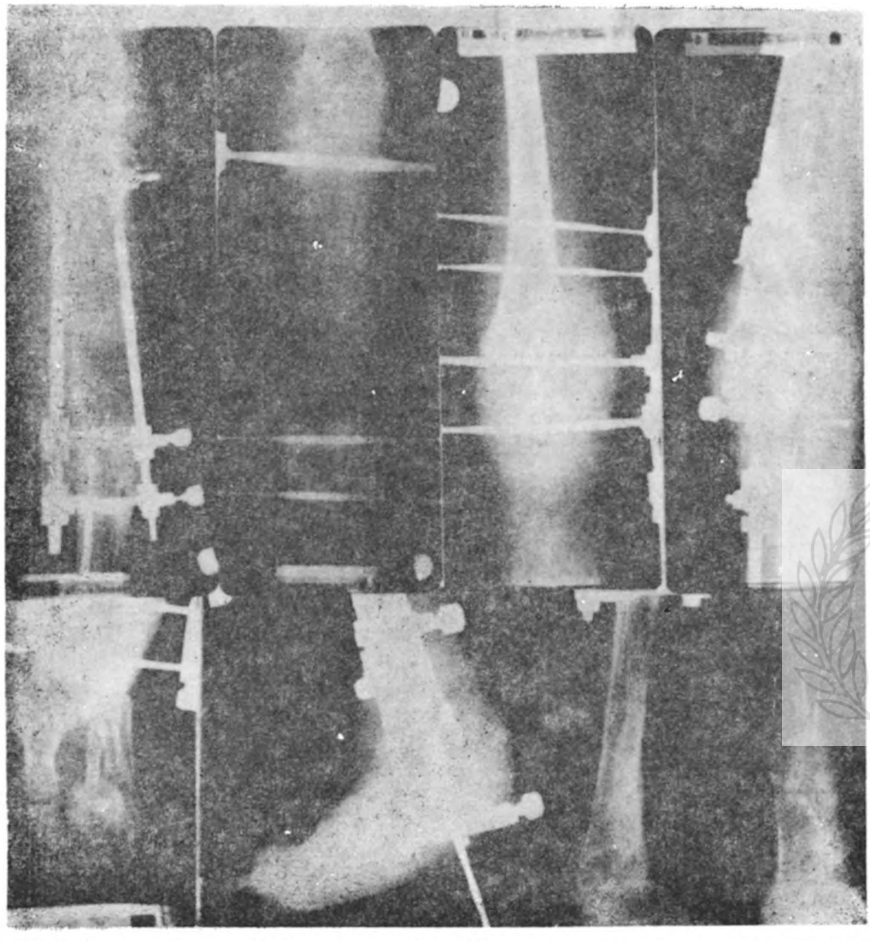
Slika 1. Dječak 14 g. sa posljedicama povreda zadobijenih u saobraćajnom udesu u dobi 3 g.: skraćenje potkoljenice 14 cm, valgus deformitet koljena, ankiloza skočnog sa varusom i supinatusom stopala u tolikoj mjeri izraženim da se oslanja na vanjsku stranu stopala; opsežni defekt kože nadomješten ranije tubusnim režnjem sa trbuha dugim 20 cm

Vanjski fiksater smo skidali prosječno $\frac{4}{+}$—6 mj. nakon operativnog zahvata, kada su nam rtg-kontrole potvrdile da je regenerat kosti odgovarajuće širine i strukture.

Ovaj postupak, mada jednostavan i pouzdan, ima svoje značajno ograničenje. Zbog zatvaranja hrskavice rasta na kojoj se vrši distrakcija, moguće ga je primijeniti samo u strogo određenoj dobnoj skupini pacijenata — indiciran je u dobu kada predstoji završetak koštanog rasta (ž 12—14 g; m 13—15 g).

Primijenili smo ga u onim slučajevima kada je inegalitet prelazio mjeru od 3 cm.

Distrakcije smo vršili na distalnoj femoralnoj (9) i proksimalnoj tibijalnoj (5) epifizi. U 1. slučaju distrakcija je vršena simultano, najprije na proksimalnoj tibijalnoj, a zatim na distalnoj femoralnoj epifizi.



Slika 2. U jednom aktu učini se suprakondilarna varizaciona osteotomia femura, epifizarna distrakcija na proksimalnoj epifizi tibije, koja daje elongaciju od 14 cm, korektivne osteotomije i artrodeze u nivou mediotarzalnog, subtalarnog i skočnog zgloba

Za određivanje koštane starosti koristili smo upute i tabelu po S a u v e g r a i n u (4, 6), čiji postupak daje mnogo više tačnosti (baš u ovoj dobi 11—15 g) no tabele po G r e u l i c h u i P y l e u. Ovo je veoma važan momenat (tačnost određivanja koštane starosti) na koji treba posebno skrenuti pažnju jer najveći procent grešaka u konačnom računu upravo otuda potiče. Dobijene podatke (koštana starost) i razliku u dužini ekstremiteta (određujemo je putem teleradiografije) unosimo za svaki segment posebno u tablice po P. H e c h a r d u (5). Na ovaj način smo u stanju da izračunamo definitivnu dužinu zdravog simetričnog segmenta, a onda je jednostavno izračunati traženo produženje.

ANU BiH АНУ БиХ

REZULTATI

Ovim postupkom mi smo liječili 14 pacijenata u vremenu od 1980 do 1987. g.

Postignuto produženje se kretalo od 3 do 14 cm, i u svim slučajevima smo postigli egalitet.

U pogledu etiologije inegaliteta imali smo kod:

— 6 pacijenata: sequellae upalnih promjena;

— 3 pacijenta: sequellae trof. oštećenja prox. femoralne epifize;

— 2 pacijenta: kongenitalne anomalije;

— 3 pacijenta: traumatsko oštećenje hrskavice rasta.

Nismo imali neurovaskularnih komplikacija; na planu infekcije lokalne promjene smo rješavali samo njegom bez upotrebe antibiotika.

U pogledu mobiliteta kod distrakcija na distalnoj femoralnoj epifizi fleksija koljena je dosezala 20—30° sve do skidanja fiksatera. Nakon toga je postignut puni opseg pokreta, izuzimajući dva slučaja, od kojih je jedan operativno riješen, a drugi je odbio predloženi operativni zahvat. Mislimo da ovaj problem proističe iz odnosa klinova i zglobne čahure koljena i ne može biti riješen promjenom položaja koljena kod njihovog plasiranja (kako to preporučuje Ilizarov kod postavljanja svojih unakrsnih Kirchnerovih igala). Zbog ovoga, moguće je, kao boljem rješenju na ovom nivou treba pribjeći upotrebi vanjskog fiksatera po Ilizarovu, mada ni on nije lišen u cjelosti ovog problema. Kod distrakcije proksimalne tibijalne epifize pokretljivost koljenog zgloba je od početka bila kvazinormalna.

DISKUSIJA

Postupak je u iskusnim rukama sa hirurške tačke gledišta krajnje jednostavan.

Uska dobna indikacija, sa druge strane, značajno sužava njegovu primjenu. Potrebna je velika tačnost u postupku izvođenja računa željenog produženja. Pošto je greška uvijek moguća, potrebno je slijediti pacijenta sve do zatvaranja hrskavica rasta na simetričnoj zdravoj strani. U jednom slučaju, uvidjevši da produženi segment gubi trku, bili smo prisiljeni da na zdravoj strani učinimo definitivnu epifiziodezu.

Potreba nošenja privremenog povišenja u obuci na zdravoj strani je rijetka. Samo u jednom slučaju to je bilo potrebno u značajnijoj mjeri (+ 5 cm, i ta se visina kroz vrijeme smanjivala). Zato je bolje u ovakvim slučajevima (kada je privremena hiperkorekcija značajna) ići na produženje dijafize.

U svim našim slučajevima došlo je do zatvaranja hrskavice rasta na kojoj je vršena distrakcija. Ova činjenica nije dovoljno naglašena u radovima drugih autora. Zato smatramo da ovu činjenicu treba posebno naglasiti i da sa njom kod ovog postupka treba računati.

Nakon radova u eksperimentu (7), na 100 hrskavica rasta kod pasa, mislimo da je dat odgovor na ovo pitanje. Naime, utvrđeno je da nakon odvajanja epifize proces reparacije ide putem penetracije metafizarnih krvih sudova kroz liniju separacije. Kada je pomak veliki, kao kompenzatorni mehanizam javlja se vaskularna epifizarna penetracija kroz hrskavicu rasta, čime ona poprima embrionalni izgled. Ukoliko je prodor metafizarnih krvnih sudova pravovremen i dovoljan, dolazi do spontanog kolapsa epifizarnih krvnih sudova i enhondralna osifikacija se normalno uspostavlja. U obrnutom slučaju (ako je distrakcija isuviše brza) duž epifizarnih krvnih sudova napreduje stvaranje fibroznih i koštanih mostova kroz hrskavicu rasta i zavisno od njihovog broja i rasporeda može doći do usporenja rasta ili potpunog njenog zatvaranja.

Zauzvrat, regeneracija kosti je izvanredno brza i izdašna, što nije uvijek slučaj kod velikih dijafiziranih produženja. U jednom teškom slučaju (skraćenje od 27 cm), nakon što je dijafizarna regeneracija počela pokazivati znake iscrpljenja (produženje femoralne dijafize je iznosilo 14 cm), mi smo pribjegli dodatnoj distrakciji proksimalne epifize tibije na istoj strani (6 cm) i skraćenju dijafize femura na suprotnoj strani (7 cm). Na taj način smo postigli egalizaciju i ovo rješenje nam se čini kao interesantan mogući izlaz u ovakvim teškim situacijama.

ZAKLJUČAK

Sa hirurške tačke gledišta, postupak je jednostavan i pouzdan. Koštana regeneracija je dobra i brza, čak i nakon velikih produženja.

Na žalost, njegove indikacije su sužene jer je primjenljiv na usku dobnu skupinu pacijenata — pred završetak koštanog rasta.

Autori posebno ističu da su u svim njihovim slučajevima, hrskavice rasta na kojima je vršena epifizo-metafizarna distrakcija bile nakon ovog postupka prijevremeno zatvorene.

ELONGATION DES MEMBRES INFERIEURS PAR DISTRACTION EPIPHYSOMETAPHISAIRE

Resumée

La méthode de distraction épiphysaire, au point de vue chirurgicale, est simple et fiable. La régeneration osseuse est bonne et vite, même après un grand allongement.

Malheuresement, ses indications sont tout à fait étroites, étant donnée qu' elle ne doit être pratiquée, que vers l' âge de 12—15 ans, avant l' arrêt du croissance.

L' allongement distal fémoral doit, à notre avis, être proscrit dans la mesure du possible, car il entraine assez régulierement une raideur du genou.

Les auteurs signalent particulièrement que, dans tous leurs cas, les cartilages du conjugeon soumisées a une distraction épiphysometaphysaire, soient fermées precocement.

LITERATURA

(1) Ring, P. A. (1958): *Experimental Bone Legthening by Epiphyseal Distraction.* Br. J. Surg., 46 : 69—73.

(2) Ilizarov, G. A. (1969): *Clinical and Experimental Dates on Bladiess Lengthenig of Lover Extremites.* Eksp. Khir. Anest., 14 : 27—32.

(3) Radulović, B. (1978): *Hirurška korekcija nejednakosti donjih ekstremiteta postupkom distrakcije epifizne hrskavice.* Zbornik radova VII Kongresa JUDT-a, Sarajevo, 222—224.

(4) Mouterde, P. (1978): *Pronostic de croissance dans les inegalites de longeur des membres inferieurs de l' enfant.* E. M. C., App. Locomoteur, Paris, 15200 E 15.

(5) Hechard, P., Carlioz, A. (1978): *Methode pratique de prevision des inegalites de longeur des membres inferieurs.* Rev. Chir. Orthop., 64 : 81—87.

(6) Sauvegrain, J., Nahum, H., Carle, F. (1969): *Maturation osseuse, importance de la determination de l' age osseuse. Methode d' evaluation, revue generale.* Ann. Radiol., 5 : 535—541.

(7) Farine, I. (1981): *Decollement epiphysaire traumatique (etude experimentale).* Rev. Chir. Orthop., 67 : 175—180.

ANU BiH АНУ БиХ

METODE TOKSIKOLOGIJE IN VITRO U PROCJENI RIZIKA ZA ČOVJEKA I NJEGOVU OKOLINU U EKOTOKSIKOLOŠKOM MONITORINGU

DRAGOMIR STANKOVIĆ

Velika ekspanzija hemijske industrije u svijetu poslije drugog svjetskog rata dovela je do enormnog zagađivanja čovjekove životne okoline toksičnim hemijskim supstancama. Ekološki uslovi su se jako pogoršali, i zbog sve veće upotrebe pesticida i vještačkih đubriva u poljoprivredi, korišćenja konzervansa i aditiva u proizvodnji konzervirane hrane, velike upotrebe deterdženata i drugih hemijskih sredstava koja se koriste za održavanje higijene u domaćinstvima, ispusnih gasova iz motornih vozila, nehigijenskog uklanjanja deponija i njihovog spaljivanja na otvorenom prostoru u blizini saobraćajnica, motela i gradskih i seoskih naselja, kao i drugih mnogobrojnih izvora zagađenja vazduha, vode, zemlje i hrane.

Zagađenost životne okoline hemijskim agensima štetnim za zdravlja, dostigla je u našoj zemlji, posebno u Bosni i Hercegovini, takav stepen da ozbiljno ugrožava zdravlje stanovništva. Kao posljedica brzog procesa industrijalizacije i urbanizacije, bez uporednog razvijanja sistema organizacije zaštite životne okoline i jačanja sistema zdravstvene zaštite čovjeka i njegovog prava da živi u bezopasnoj okolini, narušavanje ekološke ravnoteže dostiglo je veoma opasne razmjere i sa sigurnošću se može očekivati dalje značajno povećanje zagađivanja životne okoline uvođenjem opasnih tehnologija koje razvijene industrijske zemlje, zbog opasnosti za zdravlje svog stanovništva, izvoze u zemlje u razvoju. Unošenje takvih tehnologija u naše prostore predstavlja za nas nove opasne izvore zagađivanja životne i radne okoline hemijskim jedinjenjima štetnim za zdravlje, sa toksičnim, alergogenim, kancerogenim, mutagenim i drugim štetnim dejstvima.

Uvodno izlaganje na javnom sastanku Odjeljenja medicinskih nauka *Metode toksikologije in vitro i mogućnosti njihove primjene u ekotoksikološkom monitoringu.*

U istraživanju uslova za stvaranje i funkcionisanje optimalnog sistema organizacije praćenja, kontrole i suzbijanja uticaja ekoloških opasnosti na zdravlje, radnu sposobnost, rast i razvoj stanovništva potrebno je utvrditi prioritetna zdravstveno-ekološka istraživanja, u kojima ekotoksikološka istraživanja, s obzirom na enormnu hemijsku zagađenost životne sredine, treba da zauzmu jedno od vodećih mjesta. Ekotoksikološka istraživanja treba da obuhvate u prvom redu iznalaženje, razvijanje i usavršavanje metoda toksikologije neophodnih za praćenje i ekspertiznu procjenu ekoloških opasnosti u procjeni rizika za čovjeka i njegovu okolinu. Među toksikološkim metodama koje se koriste za praćenje ekoloških opasnosti važno mjesto zauzimaju metode toksikologije in vitro, razrađivanje i usavršavanje postupaka za primjenu tih metoda u ispitivanju akutnog, subakutnog i hroničnog toksiciteta, u procjeni rizika za čovjeka i njegovu okolinu u širokom stratumu eksperimentalne toksikologije na nivou intaktne životinje, organa, celularnom, subcelularnom i molekularnom nivou. Mnoge metode toksikologije in vitro danas se koriste u svijetu u ekotoksikološkom monitoringu u procjeni rizika za čovjeka i njegovu okolinu od hemijskih supstanci koje zagađuju čovjekovu životnu okolinu i štetno djeluju na njegovo zdravlje. Mogućnosti za primjenu metoda toksikologije in vitro na izolovanim organima, tkivima i ćelijama, patohistolooške histohemijske i druge savremene metode ispitivanja u eksperimentalnoj toksikologiji danas obogaćuju i alternativne metode kulture tkiva, hemijsko-analitičke metode, matematički modeli, kompjuterski modeli na biološke procese i druge alternativne metode kao zamjena za eksperimente na životinjama. Da bi se uspješno mogle primjenjivati u ekotoksikologiji, ove metode treba razvijati, usavršavati i prilagođavati u procjeni rizika za čovjeka i njegovu okolinu u ekotoksikološkom monitoringu. Na procjenjivanje rizika za čovjeka i njegovu okolinu primjenom metoda toksikologije in vitro nesmnjivo utiču na preciznost problemi ekstrapolacije, koji su praktično u manjoj ili većoj mjeri uvijek prisutni kada se rezultati dobiveni u ogledima na životinjama, njihovim organima i ćelijama treba da prenesu na čovjeka i funkcije njegovog organizma kao cjeline. Stoga ekotoksikološka ispitivanja hemijskih supstanci in vitro i na nivou intaktne životinje u procjeni rizika za čovjeka treba dopunjavati i drugim metodama kao što su retrospektivna i prospektivna epidemiološka istraživanja efekata štetnog djelovanja hemijskih agensa zagađene životne sredine na zdravlje izloženog stanovništva koristeći pri tome i klinička ispitivanja radi što potpunijeg sagledavanja rizika sa čovjekovo zdravlje od hemijskog zagađenja životne okoline. Treba imati na umu da su u složenim uslovima zagađenja životne sredine nepredvidive moguće različite interakcije pri dugotrajnom djelovanju mnoštva različitih hemijskih supstanci i drugih prisutnih štetnih agensa u različitim uslovima i lokalitetima zagađene životne i radne okoline.

U preporukama prioritetnih zdravstvenih istraživanja u okviru strategije Svjetske zdravstvene organizacije »Zdravlje za sve do 2000-te godine« posebno mjesto u njenim ciljevima od 18—25 posvećeno je zaštiti čovjekove životne okoline. U preporukama prioritetnih istraživa-

nja istaknuta je potreba za bazičnim studijama iz ekogenetike i genotoksikologije, istraživanja interakcije različitih agensa, naročito pri dugotrajnom djelovanju malih doza hemijskih supstanci.

Imajući u vidu veoma veliki značaj ekotoksikoloških istraživanja u stvaranju i razvijanju sistema organizacije zaštite od ekoloških opasnosti i narušavanja zdravstveno-ekološke ravnoteže, program razrađivanja metoda toksikologije in vitro, posebno postupaka za njihovu primjenu u ekotoksikološkom monitoringu, uvršten je u tematsku oblast 6 Društvenog cilja XIV sa ciljem da doprinese izradi prijedloga organizacije ekotoksikološke laboratorije u funkciji savremenog ekotoksikološkog monitoringa.

U tematskoj oblasti 6 DC XIV Naučni program 2, koji se odnosi na ekotoksikološki monitoring, odvijaće se u najtješnjoj saradnji sa Tematskom oblasti 5 DC XIV — Program toksikoloških istraživanja lijekova, otrova i ksenohiotika — što će omogućiti uspješniji rad racionalnijim korištenjem kadrova, opreme i finansijskih sredstava.

Cilj je ovog našeg naučnog sastanka, koji organizuje Odjeljenje medicinskih nauka ANU BiH na temu: »*Metode toksikologije in vitro i mogućnosti njihove primjene u ekotoksikološkom monitoringu,* je da ukaže na izuzetno veliki značaj razrađivanja eksperimentalnih toksikoloških metoda, posebno metoda toksikologije in vitro u ekotoksikološkom monitoringu i ekspertiznoj procjeni ekoloških opasnosti od hemijskog zagađivanja životne okoline. Ovaj naš naučni sastanak takođe treba da pokaže postojeće stanje naših kadrovskih mogućnosti, opremljenost naših instituta pootrebnim aparaturama i uređajima i stanje dostignutih iskustava u istraživanju ove problematike i naročito nedostatke u naučnim kadrovima, opremi i finansijskim sredstvima, koji otežavaju naučno-istraživački rad i onemogućavaju razvoj nauke i uzdizanje mladih naučnih kadrova.

Uviđajući veliki naučni značaj ove problematike, koja u savremenoj toksikologiji u svijetu pobuđuje sve veći interes na istraživanje ove izuzetno naučno aktuelne problematike, Medicinsko odjeljenje ANU BiH je pripremilo ovaj naučni sastanak s ciljem da podstakne interesovanje za istraživanje aktuelnih problema ekotoksikologije svih naših istraživača, posebno mladih naučnih radnika.

ANU
BiH
АНУ
БиХ

ALTERNATIVNE METODE ZA ISTRAŽIVANJE NA ŽIVOTINJAMA U ISPITIVANJU KSENOBIOTIKA I EKOTOKSINA SA POSEBNIM OSVRTOM NA IZOLIRANE ORGANE

SEID HUKOVIĆ i NEDIM HUKOVIĆ
Institut za farmakologiju i toksikologiju Medicinskog fakulteta u Sarajevu

UDC 615.017:502

Apstrakt. Alternativne metode istraživanja na životinjama se u zadnje vrijeme sve više praktikuju iz dva osnovna razloga. Prvi je razlog brzina, efikasnost i jednostavnost da se dobiju rezultati efekta djelovanja ksenobiotika i ekotoksina. Drugi razlog je snažan antivivisekcionistički pokret, koji eksperimente na životinjama stavlja pod rigoroznu kontrolu. Alternativne metode imaju svoje prednosti i svoje nedostatke. Nedostaci su težak transfer sa rezultata in vitro na događaje in vivo i još teži transfer sa životinjskog materijala na čovjeka. Posebne i preporučene alternativne metode su ispitivanja na izoliranim organima životinja i to na taj način da se nervi izoliranih organa stimulišu konstantnim električnim stimulusima u konstantnim intervalima. U ambijent u kojem su izolirani organi dodaju se ksenobiotici ili ekotoksini i brzo se ustanovi jedan dio djelovanja ksenobiotika. Na ovakav način je moguće izvršiti više ispitivanja samo na jednoj životinji i na taj način steći orijentacioni uvid u djelovanje ksenobiotika. Izvršena je analiza preko pedeset ksenobiotika na opisani način. Preporučuje se za početne analize uzeti tri ili četiri organa i to ezofagus, mokraćni mjehur, i duktus deferens sa njihovim vanjskim nervima. Ukoliko se uzimaju četiri organa, onda se uzima želudac ili ileum. Ako se uzima ileum, onda se transmuralno stimulira, a uzima se od zamoraca. U prosuđivanju djelovanja ksenobiotika uzima se promjena visine izazvanih kontrakcija ili relaksacija, promjena tonusa i kombinacija obiju promjena.

Ključne riječi: alternativne metode, ksenobiotici, ekotoksini, izolirani organi, promjena efekta stimulacije.

Brojni su ksenobiotici i potencijalni toksini u našoj najbližoj okolini o kojima se vrlo malo zna. Ksenobiotici, kao potencijalni toksini, mogu biti opasni po ljude, životinje i ostala živa bića, a da se priroda njihove opasnosti vrlo malo poznaje i, naravno, vrlo malo ispituje. Sve je više novostvorenih, ekstrahiranih ili novosintetiziranih supstanci čije su molekule strane organizmima, tzv. ksenobiotika za koje treba ustanoviti u kojoj mjeri su toksični za živi organizam.

Toksikolog, posebno ekotoksikolog imao bi dva glavna zadatka. Prvi je da oslobodi sredinu od otrova ili ksenobiotika, kao potencijalnog otrova, i drugi je zadatak da sazna vrstu, tip ili spektar toksi-

Izradu ovog rada je sufinansirao je SIZ nauke BiH.

čnosti neke supstance. Prvi i sigurno važniji zadatak će ekotoksikolog teško ispuniti, jer su za to potrebna velika sredstva, snage koje on nema. Za tu svrhu potrebno je mijenjati ljudsku prirodu, preinvestirati industriju, smirivati ekonomske krize itd. Drugi zadatak je saznavati u kojoj mjeri je neka sustanca toksična, koliko oštećuje pojedinca ili grupu, koja opasnost prijeti kao akutna, a koja kao hronična, te na što ksenobiotik ili ekotoksin najviše djeluju, kako djeluju, način djelovanja i mnogo drugih podataka.

Ovaj drugi zadatak o spoznaji toksičnog djelovanja ksenobiotika i svih drugih supstaci se vrši na dva načina. Klasičan način upotrebljava kao predmet istraživanja cijele životinje i tzv. metod vivisekcije, dok novi način upotrebljava alternativne metode istraživanja (L e m b e c k, 1988). Od pomenutih alternativnih metoda je najčešći metod in vitro, kada se upotrebljavaju još živi dijelovi organizma. Da se vrše klasične metode istraživanja na koja smo navikli, potrebno je dosta sredstava, životinja, vremena i kadrova. Da se vrše alternativne metode istraživanja, in vitro, potrebno je manje sredstava, postupak je brži i pristupačniji, ali i alternativne metode imaju svoja ograničenja.

Kao i kod drugih istraživanja u medicini mogu se upotrebljavati epidemiološko-analitičke metode i eksperimentalne metode. Epidemiološko-analitičke metode su korisne ako se žele spoznati kauzalno-posljedični odnosi, ali je epidemiološki metod dugotrajan, ne omogućava da se istražuje bezbroj novih supstanci, ukratko, ograničen je na manji broj ciljeva. Epidemiološko-analitički metod se upotrebljava uglavnom na ljudima na dva načina: jedan je kada se kreće od uzroka ka posljedici, a drugi je kada se kreće od posljedica ka uzroku, a uzrok je u ovom slučaju ksenobiotik. Uglavnom se upotrebljava ovaj drugi put, tj. ide se od bolesti i bolesnika ka uzroku. To međutim ne može poslužiti da se otkrije priroda ekotoksikoloških djelovanja bezbroj supstanci koje se pojavljuju u okolini.

Sve je veća potreba da se istražuje toksično djelovanje, jer postoje brojne a priori toksične supstance i ksenobiotici, zatim postoji potreba da se ustanovi stepen i priroda toksičnog djelovanja lijekova, aditiva u hrani, dakle onih supstanci čiji je toksični efekt nusprodukt njihovom pozitivnom djelovanju (Z b i n d e n and G r o s s, 1979). U oba slučaja je potrebno mnogo eksperimentilnih životinja podvrgnutih vivisekciji, određivanju akutnog toksiciteta, potrebno je mnogo sredstava, opreme, kadrova i drugih snaga. Paradoks je da je sve veći broj ksenobiotika, a sve manji broj kadrova koji će ih istraživati, pa se moraju tražiti alternativni putevi. Takvom radu se isprječuju brojne teškoće, a te teškoće nisu samo materijalne, nego i etičke prirode.

Potrebno je riješiti više problema ukoliko se želi pristupiti masovnom ispitivanju biološkog djelovanja ksenobiotika, a jedan je da se ostvare materijalni uslovi i steknu snage za ispitivanje velikog broja ksenobiotika. Drugi problem koji treba riješiti je prevazilaženje etičkih prepreka, i treći ne manje težak problem je da se riješi kako uraditi što više ispitivanja.

Jedan od puteva rješavanja navedenih problema su tzv. alternativne metode od kojih su najviše upotrebljavana ispitivanja in vitro.

Alternativne metode životinjskim i ljudskim toksikološkim ispitivanjima mogu omogućiti i ubrzati sticanje najvažnijih spoznaja o djelovanju ksenobiotika. Alternativne metode, posebno one in vitro, na manjim nivoima organizacije sistema, kao što su stanice, tkiva i izolirani organi imaju svoja ograničenja. Izolirani organi su dio cjeline, pa se rezultati dobiveni na njima mogu uzeti kao dio za cjelinu, »pars pro toto«. To isto važi, još i više, za tkiva in vitro i za stanice in vitro.

Alternativne metode, koje su zamjena životinjskim eksperimentima, su neophodne za ispitivanje ksenobiotika. Cilj ovog rada je da se opišu mogućnosti istraživanja, prvenstveno sa izolovanim organima in vitro, izolovanim stanicama ili drugim izolovanim strukturama. Zadatak je da se pronađu, ispitaju i opišu najpogodniji izolirani organi koji mogu poslužiti da se odredi djelovanje ekotoksikona, ksenobiotika. Zadatak je zatim da se na tako pripremljene strukture apliciraju neki ekotoksini i da se ustanovi djelovanje i eventualno mehanizam djelovanja. Kada se identifikuju najpogodniji organi za određeni ksenobiotik, onda će se stimulisati pripadajući nervi, organ će se nagoniti na motornu funkciju, registrovat će se kontrakcije, aplicirati ksenobiotici i pratiti promjene.

MATERIJAL I METODA

Alternativne metode ispitivanja, kao alternative vivisekcije, mogu biti na živom ili neživom materijalu. Ako se radi o živom materijalu, onda se radi o strukturama, dijelovima organizma koje su prirodno ispod organizacione cjeline čitavog organizma. Ako se radi o neživom materijalu, modeli na kojima se ispituje mogu biti raznih nivoa organizacije, čak molekularnog ili submolekularnog nivoa. Kao alternativni model mogu biti kompjutorski sistemi, molekule, receptorske molekule, polimolekularni sistemi, a što se tiče živih struktura, to mogu biti subcelularne strukture, stanice kao model nekog organskog sistema, razna tkiva, organi i više spojeni organski sistemi. Posebna vrsta modela za istraživanja su model-sistemi izolirani organi, izolirani skupa sa vanjskim motornim nervima, koji se još nazivaju izolirani inervirani organi (IIO).

Kada se radi o tome da li se žrtvuje životinja, onda modeli istraživanja mogu biti bez ponovnog žrtvovanja ili sa ponovljenim žrtvovanjem. Bez ponovnog žrtvovanja životinja mogu se dobiti razni enzimi, permanentne stanične linije, mikroorganizmi; takvi modeli obično služe da se dobiju neki fundamentalni podaci. Pomenuti materijali za modele na kojim se ispituje mogu se dobiti i od humanog materijala (Kapić et al., 1990). Ukoliko se radi o ponovnom žrtvovanju životinja, onda se dobiju IIO, dakle radi se model-sistemima kada se za svako ispitivanje treba žrtvovati životinja, ali za razliku od vivisekcije na jednoj žrtvovanoj životinji, uradi se preko 20 eksperimenata, a ne da se žrtvuje 20 životinja za jedan eksperiment (Guenzel et al., 1988).

Izolirani organi, izolirani skupa sa svojim vanjskim nervima ili uzeti sa svojim unutrašnjim motornim nervima se mogu uzimati od domaćih životinja iz klaonica, zatim žrtvovanjem eksperimentalnih životinja, te od odbačenih komada ljudskih glatkomišićnih organa, odbačenih za vrijeme operacija. Povremeno se mogu dobiti komadići izoliranih organa zdravih ljudi kada se radi o transplataciji organa sa zdravog davaoca. Rjeđe se uzima IIO od mrtvih ljudi; izuzetak su fetusi koji se nasilno rađaju, kada se vrši ekaspulzija fetusa pod uticajem raznih ginekološko-akušerskih intervencija. U svakom slučaju se maksimalno pazi da ne dođe do etičkih prekršaja, jer se uzimaju samo odbačeni komadi tkiva.

Obično se preparira komadić od 2—4 cm, po mogućnosti longitudinalno nepresječen, tako da postoji očuvana cijev. Takav organ se veže koncima za dvije strane i ostavlja da se relaksira i adaptira. Preparat se stavlja u jednu od otopina, na pr. Tyrode otopinu koja se zagrijava na 32 stepena C. Otopina se aerira sa kiseonikom ili, još bolje, karbogenom. Neki IIO, vjerovatno zbog posebnog metabolizma, mogu se kontrahirati in vitro unatoč hipoksije, dok je drugima IIO potrebno mnogo više aeracije. Jedan kraj jedne strane organa se veže za transducer koji može biti izometrijski, izotonični ili auksotonični. Organe koji se skraćuju i koji prave veće pomake je bolje vezati za izotonični, dok organe koji razvijaju silu je bolje vezati za iziometrijske transducere. Auksotonični transduceri mjere skupa silu i pokret, oni su obično za početna istraživanja.

Ukoliko se želi raditi sa vanjskim motornim nervom, onda se takav nerv uvlači u elektrodu. Ukoliko nije moguće ispreparirati vanjski nerv i njega koristiti za električnu stimulaciju, onda se mogu koristiti unutrašnji motorni nervi, odnosno ganglije koje se nalaze intramuralno. Nakon perioda adaptacije počinje električna stimulacija motornih nerava i to najčešće sa slijedećim parametrima: 20 mA, 10 Hz, 1 mSek. u serijama od svake minute u trajanju od jedne sekunde. Jačina i ostala svojstva električne stimulacije se mijenjaju prema prilikama. Prilikom stimulacije motornih nerava dolazi prije do kontrakcije iako se događa da stimulacija može dovesti do relaksacije. Ovisno od organa, može se dogoditi bifazna reakcija, kontrakcija nakon koje uslijedi relaksacija ili obratno, što je rjeđe da prvo uslijedi relaksacija iza koje će biti kontrakcija.

Prepracije koje su se najviše upotrebljavale za analizu djelovanja ksenobiotika su bile iz probavnog trakta i to: ezofagus sa vanjskim holinergičnim somatskim nervom, želudac, zapravo njegov fundus sa gastričkim autonomnim holinergičkim nervima, kolon sa hipogastričkim pretežno adrenegičkim nervom ili sa ograncima pelvičkog nerva. Iz genitourinarnog trakta su se najviše upotrebljavale preparacije i to: duktus deferens sa pretežno adrenegičkim nervom i mokraćni mjehur sa holinergičkim autonomnim atropin rezistetnim nervom. Rjeđe se upotrebljavaju preparacije iz kardiovaskularnog sistema, kao što je srce, odnosno atrija sa parasimpatičkim ili simpatičkim nervima. Od preparacija koje se upotrebljavaju sa unutrašnjim nervima su najčešće preparacije tankog crijeva, pretežno ileuma.

Izolirani organi kojima se stimulišu vanjski ili unutrašnji nervi mogu biti posebno pripremljeni in vitro. Priprema može biti senzibilizacija (H u k o v i ć, 1989), zatim poseban tretman sa nekim supstancama još in vivo da preparacija bude ex vivo; zatim kada se izvadi organ i dobije preparacija IIO, onda se organ može tretirati in vitro da bude osjetljiviji, ili se može šuplji organ izvrnuti kao prst na rukavici, pa kao takav upotrijebiti in vitro, tada aplicirana supstanca, odnosno ksenobiotik prvo dolazi na sluznicu, a inače prvo dođe na serozu. Posebna mogućnost, koju treba navesti je uzimanje organa u raznim periodima fetalnog ili postfetalnog razvoja (M u l a b e g o v i ć, 1987).

Dodavanje ksenobiotika se obično vrši u 0,2—0,4 ml volumena, tako da je ksenobiotik otopljen u vodenoj otopini. Ksenobiotici mogu biti liposolubilni i netopivi, onda se prave suspenzije, pa se kao takve injiciraju u posudu za izolirane organe. Obično se izračunava finalna koncentracija, tako da se dobiju najčešće djelotvorne koncentracije, obično su to višekratne mikromolarne koncentracije. Ksenobiotici, koji se ispituju, ostavljaju se u posudi za izolirane organe neko vrijeme, do deset minuta, a onda se ispiru.

Zaključuje se o djelovanju ksenobiotika na osnovu komparacija prije i poslije dodate supstance. Postoje promjene tonusa, odnosno promjena visine bazalne linije, pa promjene visine izazvanih kontrakcija. Promjene mogu biti u apsolutnom ili relativnom smislu, što znači da se promjena prosuđuje na taj način da li su od kontrolne bazalne linije, ili je od nove bazalne linije. Ovisno od toga šta se mijenja i mjeri, može se izmjeriti sila, pokret ili neki drugi parametar, te na osnovu njega donositi kvantitativne procjene.

REZULTATI

Stimulacija pripadajućih egzogenih ili endogenih motornih nerava dovodi do kontrakcije organa. Kontrakcija se događa ukoliko se stimulira nerv koji izaziva kontrakcije. Postoje motorni nervi čija će stimulacija dovesti do relaksacije mada se relaksacija rjeđe registruje. Mnogo je učestaliji rezultat da se dobije dvofazna reakcija, umjesto da se dobije relaksacija; prvo uslijedi kontrakcija, iza čega uslijedi relaksacija organa.

Ako su stimulusi konstantni i u konstantnim odgovarajućim intervalima, onda su reakcije organa ravnomjerne. Ako se tada dodaju ksenobiotici, može se vrlo uočljivo registrovati promjena efekta stimulacije. Izolirani organi sa njima pripadajućim nervima tada su model-sistemi pojedinih organskih sistema, ili su model-sistemi pojedinih mišića, ili su model-sistemi neuromišićne transmisije. Kao model-sistemi mišića mogu biti modeli glatkih, odnosno poprečno-prugastih mišića, a ako su model-sistemi nervnomišićne transmisije, mogu biti model holinergične, adrenergične, NANC ili neke druge neurotransmisije.

U pojedinim eksperimentima, kada se ispituju ksenobiotici, stimulišu se endogeni motorni nervi ili endogene ganglije. U tim slučajevima nije uvijek moguće odvojiti uticaj direktne u odnosu na indirektnu stimulaciju. Transmuralna stimulacija, koja služi za stimulaciju endogenih nerava, se primjenjuje onda kada postoje intramuralni nervi. Promjenom električnih parametara, a posebno frekvencije, može se donekle pokušati pretežno stimulisati holinergične ili adrenergične nerve. Obično su stimulusi niže frekvencije djelotvorniji za holinergične, a visoke frekvencije za oba tipa nerava, ali se bolje registruju efekti za adrenergične nerve.

Efekti dodatih ksenobiotika, ovisno od supstance, mogu djelovati na više načina. Nekada ksenobiotici ne djeluju na organ koji je prividno mehanički miran, nego se njegov efekt vidi tek kada je organ stimulisan na pokret, sekreciju ili neku drugu funkciju. U tome je prednost izoliranih organa sa njima pripadajućim nervima koji se električki stimuliraju, jer se može na osnovu promjene efekta stimulacije pod uticajem ksenobiotika naslućivati na djelovanje ksenobiotika. Djelovanje ispitivane supstance, potencijalnog ekotoksina, može biti povećanje efekta stimulacije, tj. povećanje visine kontrakcija. Djelovanje također može biti povećanje tonusa, kombinacija povećanja tonusa i visine izazvanih kontrakcija. Također se može desiti da se pojačava relaksacija, pa čak i relaksacija izazvana stimulacijom nerava.

Na osnovu promjena mehaničke reakcije izoliranih organa zaključuje se o djelovanju ispitivane supstance i mehanizma njenog djelovanja. Reakcije izoliranih organa su brže, rezultati su kvantitativni i relevantni da se nasluti priroda djelovanja ekotoksina. Doze koje treba aplicirati obično se kreću oko mikromolarnih koncentracija. Vrlo često će se ustanoviti odnos između doze i reakcije.

Do sada je na opisan način analizirano više desetina ksenobiotika i od ranije poznatih i potvrđenih ekotoksina. Rezultati ukazuju da reakcija nije ovisna od veličine molekule niti od kompliciranosti građe molekule. Registruje se efekt nekog kationa, ili aniona, kao i efekt komplikovanih molekula. Vrlo je teško prognozirati efekt ksenobiotika samo na osnovu njegove molekularne strukture. Jednostavne molekule ili njihovi ioni u malim koncentracijama mogu djelovati kao molekule koje su slične vlastitim neurotransmitorima. Pravac djelovanja je također teško prognozirati, a on ne mora biti isti na raznim preparacijama.

DISKUSIJA

Alternativne metode za eksperimente na životinjama za ispitivanje ksenobiotika i ekotoksina se mnogo manje koriste nego to po svojim mogućnostima zaslužuju. Moguće je dobiti takve reagirajuće strukture koje će ukazati na pravac, jačinu i tip djelovanja ksenobiotika. Najbolje je započeti istraživanje ksenobiotika na tri ili četiri izolirana organa i to: ezofagus sa vanjskim nervom, mokraćni mjehur sa ograncima pelvičkog nerva i duktus deferens sa hipogastričkim nervi-

ma. Ukoliko se rade eksperimenti na miševima, onda se postojećim trima izoliranim organima može pridodati želudac, a ukoliko se rade na zamorcima, onda se može kao četvrti organ pridodati ileum.

Ezofagus sa pripadajućim motornim nervom je model-sistem poprečnoprugaste muskulature, somatske holinergičke transmisije, a spada među preparacije koje su vrlo robusne i izdržive. Preparacije mokraćnog mjehura je model-sistem autonomne holinergične, atropin-rezistetne neurotransmisije. Treći organ koji bi uz pomenuta dva bio korišten za ispitivanje ksenobiotika je duktus deferens sa adrenergičkim autonomnim hipogastričkim nervom. Ukoliko se još koristi četvrta preparacija, želudac sa holinergičkom autonomnom invercijom, onda postoji model-sistem koji je veoma osjetljiv. To isto važi za ileum zamorca, ali se tada stimulišu intrinzički nervi. Koji će se organi uzeti za analizu ksenobiotika ovisi od eksperimentalne životinje ili od organizma od kojega se vrši preparacija.

Upotreba izoliranih organa uzetih od životinja ili od čovjeka ima svoje prednosti, ali i nedostatke. Jedan od nedostataka je transfer dobivenih rezultata, prvo sa dijela izoliranog organa na cijeli organizam, dakle transfer rezultata sa in vitro na in vivo, a zatim sa životinje na čovjeka (Kobinger, 1988; Ruelius, 1987). To posebno važi za toksikološka istraživanja (Czok, 1988; Henschler, 1988; Markwardt, 1988).

Osim izoliranih organa, danas se za in vitro ispitivanja kako ksenobiotika tako i drugih aktivnih supstanci upotrebljavaju izolirane stanice ili subcelularne strukture (Borenfreund and Puerner, 1985; Gotti et al., 1987; Sher et al., 1990; Huković, 1987; Huković, 1990. i brojni drugi). Više je posebnih metoda za alternativna ispitivanja na životinjama. Interesantno je mišljenje Goodforda (1987), koji navodi da se alternativne metode mogu spuštati sve do kompjutora. On misli da spoznajom receptora za dalja ispitivanja nisu potrebni organi ili stanice, nego samo fizikalno-hemijske nežive strukture, a sa spoznajom fizikalno-hemijskih zakonitosti preostat će samo matematika i kompjutori.

ALTERNATIVES TO ANIMAL EXPERIMENTS IN RISK ASSESSMENT OF XENOBIOTICS AND ECOTOXINS USING ISOLATED ORGANS

Summary

Xenobiotics and ecotoxins should be toxicologicaly defined in spite of their great number in enviorment, industry and labqratories. There are two obstacles for the toxicological examinations of xenobiotics and ecotoxins. The first one is expensiveness, animals and time consuming. The second obstacle is antiviosectionist movement. The use of isolated organs with theire motor nerve stimulations could be alternative to the whole animal experiments in ecotoxicological risk assessments. The isolated innervated organs described were with extrinsic and intrinsic motory nerve stimulation. It was recommended to use four preparatons with extrinsic nerves, ana they were: oesophagus, stomach, urinary bladder and ductus deferens taken out from the mice. If the guinea-pigs were used fourth organ could be ileum instead of stomach. More then 50 xenobiotics were analysed in order to improve the method for toxicological investigation.

LITERATURA

Borenfreund, E. and Puerner, J. (1985): *Toxicity Determined in Vitro by Morpholigical Alternations and Neutral Red Absorbtion,* Toxicology Letters, 24, 119—124.

Czok, R. (1988): *Abhaengig vom Tierversuch, Arzneimitel Sichercheit,* s. 45—51. U Lembeck, F.: Alternativen zum Tierversuch, Thieme Verlag Stuttgart.

Goodford, P. (1987): *Receptor-Based Drug Design,* s. 607—614. U Rand, M. J. and Raper, C.: *Pharmacology.* Proc. Exerpta Medica, Amsterdam.

Gotti, C., Cabrini, D., Sher, E. and Clementi, F. (1987): *Effects of Long-Term in Vitro Exposure to Alminium, Cadmium or Lead on Differentiation and Cholinergic Receptor Expression in a Human Neuroblastoma Cell Line,* Cell Biol. and Toxicol., 3, 431—440.

Guenzel, P., Reinhardt, C. and Schiffmann, D. (1988): *Proc. Symposium Alternatives to Animal Experiments in Risk Assessments.* Schering AG West Germany, Berlin.

Henschler, D. (1988): *Sichercheit von Industriechemikalien,* s. 55—61. U Lembeck, F.: *Alternativen zum Tierversuch,* Thieme, Stuttgart.

Huković, S. (1987): *In vitro ispitivanje lijekova i ksenobiotika sa posebnim osvrtom na izolirane inervirane organe.* s. 9—11. Zbornik radova. Peti susreti farmakologa, Zagreb 24. 06. 1987.

Huković, N. (1990): *Farmakološka karakterizacija nikotinskih receptora ćelijskih linija humanog mikrocelularnog karcinoma pluća.* Magistarski rad. Medicinski fakultet, Sarajevo.

Huković, S. (1990): *Vizualizacija alergijske reakcije na izoliranim i inerviranim organima.* Saopštenja SANU, Beograd.

Kobinger, W. (1988): *Uebertragbarkeit von tierexperimentallen Ergebnissen auf den Menschen,* s. 35—43. Lembeck, F.: *Alternativen zum Tierversuch,* Thieme, Stuttgart.

Kapić, E., Mulabegović, N., Rajman, I., Potkonjak, D., Bošković, S. and Huković, S. (1990): *The Isolated Human Ureter as a Model-System in Pharmacology.* Iugoslav. Physiol. Pharmacol. Acta. 26, 123—127.

Kramer, M. S. (1988): *Clinical Epidemiology and Biostatistics.* Springer-Verlag, Berlin.

Lembeck, F. (1988): *Alternativen zum Tierversuch.* Thieme, Stuttgart.

Marquardt, H. (1988): *Neue Wege der Toxikologie: die Zellkultur,* s. 62—70. U Lembeck, F.: *Alternativen zum Tierversuch,* Thieme, Stuttgart.

Mulabegović, N. (1986): *Neuronalna i neuroefektorna transmisija u raznim periodima razvoja.* Doktorska disertacija, Medicinski fakultet, Sarajevo.

Ruellius, H. (1987): *Extrapolation from Animals to Man: Predictions, Pitfalls and Perspectives.* Xenobiotica, 17, 255—265.

Sher, E., Pratesi, G., Raggi, G., Ciceri, E., Leone, G., Huković, N. and Clementi, F. (1990): *Expression of DNA Topoisomerase Genes in Correlated with Multidrug Resistence in Human Lung Cancer Cell Lines.* s. 119—121. Proc. of Second intern. conference on small lung cancer, Ravenna, Italia, May 11—12, 1990.

Zbinden, G. and Gross, F. (1979): *Pharmacological Methods in Toxicology,* Pergamon press, Oxford.

METODE ISPITIVANJA MIKOTOKSIKOZA U EKOTOKSIKOLOGIJI

LADISLAV OŽEGOVIĆ
Akademija nauka i umjetnosti Bosne i Hercegovine, Sarajevo

UDC 615.918:582.282

Apstrakt. Prikazom načina i metoda istraživanja pojedinih registrovanih mikotoksikoza opisane su i kritički ocijenjene metode ispitivanja mikotoksikoza. Izneseni su sporni momenti nekih oboljenja suspektnih kao mikotoksikoze, kao i značenje pojedinih mikotoksina za zdravlje ljudi, odnosno kauzalna povezanost mikotoksina s oboljenjima ljudi. Citirana su istraživanja o pojedinim utvrđenim mikotoksinima i mikotoksikozama u Jugoslaviji.

Ključne riječi: Mikotoksikoze, metode ispitivanja, ekotoksikologija.

Prema ustaljenoj definiciji, mikotoksini su sekundarni metaboiti plijesni, štetni po organizam ljudi i životinja. Neki, međutim, misle a bi ovu definiciju trebalo proširiti sa toksičnosti za sve žive organizme ili stanice u kulturi. Nije to jedina neujednačena tačka mišljeja: po navodima raznih autora, broj mikotoksina široko varira od 70 do 3000 (83). Razumljivo je da svi ti metaboliti ne mogu imati sto značenje niti imaju istu toksičnost. Tako se, na primjer, među rihotecenima, jednoj od skupina mikotoksina za koje se danas zna da ı ima više od 60 (98), nalaze toksini neujednačene toksičnosti, često isto doba više njih zajedno u istom supstratu, pa i zajedno sa druim mikotoksinima koji ne pripadaju trihotecenima. Poznato je da e toksičnost jednog mikotoksina (aflatoksina) smanjuje, drugog (zeaalenone) povećava u toku metaboličke transformacije od fermentnih istema u organizmu, jer su metaboliti aflatoksina B 1 (AFP 1, AFQ 1, FM 1) manje toksični od unijetog AFB 1, dok je toksičnost zearaleola veća od unijetog zearalenona. Toksičnost mikotoksina se razlikuje d jedne do druge vrsti životinja — ptica, pa čak i unutar rasa iste rste. Klasičan primjer je veoma osjetljiv štakor na kancerogenost flatoksina i rezistentni miš na istu aktivnost AFB 1, kao i veća osjetivost muških životinja na aflatoksin, te raznolika osjetljivost na niz oksina prema fiziologiji jedne vrsti osjetljive životinje (mlade, gradne, deficitarne, bolesne od parazitoza ili bakterijskih ili virusnih ıfekcija), što ovisi o metaboličkoj situaciji na ciljnom organu ili orgaeli izložene jedinke (53).

Iako općenito vrijedi pravilo da mikotoksikoze nastaju peroralim uzimanjem supstrata u kojem se nalaze mikotoksini, opisani su

slučajevi djelovanja aflatoksina koji je dospio u organizam inhalacijom i izazvao promjene na respiratornom sistemu, jednako kao i djelovanje trihotecena od perkutane rezorpcije kad su upotrebljeni kao bojni otrovi (45, 99).

METODOLOŠKI PRISTUPI ISPITIVANJU MIKOTOKSIKOZA

Realnost mikotoksikoza je davno među nama. Zanemarimo li *ergotizam*, koji je u srednjem vijeku vjerojatno bio povodom i nekih svetačkih aura u epileptoidnim manifestacijama trovanja, pa nejasne slučajeve beri-beri na Dalekom istoku, kad je iz *pljesnive riže izoliran Pen. citreoviride* i kasnije mikotoksin *citreoviridin*, koji je otkriven za barem jedan dio znakova avitaminoze B1, tada s pravom možemo govoriti da je prva mikotoksikoza ljudi registrovana 1882. u današnjem SSSR i Dalekom istoku: intoksikacija je nastala *uzimanjem defektnog zrnja* žitarica koje je bilo *kontaminirano Fus. graminearum*, a sama bolest, po znakovima oboljenja nazvana *pijani hljeb*. Iako su Voronin i Paljčevski (1888) utvrdili u flori kontaminiranog zrnja fuzarije, tek je 1907. Gabrilovičeva utvrdila *uzročnu povezanost* između zrnja kontaminiranog fuzarijima i samog oboljenja (55).

Sličan slučaj je zadesio SSSR u toku II svjetskog rata: od prezimjelih žitarica, koje su pred ofanzivom Nijemaca ostale na polju i tek u proljeće skinute i upotrebljene za ishranu ljudi i životinja, javilo se oboljenje koje je nazvano *alimentarna toksička aleukija* (ATA) iako je bilo i drugih znakova oboljenja, od septičke angine do areaktivnih nekroza na sluznicama i hemoragičkih dijateza. I u ovom slučaju je od niza prisutnih plijesni sa zrnja Sarkisov izolirao *toksinogene sojeve Fus. tricinctum, reproducirao oboljenje* kontaminiranim supstratom i ekstraktom kulture fuzarija na mački (kao jedinoj pogodnoj životinji za ovo trovanje!), ali sam toksin u čistom obliku dugo se nije mogao dokazati (85). Tek 1960, u toku najmasovnijeg trovanja životinja, posebno purića, postupak utvrđivanja toksičnog agensa bio je cjelovit: kod oboljelih životinja utvrđeno je da je u hrani stalno bio prisutan *»toksički faktor«* iz kikirikijevog brašna uvezenog iz Brazila; iz brašna i kikirikija je *izoliran Asp. flavus, ekstrakcijom* iz brašna od kikirikija *bolest je reproducirana*, a tankoslojnom kromatografijom *dokazan toksin* koji je, po plijesni koja ga stvara, nazvan *A*(sp)*fla*(vus) *toksin, aflatoksin* (AF). Bolest se toksinom može lako reproducirati na najosjetljivijem speciesu, *pačićima*, koji su dugo služili kao *biološki test* za dokaz aflatoksina. Nakon toga je utvrđena toksičnost za druge ptice i životinje, djelovanje na pojedine organe, djelovanje na imuni status, interakcije s drugim toksinima i stanjima u organizmu, kao i s drugim mikroorganizmima (61, 62). Kancerogenost aflatoksina bila je poticaj za opsežna istraživanja o njegovom značenju na određenim područjima u kojima se učestalo opazio i registrovao primarni karcinom jetre (104).

Tabela 1. POZNATIJI MIKOTOKSINI I PLIJESNI KOJE IH STVARAJU

Mikotoksini	Plijesni producenti
Aflatoksin	Asp. flavus, Asp. parasiticus, Asp. oryzae
Altenuene, *alternariol,* altertoksin	Alternaria alternata, A. tenuis (sima)
Aspertoksin	Asp. flavus
Asteltoksin	„ stellatus
Austidiol, austocistin A i D	„ ustus
Averantin, averufin	„ flavus
Aurasperon	„ fumigatus
Citohalazin	Phomopsis leptostromiformis
Citrinin	Pen. aurantiogriseum, Pen. citrinum, „ viridicatum, Asp. aegypticum
Citreoviridin	Pen. citreoviride, Pen. ochrosalmoneum
Curvularin	„ species
Deoxynivalenol (DON)	Fus. roseum, Fus. tricinctum
Ergot alkaloidi	Claviceps purpurea
Fumigaclavin	Asp. fumigatus
Fumitremorgen	„ fumigatus, Asp. fisheri
Fumonisin B 1-B 2	Fus. moniliforme
Fusarin C	„ culmorum, Fus. sambucinum, Fus. oxysporum, Fus. tricinctum, Fus. crookwellense
Fusarenon X	Fus. crookwellense
Fusarochromanon	„ equiseti
Gliotoksin	Asp. fumigatus
Kojična kiselina	„ flavus
Moniliformin	Fus. moniliforme, Fus. oxysporum, Fus. proliferatum, Fus. tricinctum, Fus. nygamai, Fus. reticulatum, Fus. acuminatum
Norsolonična kiselina	Asp. parasiticus
Ohratoksini	Asp. ochraceus, Pen. variabile, Pen. nordicum, Pen. viridicatum, Pen. verrucosum
Penicilinska kiselina	Pen. roquetfortii, Pen. aurantiogriseum, Pen. cyclopium, Pen. viridicatum, Asp. ochraceus
Phomopsin	Pen. rubrum, Pen. purpurogenum
Rubratoksin	
Rugulosin	Pen. rugulosum
Sekalonska kiselina	Pen. oxalicum
Stemfiltoksin	Phomopsis leptostromiformis

ANU BiH АНУ БиХ

Sterigmatocistin	Alternaria alternata Asp. parasiticus, Asp. nidulans, Asp. rugulosum, Asp. versicolor
Tenuazonska kiselina	Alternaria alternata. A. tenuis
Tremorgeni toksini	
Penitrem-tremortin, alfatrem	Pen. cyclopium, Pen. pallitans, Pen. crustosum, Asp. flavus, Pen. granulosum, Pen. verrucosum, Pen. canescens, Pen. clavigerum, Pen. janthinellum
Janthitrem	Pen. janthinellum
Lolitrem	Acremonium sp.
Paxillin	Pen. paxillii
Paspalin, paspalicin, paspalinin, paspalitrem A i B	Claviceps paspali
Territrem	Asp. terreus
Verrucosidin	Pen. verrucoum var. cyclopium
Verruculogen, fumitremorgen	„ verrucullosum, Asp. caespitosus, Pen. paraherquei, Pen. janthinellum, Pen. piscarium, Asp. fumigatus
Tryptoqualin (A i B)	Asp. clavatus, Asp. fumigatus
Trihoteceni	
Trihodermol, roridin, trihodermin dihydrothecen, verrucarol, scipentriol, *T-2 toksin*, scirpenol, monoacetilsolaniol, HT-2 toksin, *nivalenol*, fusarenon X trihoteccin, krotocin, verukarin, *satratoksin*, vertisporin, wortmanin	Fus. tricinctum, Fus. roseum, Fus. scirpi, Fus. nivale, Fus. episphaeria, Fus. equiseti, Fus. exysporum, Fus. culmorum, Trichoderma viride, Trichothecium roseum, Myrothecium verrucaria, Verticimonosporium diffractum, Stachybotrys atra
Viomelein, vioksantin	Pen. cyclopium
Xantomegnin	„ cyclopium, Pen. viridicatum
Zearalenone, zearalanol	Fus. graminearum, Fus. culmorum, Fus. tricinctum, Fus. crookwellense

Potcrtani mikotoksini su utvrđeni u našoj zemlji

Iz tabele 1 se vidi pregled važnijih mikotoksina i plijesni koje ih stvaraju, te se može stvoriti slika kompleksnosti problema do sada utvrđenih mikotoksikoza. Osim aflatoksina, ohratoksina, citrinina, sporidezmina, zearalenona i trihotecena, ostali metaboliti se rijetko sreću kao primarni ili isključivi agens u oboljenjima. Neki djeluju kao sinergisti sa jačim mikotoksinima (rubratoksin s aflatoksinom), a nekad se njihovo djelovanje manifestira kao neodređena stanja disfunkcije

ili slabije proizvodnje iako takve manifestacije mikotoksikoza danas susrećemo i kod prisutnosti manjih količina aflatoksina, ohratoksina i trihotecena, kad nastaju uz slabu proizvodnju (mesa, mlijeka, jaja) i takozvane sekundarne bolesti.

Kako je iz prethodnog vidljivo, metodološki pristup mikotoksikozama je u pravilu vodio od *suspektnog supstrata-hrane*, na kojem i u kojem je kod sumnje na mikotoksikozu trebalo utvrditi nije li *pljesniv* iako nepostojanje pljesnivosti ne isključuje prisutnost mikotoksina (termička obrada supstrata ubija plijesni, ali ne mikotoksine, koji su uglavnom termostabilni). Razumljivo, *mikološka pretraga supstrata* kod sumnje na mikotoksikozu pomaže utvrđivanjem *izolirane plijesni* i dokazom *toksinogenosti izolata* iako ne mora biti svaki izolat toksinogen, i veoma često i nije. Tako je za Asp. flavus utvrđeno da je u prosjeku svega 20% izolata toksinogeno (25), što vrijedi i za druge plijesni. Sasvim je drugačiji pristup pokušajima dokaza toksinogenosti posebnim postupcima i podlogama kad se može dokazati toksinogenost kod daleko većeg broja izolata, nekad i kod svih.

Problem suspektnog kukuruza na aflatoksin u SAD (kukuruz u SAD predstavlja glavni izvor domaćeg aflatoksina) riješili su pretragom zrnja UV svjetiljkom valne duljine 365 nm, te na taj način jednostavnom metodom izdvojili suspektno zrnje: korelacija pozitivne BGY (svijetlo žuto-zelene) fluorescencije i prisutnost aflatoksina kreću se veoma blizu broju pozitivnih uzoraka utvrđenih kemijskim metodama (84). Metoda je primjenljiva kao prethodno testiranje (kod kupovine!) i za druge supstrate u kojima može biti aflatoksina (76, 88). Iako postoji određena korelacija između pozitivne fluoresencije (plava, ljubičasta, žuta, crvena) i plijesni koje invadiraju supstrat, iz naših istraživanja se ne može zaključiti da je metoda primjenljiva za sve mikotoksine u supstratu (57).

Da se u supstratu dokaže prisutnost mikotoksina koriste se mnoge metode: tankoslojna kromatografija, plinska kromatografija, kromatografija u tekućem stupcu kod visokog pritiska, spektroskopija masa, nuklearni magnetski odgovor i zadnjih nekoliko godina imunološke metode, radio imuni test i pokus enzimom povezanih antitijela (TLC, GC, HPLC, Mass Spectroscopy, Nuclear Magnetic Response, RIA, ELISA). Svaka od ovih metoda ima svoje prednosti: neke su jednostavne ali nedovoljno osjetljive, druge traže mnogo vremena i skupih kemikalija, sve nisu jednako osjetljive na razne toksine, posebno kod istovremenog ispitivanja supstrata na više mikotoksina (multitoksične metode), a posebno nisu bile uspješno promjenljive za dokaz mikotoksina u tkivu i drugom biološkom materijalu.

Posljednjih nekoliko godina je intenzivno istraživana primjena ovih metoda za determinaciju i metabolizam pojedinih mikotoksina: aflatoksina (6, 8, 9, 10, 11, 13, 14, 16, 19, 20, 21, 22, 23, 28, 29, 32, 48, 49, 50, 65, 70, 72, 73, 75, 76, 81, 90, 91, 101, 102, 103, 106), ohratoksina (7, 18, 31, 44, 47, 71, 78, 79, 80, 82, 87), trihotecena (31, 46, 69, 100), zearalenona (12, 39, 80).

Tabela 2. METODE ISPITIVANJA I DOKAZIVANJA MIKOTOKSINA

Metode istraživanja Supstrat	
Organoleptički	— pregled na pljesnivost
Fizikalne metode	— UV svjetiljka (BGY pozitivna fluorescencija kod prisutnosti aflatoksina
Mikološke metode	— Determinacija izoliranih plijesni
	— Dokaz toksinogenosti izolata (u kulturi)
Kemijska i druge metode	— Tankoslojna kromatografija — TLC — Plinska kromatografija — GC — Tekuća kromatografija visoke peformanse — HPLC — Spektroskopija masa-Mass Spect — Nuklearni magnetski odgovor — NMR
Supstrati tkiva	
Imunološke metode	— Radioimuni test-RIA
	— ELISA
Biološki pokusi	— Domaće i druge pokusne *životinje kukci, ribe, vodeni kralješnjaci larve* (organotropnost, osjetljivost — rezistencija vrsta, LD 50)
	— *Biljke i sjeme biljaka* (klijavost, patološki efekti na biljkama)
	— *Mikroorganizmi* — bakterije, pijesni, alge, kvasnice — *(inhibicija rasta, citostatičnost, mutagenost)*
	— *Stanice tkiva, kulture organa,* HELA stanice, fibroblasti, epidermis, kultura pluća, bubrega, jetre, linija fibroblasta, kultura traheje, embrio pileta, monociti, leukociti, limfociti, stanice epitela crijeva, hepatociti, stanice Ca mammae, stanice jajnika, stanice bubrega *(mutagenost, patološki efekti).*

Cjelovit prikaz biološkog testiranja mikotoksina dat je na tabeli 2, a rezultat je istraživanja koje je prezentirala Yates (105).

U našoj zemlji je dokazana prisutnost *aflatoksina* u kukuruzu (33, 34, 51, 95), smješama za životinje (26, 51, 97), pšenici, lucerki i sijenu (92, 93), uljanoj repici (51), proizvodima od voća (38, 40) i arašidima (prvi nalaz u našoj zemlji, 33).

Ohratoksin je utvrđen u kukuruzu (24, 33, 51, 67, 93), smješama za životinje (51, 93, 96), pšenici i zobi (51, 67, 93), repi i sojinoj sačmi (67, 93), proizvodima od voća (96), silaži (93) i grahu (24, 67).

Zearalenon je utvrđen u kukuruzu (24, 33, 34, 51, 54, 67, 95), smješama za životinje (34, 51, 95), pšenici (34, 51, 95), grahu (23, 67), a *trihoteceni* u kukuruzu (33, 67, 52). Utvrđen je po prvi put i zearalenol u kukuruzu (74).

Prva dokumentirana mikotoksikoza u nas dokazana je 1970: estrogenizam u svinja uzrokovan prisutnošću zearalenona u kukuruzu u količini od 2, 31—35, 6 ppm (54), a dokazana je i alternariotoksikoza konja (56).

Poznate su *akutne mikotoksikoze* i u suvremeno doba: akutna aflatoksikoza ljudi i životinja u Indiji kad je u više od 200 sela došlo do epidemične pojave ikterusa, ascitesa i portalne hipertenzije (pri obdukciji je utvrđena proliferacija duktusa). Ugibale su i životinje. Lako je bilo dokazati prisutni aflatoksin u pljesnivom kukuruzu i izračunati količinu unešenog aflatoksina preko tog kukuruza (2—6 mg dnevno kroz nekoliko sedmica). Aflatoksin je kod oboljelih i obduciranih utvrđen u jetri, ali ne i u urinu. Nema nikakve sumnje da je aflatoksin bio uzrokom oboljenja djece u ČSSR koja su pila mlijeko pripremljeno od mliječnog praška koji je bio kontaminiran Asp. flavus (15), ali nema još čvrstog dokaza da je aflatoksin uzrokom Reyevog sindroma djece. Iako je u početku bilo više optimizma da je za pojavu veće frekvencije primarnog karcinoma jetre ljudi na određenim područjima odgovoran aflatoksin (1, 104) i u tom smislu izvršenih sistematskih epidemioloških istraživanja ljudi i suspektnih supstrata, ipak novija saznanja ukazuju da bi se moglo raditi o interakciji između aflatoksina, deficita proteina i virusa hepatitisa B. Imunološka istraživanja upravo ukazuju na to da uz dobre metode (RIA, ELISA) i točno praćenje parametara se lakše može utvrditi povezanost između uzročnih faktora, uz kontrolu i ostalih parametara koji mogu utjecati na ishod, kao što je ishrana i način pripremanja hrane (2, 20).

Izvan svake je sumnje da je kod upotrebe trihotecena (DAS, T-2 toksin) koji je bio (vjerojatno) namijenjen uništavanju biljnog svijeta, nastala akutna trihotecenska toksikoza ljudi izloženih toj »žutoj kiši« (45, 99), ali je još sporno da li je Fus. moniliforme odgovoran za karcinom jednjaka u Kini. S pravom Marasas (42) upozorava da se Fus. moniliforme okrivljuje za niz stanja, a da se do danas nije kemijski definiralo što je to moniliformin, koji bi trebao uzrokovati encefalomalciju u konja, u ljudi karcinom jednjaka, u štakora hepatokarcinom i niz toksičkih manifestacija u više životinja. Još postoje suprotnosti i različita mišljenja o toksinima koje stvara Fus. moniliforme: da li je to i šta je moniliformin, uz stvorene trihotecene i zearalenone. Prema tome, mogu postojati dva ili više toksina koji nastaju u kukuruzu invadiranom Fus. monililorme, ali kemijska struktura tog (tih?) toksina nije dokazana. Još je veća pogreška kad se na osnovu trovanja kukuruzom koji je pljesniv, pa čak i bez determinacije uzročne plijesni, trovanje naziva »trovanje pljesnivim kukuruzom« i kasnije pokušava dokazati koji je toksin bio prisutan (42)*.

Slični problemi nastaju kod tremorgenih toksina, koji uzrokuju tremor i ataksiju preživača i dolaze na određenim područjima. U ovim slučajevima su toksini kemijski dokazani, precizno su određeni svi parametri kemijskih i fizikalnih osobina, sojevi plijesni koje ih pro-

* Najnovija istraživanja ukazuju na FUMONIZIN 1 i 2 kao moguće agense karcinoma jednjaka u Kini, leukoencefalomalacije konja i edema mazge i konja (Carvajal, M. et al, MYCOTOXINS a. PHYCOTOXINS, 133—134, 1988).

izvode, ali još uvijek nije dokazano kako neke tremorgene toksikoze nastaju. Dokaz u tlu propagula penicilija koja toksine proizvode u kulturi, pretpostavka ili čak tvrdnja da toksikoze nastaju uzimanjem zemlje (kod suše i nakon duljeg pašnog perioda u kojem su životinje opasle skoro sav nadzemni dio biljke) i da u zemlji ima tremorgenih toksina — nije sasvim uvjerljiv (41), barem ne u svim slučajevima regionalno oštro ograničenih tremorgen toksikoza.

Velik je broj radova posvećen razjašnjavanju hipoteze da je endemska nefropatija (posebno u našoj zemlji) također mikotoksikoza uzrokovana ohratoksinom A. Od početnih izolata penicilija i Asp. ochraceusa sa žitarica više puta u istoj ili nesignifikantno većoj mjeri ili manjoj mjeri na nefropatičnom i anefropatičnom području (56, 66, 67), pa do utvrđivanja ohratoksina u žitaricama i grahu (26, 27, 67, 68) i organima svinja (68) do istraživanja u serumu (18) — opsežna istraživanja za sada još nisu dala odlučan odgovor na postavljenu hipotezu ohratoksičke etiologije endemske nefropatije. U životinja je utvrđena prisutnost ohratoksina u tkivima i bubrezima (43, 68) i patološke promjene u prirodnih slučajeva trovanja (?) u svinja (68), ali ne i one promjene koje u literaturi navode kao rezultat prirodnih i pokusnih trovanja.

Novi problemi nastaju kad se uz osnovno djelovanje mikotoksina pretpostavi ili i utvrdi još i moguće kancerogeno djelovanje, kako je pretpostavljeno za zearalenone. Zearalenone je po djelovanju identičan dietilstilbestrolu (DS). DS je dokazan kao uzrok karcinoma vagine u ženske djece čije su majke dobivale DS, a dokazano je u pokusnih životinja da zearalenone izaziva malignome hipofize. Sumnja se da bi u starijih muškaraca zearalenone mogao izazvati karcinom prostate (4). S obzirom na veoma čestu kontaminaciju kukuruza ovim mikotoksinom i relativnu frekvenciju uzimanja kukuruza u hrani na nekim područjima, ta je hipoteza ispitana u Kanadi: prema istraživanjima načina ishrane Kanađana kukuruzom i male količine prisutnog zearalenona u njemu, povećavajući rizik računski za 500 puta, ipak se nije došlo do zaključka da bi uzimanje takvog kukuruza predstavljalo rizik za Kanađane (36). Ostaje da se ispita još i povezanost između preuranjene pojave pubertetnih znakova u djece u Portoriku (oko 1000 djece) i zearalenona, koji se na tom području nalazi u kukuruzu u znatnim količinama; u serumu djece utvrđen je zearalenone i njegovi derivati.

Očito je da smo izloženi mikotoksinima uz sva nastojanja i struke i nauke da se spriječi zagađenost hrane plijesnima i ne stvore uslovi za stvaranje mikotoksina u supstratu koji služi za ishranu ljudi i životinja. Prisutnost mikotoksina se ne može negirati, pa ih i legislatura uzima u realnost i određuje tolerantne i netolerantne doze koje se smiju naći u hrani (17, 20, 37, 64, 104). Te se količine smanjuju svakim danom što su veća saznanja o načinu djelovanja, posebno u interakciji s raznim stanjima i deficitima ili infekcijama, pa odatle do postavljanja hipoteza o mikotoksičkim etiologijama oboljenja nije dalek korak. Ipak, uz sve metode, nove i stare, zaključak ne smije biti zasnovan samo na dokazu u supstratu ili u tkivu, već i temeljitim interdisciplinarnim istraživanjima.

METHODS OF INVESTIGATION OF MYCOTOXICOSES IN ECOTOXICOLOGY

Summary

The author reviewed the mycotoxicoses in people and animals from the first suspected and/or diagnosed diseases to the newest ones through the description of evolution of the process and methods for the determination and diagnosis. Modern methods for determination of mycotoxins and the complete proceeding from the determination of moldiness of the substrate are cited, through the isolation of causal molds, toxinogenicity of isolates, determinations of their metabolites and their effects on various substrates, determination of LD 50 and other effects on various models in biological tests. Then an epicritical discussion on some diseases still suspected as mycotoxicoses is given, why mycotoxins are not chemically yet determined, neither biological effects proved.

LITERATURA

(1) Alpert, M. E., Hutt, M. S. R., Wogan, G. N., Davidson, C. S.: *Association Between Aflatoxin Content of Food and Hepatoma Frequency in Uganda.* Cancer 28, 253—260, 1971.

(2) Arriola, Maria del Carmen, Porres de, Elizabeth, Cabrera de, Sheryl, Zepeda de, Mirtala, Rolz, C.: *Aflatoxin Fate During Cooking of Corn for Tortilla Preparation.* J. Agric. Food. Chem. 36, 530—533, 1988.

(3) Autrup, H., Essigmann, J. M., Croy, R. G., Trump, B. F., Wogan, G. N., Harris, C. C.: *Metabolism of aflatoxin B_1 and identification of major aflatoxin B_1 adducts formed in cultured human bronchus and colon.* Cancer Res. 39, 694—698, 1969.

(4) Babić, Ljerka, Ožegović, L., Marković, Z., Adilović, S.: *Uticaj zearalenona na histološke promjene u prostati štakora.* ANUBiH LXXXIX, OFN 14, 61—69, 1989.

(5) Buckle, A. E., Coulter, J., Scudamore, K.: *Evaluation of an ELISA Method for Ochratoxin A Analysis of Cereals and Compound Foofstuffs.* In Broc. 5th Meeting Mycotoxins in Animal Human Healt Edinburgh, 1984, 33—45, Moss M. D., Frank M., edit, Guilford U. K., Surrey 1985.

(6) Candlish, A. A. G., Stimson, W. H., Smith, J. E.: *A Monoclonal Antibody to Aflatoxin B_1: Detection of Mycotoxin by Enzyme Immunoassay.* Letters in Appl. Microbiol. 1 (3) 57—61, 1985.

(7) Candlish, A. A. G., Stimson, W. H., Smith, J. E.: *A Monoclonal Antibody to Ochratoxin A.* Letters in Appl. Microbiol. 3 (1) 9—11, 1986.

(8) Candlish, A. A. G., Stimson, E. H., Smith, J. E.: *Detection of aflatoxin B_1 in peanut kernels, peanut butter and maize using monoclonal antibody based enzyme immunoassay.* Food Microbiol. 4 (2) 147—153, 1987.

(9) Candlish, A. A. G., Haynes, C. K., Stimson, W. H.: *Detection and Determination of Aflatoxins Using Affinity Chromatography.* Int. J. Food Science a. Technol. 23 (5) 479—485, 1988.

(10) Chu, F. S., Lee, R. C., Trucksess, M. W., Park, D. L.: *Evaluation by ELISA of Cleanup for TLC of Aflatoxin B_1 in Corn, Peanuts and Peanut Butter.* J. Assoc. Offic. Analyt. Chem. 71 (5) 953—956, 1988.

(11) Denning, D. W., Onwubalili, J. K., Wilkinson, A. P., Morgan, M. R. A.: *Measurement of Aflatoxin in Nigerian Sera by ELISA.* Transaction of Royal Soc. Trop. Med. a. Hygiene 82 (1) 169—171, 1988.

(12) Dixon, S. N., Heitzman, R. J.: *The Development of Immunoassays for Residues of the Anabolic Agent Zeranol and the Mycotoxin Zearalenone in the Tissues of Farm Animals. In* Proc. 5th Meeting on Mycotoxins in Animal a. Human Health, Edinburg 1984, Ed. Moss M. O. Frank M., Univ. Surrey, 53—61, 1985.

(13) Dixon-Hollan, D. E., Pestka, J. J., Bidigare, B. A., Casale, W. L., Warner, R. L., Ram, B. P., Hart, L. P.: *Production of Sensitive Monoclonal Antibodies to Aflatoxin B_1 and Aflatoxin M_1 and Their Application to ELISA of Naturally Contaminated Foods.* J. Food Protection 51 (3) 201—204, 1988.

(14) Dragsted, L. C., Bull, I., Autrup, H.: *Substances with Affinity to a Monoclonal Aflatoxin B_1 Antibody in Danish Urine Samples.* Food a. Chemical Toxicol. 26 (3) 233—242, 1988.

(15) Dvorackova, J., Kusak, V., Vesely, D., Vesela, J., Nesnidal, P.: *Aflatoxin and Encephalopathy.* Annales de la Nutrition et de lÄlimentation, 31 (4-5-6) 977—989, 1977.

(16) Fan, T. S. L., Chu, F. S.: *Indirect Enzyme Linked Immunosorbent Assay for Detection of Aflatoxin B_1 in Corn and Peanut Butter.* J. Food Protect. 47 (4) 263—266, 1984.

(17) Fishbach, H., Rodricks, J. V.: *Current Efforts of the Food and Drug Administration in Control oy Mycotoxins in Food.* J. Assoc. Offic. Anal. Chem. 56, 767—770, 1973.

(18) Fuchs, R., Habazin-Novak, Vlasta, Radić, Božica, Perica, Maja, Pleština, R.: *Distribution of Ochratoxin A in Animals.* ANUBiH LXXX, OMN 12, 89—92, 1986.

(19) Fukal, L.: *Use of Commercial RIA Kit for Detection Aflatoxin M_1 Contamination of Milk.* Prùmysl. Potravin 39 (4) 196—198, 1988.

(20) Garner, C., Ryder, R., Montesano, R.: *Monitoring of Aflatoxins in Human Body Fluids and Application to Field Studies.* Cancer Res. 45, 922—928, 1985.

(21) Groopman, J. D., Donahue, K. F.: *Aflatoxin, a Human Carcinogen: Determination in Foods and Biological Samples by Monoclonal Antibody Chromatography.* J. Anal. Offic. Chem. 71 (5) 861—867, 1988.

(22) Grosmann, V., Jarkovska, I., Vodeničarov, N.: *On the Problem of Determining Aflatoxin B_1 in Biological Fluids by the RIA Method.* Biologizace a. Chemizace živočišne Vyroby-Veterinaria 22 (6) 553—560, 1986.

(23) Hastings, K. L., Tulis, J. J., Dean, J. H.: *Production and Characterization of a Monoclonal Antibody to Aflatoxin B_2.* J. Agric. Food Chem. 36 (2) 404—408, 1988.

(24) Hlubna, D.: *Istraživanja aflatoksina, zearalenona i ohratoksina A na žitaricama i grahu u području endemske nefropatije u Semberiji.* ANUBiH, LX, OMN 10, 81—86, 1982.

(25) Hlubna, D.: *Istraživanje nekih medijuma za dokaz toksogenih sojeva Asp. flavus.* ANUBiH, LX, OMN 10, 147—149, 1982.

(26) Hlubna, D., Ožegović, L.: *Rezultati istraživanja mikotoksina (aflatoksina, B_1, ohratoksina A i zearalenona) u Bosni i Hercegovini.* ANUBiH LXXX, OMN 12, 65—69, 1986.

(27) Hlubna, D., Ožegović, L.: *Dinamika kontaminacije graha ohratoksinom A na području endemske nefropatije u SRBiH.* ANUBiH LXXXIX, OMN 14, 181—183, 1989.

(28) Hu, W. J., Moychik, N., Chu, F. S.: *Elisa of Picogram Quantities of Aflatoxin M_1 in Urine and Milk.* J. Food Protect. 47 (2) 126—127, 1984.

(29) Hsieh, L. L., Hsu, S. W., Chen, D. S., Santella, R. M.: *Immunological Detection of Aflatoxin M_1 — DNA Adducts Formed in Vivo.* Cancer Res. 48 (22) 6328—6331, 1988.

(30) Irvin, T. R.: *Development of DNA Adduct Technology to Monitor Human Exposure to Cancer-Causing Mycotoxins. In Aflatoxin in Maize.* A proceedings of the workshop, 1 Batan, Mexico, April 7—11, Ed. Zuber M. S., Lilehoj E. B., Renfro B. L., 1987.

(31) Itoh, Y., Nishimura, M., Hifumi, E., Uda, T., Ohtani, K., Kawamura, O., Nagayma, S., Ueno, Y.: *Detection of Ochratoxin A and T-2 toxin by Pne Step ELISA.* Proc. Jap. Assoc. Mycoroxiclogy, No. 24, 25—29, 1986.

(32) Itoh, Y., Hifumi, E., Sudoh, K., Uda, T., Ohtani, K., Kawamura, O., Nagayama, S., Satoh, S., Ueno, Y.: *Detection of Aflatoxin B_1 by Direct ELISA.* Proc. Jap. Assoc. Mycotoxicol. No. 26, 31—35, 1987.

(33) Klemenc, N., Zust, J., Venaut, A., Vospernik, P.: *Etiologija mikotoksikoza kod domaćih životinja u Sloveniji.* ANUBiH LXXX, OMN 12, 43—50, 1986.

(34) Kordić, Branislava, Panin, Milica, Kančić, Slavka, Lončarević, A., Muntanola-Cvetković, Maria: *Rezultati višegodišnjeg mikrobiološkog i mikotoksikološkog istraživanja stočne hrane u SR Srbiji.* ANUBiH LXXX, OMN 12, 17—28, 1986.

(35) Kuiper-Goodman, T., Scott, P. M., Watanabe, H.: *Risk Assesment of the Mycotoxin Zearalenone.* Regulatory Toxicology a. Tharmacology 7, 253—306, 1987.

(36) Krishnamachari, K. A. V. R., Remesh, V., Bhat, V. Nagarajan, V., Tilak, T. B. G.: *Investigations Into an Outbreak of Hepatitis in Parts of Western India.* Indian J. Med. R s. 63, 7, 1036—1048, 1975.

(37) Labuzza, T. P.: *Regulation of Mycotoxins in Food.* J. Food Protect. Protect. 46, 3, 260—265, 1983.

(38) Lazić-Savić, Nada, Šutić, Marija: *Izvori kontaminacije proizvoda od voća vrstama Asp. flavus i aflatoksinom.* ANUBiH LXXXIX, OMN 14, 131—140, 1989.

(39) Iu, M. T., Ram, B. P., Hart, M. P., Pestka, J. J.: *Indirect Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for the Mycotoxin Zearalenone* Appl. Eny. Microbiol. 50 (2), 332—336, 1985.

(40) Ljubojević, Anastazija, Šutić, Marija: *Aflatoksini kao kontaminanti nekih proizvoda od povrća.* ANUBiH LXXXIX, OMN 14, 141—152, 1989.

(41) Mantle, P. G., Penny, R. N. C.: *Tremorgenic Mycotoxins and Neurological Disorders — A Review.* Vet. Annual 21, 51—62, 1981.

(42) Marasas, W. F. O; *Fusarium Moniliforme: A Mycotoxicological Myasma.* U: P. S. Steyn i Vleggaar, Editors, Mycotoxins and Phytotoxins, 19—28, Elsevier Sc. Pub. Amsterdam 1985.

(43) Mašić, Z., Rajić, I., Škrinjar, Marija, Pavkov, S., Gagrčin, M.: *Rezultati pregleda mesa i iznutrica svinja na prisustvo rezidua ohratoksina A u jednoj industrijskoj klaonici u SAP Vojvodini.* ANUBiH LXXXIX, OMN 14, 215—218, 1989.

(44) Martlbauer, E., Terplan, G.: *Ein enzymimunologissches Verfahren zum Nachweiss von Ochratoxin A in Schweineserum.* Archiv Lebensmittelhygiene 39 (6) 143—147, 1988.

(45) Mirocha, C. J., Pawlosky, R. A., Chatterjee, K., Watson, Sharon, Hayes, W.: *Analysis for Fusarium Toxins in Various Samples Implicated in Biological Warfare in South East Asia* J. Assoc. Offic. Anal. Chem. 66, 6, 1485—1499, 1983.

(46) Mirocha, C. J., Pawlosky, R. J., Hewetson, D. W.: *Gas Chromatography Mass Spectral Analysis of Trichothecenes,* 305—322, 1986. U: Richard J. L., Thurston J. R. (Edit.): Diagnosis of mycotoxicoses, Martnus Nijhof Pub. 1986.

(47) Morgan, M. R. A., Mc Nerney, R., Chan, H. W. S., Anderson, P. H.: *Ochratoxin A in Pig Kidney Determined by ELISA.* J. Sci. Food a. Agric. 37 (5) 465—480, 1986.

(48) Morgan, M. R. A., Kang, A. S., Chan, H. W. S.: *Aflatoxin Determination in Peanut Butter by ELISA.* J. Sci. Food a. Agric. 37 (9) 908—914, 1986.

(49) Mortimer, D. N., Shepherd, M. J., Gilbert, J., Clark, C.: *Elisa Determination of Aflatoxin B_1 in Peanut Butter: Collaborative Trial.* Food Additives a. Contaminants 5 (4) 601—608, 1988.

(50) Mortimer, D. N., Shepherd, M. J., Gilbert, J., Morgan, M. R. A.: *A Survey of the Occurrence of Aflatoxin B_1 in Peanut Butter by ELISA.* Food Additives a. Contaminants 5 (2) 127—132, 1988.

(51) Nemanič, Ankica, Brlek, Vlasta, Ramljak, Danica, Matešić, Dubravka: *Nalazi mikotoksina u krmivima i krmnim smjesama za ishranu peradi i drugih domaćih životinja.* ANUBiH LXXX, OMN 12, 51—64.

(52) Nemanič, Ankica, Brlek, Vlasta: *Odnos gljivica Fusarium na nalaz nekih trikotocenskih toksina u sirovinama i smjesama za perad.* ANUBiH LXXXIX, OMN 14, 55—60, 1989.

(53) O'Brien, Kym, Moss, Elizabeth, Judah, D., Neal, G.: *Metabolic Basis of the Species Difference to Aflatoxin B_1 Induced Nepatotoxicity.* Biochem. Biophys. Res. Communicat ion 114, 2, 813—821, 1983.

(54) Ožegović, L.: *Trovanje svinja pljesnivim kukuruzom. F-2 (zearalenon) toksikoza.* Veterinaria 19, 4, 525—531, 1970.

(55) Ožegović, L.: *Mikoze i mikotoksikoze životinja.* Univerzitet Sarajevo, 1971.

(56) Ožegović, L., Džuvić, A., Matuka, Olga: Toksički efekti sojeva Alternariae tenuis izoliranih iz pljesnive zobi. ANUBiH, Knj. 20, 87—92, 1977.

(57) Ožegović, L., Hlubna, D.: *Plijesni i njihovi toksini na hrani ljudi i životinja.* IV — Fluorescencija uzoraka. Veterinaria 26, 2—3, 189—194, 1977.

(58) Ožegović, L.: *Mikoflora kukuruza, pšenice i graha u području endemske nefropatije u Bosni i Hercegovini.* ANUBiH, Knj. LX, OMN 10, 55—61, 1982.

(59) Ožegović, L., Hlubna, D.: *Mikotoksini u ishrani svinja.* Zbornik Radova, Vet. Institut Novi Sad, IV, V i VI, 33—48, 1979—1981.

(60) Ožegović, L., Hlubna, D.: *Molds and Ochratoxin A in Regions of* Aliments + Nutrition 1, 123—125, 1983.

(61) Ožegović, L.: *Mikotoksikoze peradi,* Veterinaria 32, 4, 393—411 1983; *Endemic Nephropathy in SR Bosnia and Herzegovina.* Microbiologie — 34, 3—4, 505—520, 1985; 35, 1, 123—129, 1986.

(62) Ožegović, L.: *Mikotoksikoze preživača.* Veterinaria 38, 3—4, 455—486, 1989.

(63) Pain, S.: *DIY Kit Weeds out Food Toxins.* New Scientist 113, 1543, 31, 1987.

(64) Park, D. L., Pohland, A. E.: *A Rationale for the Control of Aflatoxin in Animal Feeds.* U: Mycotoxins and Phytotoxins (Ed. Steyn P. S. and Vleggaar R.) 475—481, Elsevier Pub, 1986.

(65) Pawlosky, R. J., Mirocha, C. J.: *Principles Involved in the Analysis of Aflatoxin B_1 by Gas Chromatography/Hass Spectrometry.* U: Diagnosis of Mycotoxicoses (Ed. Richard J. L., Thurston J. R.), 293—304, M. Nijhol Pub. 1986.

(66) Pepeljnjak, S., Balzer, I.: *Pregled mikoloških i mikotoksikoloških istraživanja sa nefropatičnog i anefropatinčog područja Hrvatske.* ANUBiH LX, OMN 10, 75—80, 1982.

(67) Pepeljnjak, S., Cvetnić, Zdenka: *Mikološka i mikotoksikološka kontaminacija žitarica na širem anefopatičnom području SR Hrvatske.* ANUBiH LXXX, OMN 12, 29—42, 1986.

(68) Pepeljnjak, S., Čuljak, K.: *Nalaz rezidua ohratoksina A u organima svinja na širem anefropatićnom području SR Hrvatske.* ANUBiH LXXX, OMN 12, 71—76, 1986.

(69) Pohland, A. E., Thorpe, C. W., Trucksess, M. W., Eppley, R. M.: *TLC and HPLC Methods for Analysis of Trichothecens in Commodities.* U: Diagnosis of Mycotoxicoses (Ed. Richard J. L., Thurston J. R., 271—282, M. Nijhof Pub, 1986.

(70) Qian, G. S., Yasei, P., Yang, G. C.: *Rapid Extraction and Detection of Aflatoxin M_1 in Cow s Milk by High-Performance Liquid Chromatography and Radioimmunoassay.* Analyt. Chem. 56 (12) 2079—2080, 1984.

(71) Radić, Božica, Habazin-Novak, Vlasta, Fuchs, R., Peraica, Maja, Pleština, R.: *Analiza okratoksina A-primjer na njegovog određivanja u hrani i humanom serumu.* ANUBiH LXXX, OMN 12, 97—100, 1986.

(72) Ram, B. P., Hart, L. P., Shotwell, O. L., Pestka, J. J.: *Enzyme Linked Immunosorbet Assay of Aflatoxin B_1 in Naturrally Contaminated Corn and Cottonseed.* J. Assoc. Offic. Analy. Chem. 60 (5) 904—907, 1986.

(73) Ram, B. P., Hart, D. P., Pestka, J. J.: *Apllication of ELISA to Retail Survey of Aflatoxin B_1 in Peanut Butter.* J. Food Protect. 49 (10) 792—795, 1986.

(74) Ramljak, Danica, Mateši, Dubravka, Vremović, Marija: *Trovanje svinja zearalenolom u Jugoslaviji.* ANUBiH LXXX, OMN 10, 195, 1986.

(75) Rauch, P., Fukal, L., Brezina, P., Kaš, J.: *Interference in Radioimmunoassay of Aflatoxine in Food and Fodder Samples of plant origin.* J. Assoc. Offic. Anal. Chem 71 (3) 491—493, 1988.

(76) Reichert, N., Steimeyer, S., Weber, R.: *Bestimmung von Aflatoxin B_1 in Trockenfeigen durch visuelle Screning,* Dünnschichtchromatographie und ELISA. Zeitschr. Lebensmitt. Untersuchung u. Forschung 186 (6) 505—508, 1988.

(77) Rousseau, D. M., Slegers, G. A., Peteghem, C. H. van: *Solid-phase Radioimnunoassay of Ochratoxin A in Serum.* J. Agric. a. Food Chem. 34 (5) 862—865, 1986.

(78) Rousseau, D. M., Candlish, A. A. G., Slegers, G. A. Peteghem, C. H. van, Stimson, W. H., Smith, J. E.: *Detection of Ochratoxin A in Porcine Kidney by Monoclonal Antilody-Based Radio-Immunoassay.* Appl. Envirom. Microbiol. 53 (3) 514—518, 1987.

(79) Ruprich, J., Vereš, K., Schmiedova, D.: *Radioimmunoassay of the Mycotoxin Ochratoxin A: a New Diagnostic Method in Czekoslowakia.* Veterinarni Medicina 33 (2) 101—108, 1988.

(80) Ross, P. F.: *Mass Spectroscopy of Mycotoxins Other than Aflatoxins or Trichothecenes.* U: Diagnosis of Mycotoxicoses (Richard J. L., Thurston J. R., Edit.), 323—332, M. Nijhoff Pub, 1986.

(81) Rottinghaus, G. E.: *A Review of TLC and HPLC Methods for Analysis of Aflatoxins in Commodities.* U: Diagnosis of Mycotoxicoses (Richard J. L., Thurston J. R. Edit.) 239—256 M. Nijhoff Pub, 1986.

(82) Sato, O., Nagayama, S., Kawamura, O., Ueno, Y.: *Detection of Ochratoxin A in Meat, Wheat and Plasma by ELISA.* Proc. Jap. Assoc. Mycotoxicology No. 26, 47—49, 1987.

(83) Scott, P. M.: *Detection of Mycotoxins in food,* Development in Food Microbiology 4, 47—76, Elsevier Applied Sci., 1988.

(84) Shotwell, Odette, Goulden, M. L., Hesseltine, C. W.: *Aflatoxin Distribution in Contaminated Corn.* Cereal Chem. 51, 4, 492—499, 1974.

(85) Spesivceva, N. A.: *Mikozi i mikotoksikozi.* Kolos, Moskva 1964.

(86) Wilson, B. J., Maroport, R. R.: *Causative Fungal Agent of Leukoencephalomalacia in Equine Animals.* Vet. Res. 88, 484, 1971.

(87) Stahr, H. M., Martin, P., Hyde, W., Domoto, M.: *Chromatography of Mycotoxins of Diagnostic Significance Other than Trichothecenes and Aflatoxins.* U: Diagnosis of Mycotoxicoses (Richard J. L., Thurston J. R., Edit.), 283—298, M. Nijhoff Pub, 1986.

(88) Steiner, W. E., Rieker, R. H., Battaglia, R.: *Aflatoxin Contamination in Dried Figs: Distribution and Association with Fluorescence.* J. Agric. Food Chem 36, 88—91, 1988.

(89) Steyn, P. S., Vleggaar, R.: *Tremorgenic Mycotoxins,* Progress in the Chemistry of Organic Natural Products, 48, 1—80, Springer 1985.

(90) Stubblefield, R. D.: *Thin-Layer and High Performance Chromatographic Methods for Analysis of Aflatoxins in Animal Tissues and Fluids.* U: Diagnosis of Mycotoxicoses (Richard J. L., Turston J. R. edit.) 257—270, M. Nijhoff, 1986.

(91) Sun, Z., Zazhi, Z. Z.: *Monoclonal Antibody Against Aflatoxin B_1 and its Potential Applications.* Chinese J. Oncology 5 (6) 401—405, 1983.

(92) Škrinjar, Marija, Vujičić, I., Stubbefield, R., Jurić, Verica, Mašić, Z.: *Zastupljenost aflatoksina B_1 u stočnoj hrani u Vojvodini.* ANUBiH LXXXIX, OMN 14, 119—130, 1989.

(93) Škrinjar, Marija, Vujičić, P., Stubblefield, R., Jurić, Verica, Stojanović, Emilija, Mašić, Z.: *Kontaminacija hraniva ohratoksinom A u Vojvodini.* ANUBiH LXXXIX, OMN 14, 171—180, 1989.

(94) Šoštarić, B., Radić, Božica, Pavličck, A., Peraica, Maja, Fuchs, R.: *Mikotoksinska nefropatija svinja u intenzivnom uzgoju.* ANUBiH LXXXIX, OMN 14, 161—170, 1989.

(95) Šutić, Marija, Pantović, Danica, Kordić, Branka, Matić, Stojanka, Lješević, Olga, Svilar, Nada: *Aflatoksini u hrani i hranivima,* ANUBiH LX, OMN 10, 6—74, 1982.

(96) Šutić, Marija, Svilar, Nada, Ivanović, Dana, Tosman, Natalija, Oljačić, Emilija: *Plesni i mikotoksini na hranivima za goveda.* ANUBiH LXXXIX, OMN 14, 109—118, 1989.

(97) Šutić, Marija, Svilar, Nada, Ivanović, Dana, Oljačić, Emilija, Tosman, Natalija: *Nalaz mikotoksina u konditorskim proizvodima i hlebu.* ANUBiH LXXXIX, OMN 14, 103—108, 1989.

(98) Ueno, Y.: *The Toxicology fo Mycotoxins,* CRC — Critical Reviews in Toxicology 14, 2, 99—113, 1988.

(99) Watson, Sharon, Mirocha, C. J., Hayes, A. W.: *Analysis for Trichotecens in Samples from South East Asia Associated with »Yellow Rain«.* Fund. Appl. Toxicol. 4, 700—717, 1984.

(100) Wei, R. D., Chu, F. S.: *Production and Characterization of a Generic Antibody Against a Group of A Trichothecenes.* Analyt. Biochem. 160 (2) 399—408, 1987.

(101) Wild, C. P., Pionneau, F. A., Montesano, R., Mutiro, C. F., Chetsanga, C. J.: *Aflatoxin Detected in Human Breast Milk by Immunoassay.* Int. J. Nacer 40 (3) 328—333, 1987.

(102) Wilkinson, A. P., Denning, D. W., Morgan, M. R. A.: *Analysis of UK Sera for Aflatoxin by ELISA.* Human Toxicology 7 (4) 353—356, 1988.

(103) Wilkinson, A. P., Denning, D. W., Morgan, M. R. A.: *An ELISA Method for the Rapid and Simple Determination of Aflatoxin in Human Serum.* Food Addit. a. Contam. 5 (4) 609—619, 1988.

(104) Wogan, G. N.: *Aflatoxin Risk and Control Measures.* Federation Proc. 27, 3, 932—938, 1968.

(105) Yates, Ida E.: *Bioassay Systems and Their Use in the Diagnosis of Mycotoxicoses.* U: Diagnosis of Mycotoxicoses (Richard J. D., Thurston J. R. edit.) 333—380, M. Nijhoff, 1986.

(106) Zhang, G., Chu, F. S.: *Production and Characterization of Antibodies Cross-Reactive with Major Aflatoxins.* Experientia 45 (2) 182—184, 1989.

ISTRAŽIVANJE DJELOVANJA TEŠKIH METALA NA MEMBRANSKI I AKCIONI POTENCIJAL

MARIJA KESER-STANKOVIC
Institut za patološku fiziologiju Medicinskog fakulteta, Sarajevo

UDC 616 : 612.014.2

Apstrakt. Savremenom tehnikom intracelularne registracije membranskog potencijala glatkih mišićnih ćelija i metodom elektrostimulacije i osciolografske analize četiri osnovna parametra združenog akcionog potencijala istraživani su i komparirani toksični efekti iona mangana, kadmija, olova i žive na ove strukture. Nađeno je da manganovi ioni u finalnim koncentracijama od 10^{-5} do 10^{-3} M u startu izazivaju pad membranskog potencijala na 72% startne vrijednosti. Međutim, nakon dvije minute aplikacije manganovih iona, potencijal mirovanja se progresivno regeneriše do polaznih vrijednosti. U akalcičnom mediju u prisustvu manganovih iona vrijednosti membranskog potencijala padaju na 65% startnih vrijednosti da bi od druge minute počeo progresivno da se regeneriše i u desetoj minuti eksperimenta vrijednosti potencijala mirovanja su bile 36% iznad startnih vrijednosti. Dodati kalcijumovi ioni uslovljavaju dalju hiperpolarizaciju, koja se kreće i do 57% iznad polaznih vrijednosti. Kadmijumovi ioni dodati u finalnim koncentracijama od 10^{-5} do 10^{-3} M uzrokuju blagu hiperpolarizaciju. U akalcičnom mediju uzrokuju ireverzibilno opadanje membranskog potencijala na 56% startne vrijednosti bez tendencije za regeneraciju potencijala mirovanja. Olovni ioni dodati u finalnim koncentracijama od 10^{-5} — 10^{-3} M uzrokuju ireverzibilni pad membranskog potencijala na 64% startnih vrijednosti. Toksični efekti živinih iona na ekscitabilne membrane izolovanog nervusa ischiadicus žabe ispoljili su se u snažnoj reverzibilnoj depresiji amplitude akcionog potencijala, produženju latence i prolongiranog praga razdraženja.

Ključne riječi: teški metali, membranski potencijal, akcioni potencijal.

UVOD

Hemijske reakcije iona teških metala sa enzimima ćelijskih membrana mogu izazvati različite štetne efekte kao inhibiciju aktivnosti enzima na površini membrane, inhibiciju transportnog sistema u membrani koji obezbjeđuju pojačanu difuziju i naročito aktivni transport supstanci kroz membranu u ćeliju (elektroliti, šećer, aminokiseline), smanjenje ili povećanje permeabilnosti membrane, promjene bioelektričnog potencijala na membrani i druge efekte (Rothenstein, A., 1959). Rezultati istraživanja elevacije koncentracije iona kalija i kalcija u vanjskom mediju ukazuju da ioni kalija progresivno depolarišu mem-

brane glatkih mišićnih stanica. Dodatak olovnih iona nije modificirao kalijum deplarizaciju potencijala mirovanja glatkih mišićnih ćelija. Međutim, ioni kalcijuma ispoljili su izrazitu stabilizirajuću ulogu na membrani glatkih mišićnih ćelija (Salanki et al., 1984, Keser-Stanković et al., 1976). Manganovi ioni, zavisno od koncentracije u interakciji sa jonskim strujama na membrani glatkih mišića uretera, ireverzibilno blokiraju akcioni potencijal ako su koncentracije velike. U manjim koncentracijama indukuju lagani porast amplitude akcionog potencijala. U fiziološkom rastvoru manganovih ioni u koncentraciji od 2 mM ne uzrokuju promjene u potencijalu mirovanja i otporu membrane glatkog mišića uretera (Bury and Shuba, 1976). Istraživanja toksičnih efekata kadmijumovih, živinih i manganovih iona na neuromišićnoj transmisiji vegetativnih organa (Keser-Stanković et al., 1983, 1984) ukazala su da živini ioni povećavaju efekat holinergične, adrenergične i somatske nervne stimulacije vegetativnih organa, dok manganovi ioni uzrokuju smanjenje efekta nervne stimulacije izolovanog mokraćnog mjehura i duktus deferensa, a povećavaju efekat nervne stimulacije izolovanog želuca. Analiza rezultata ukazuje da su kadmijumovi ioni izraziti inhibitori neuromišićne transmisije ispitivanih organa. Bilo je od interesa ispitati efekte iona teških metala u interakciji sa membranskim potencijalom na membranama glatkih mišićnih ćelija i parametrima združenog akcionog potencijala.

MATERIJAL I METODE

U eksperimentu korišćen je dio intaktnog ileuma dužine 3 cm. Izolovani ileum uronjen je u 20 ml Tyrodeovog rastvora, premošten i učtvršćen preko mostića pluta iznad izvora svetlosti u polju stereomikroskopa u kome je posuda sa izolovanim organom stavljena na pokretni stolić. Sistem za mjerenje membranskog potencijala uključuje staklenu mikroelektrodu ispunjenu sa 3 m KCl sa prečnikom vrha ispod 0,5 mikrona, otporom 10—20 M. Ohma. Elektroda je preko DC pojačala vezana za katodni osciloskop, a preparat je uzemljen Ag/AgCl elektrodom uronjenom u rastvor.

Postupak mjerenja membranskog potencijala obuhvata testiranje potencijala vrha elektrode u rastvoru i dovođenje instrumenta na nultu liniju. Prije vršenja mjerenja membranskog potencijala glatke mišićne ćelije, utvrđeno je da ispitivani ioni teških metala ne izazivaju varijaciju u nultom položaju uređaja za mjerenje.

Membranski potencijal je mjeren uvođenjem mikroelektrode pomoću hidrauličkog sistema za mikromanipulaciju na Brinkmanovom postolju uz vizuelnu kontrolu položaja vrha elektrode. Očitavanje membranskog potencijala vršeno je registrovanjem elektronegativnosti, defleksijom elektronskog mlaza u odnosu na nultnu liniju, uz korekciju za faktor pojačanja (DC). Registracija membranskog potencijala vršena je svake minute u toku 5 minuta, s tim da je u prvoj minuti vršeno mjerenje svakih 15 sekundi. Eksperimentalni period iznosio je ukupno do 20 minuta. U toku prvih 5 minuta vršena su mjerenja membranskog

potencijala u fiziološkom rastvoru, a zatim je apliciran noradrenalin u finalnoj koncentraciji 10^{-6} M. Aplikacija noradrenalina nije mijenjala vrijednosti membranskog potencijala, ali je inhibirala peristaltičke pokrete ileuma i obezbjedila nesmetano mjerenje membranskog potencijala.

U 10. minuti eksperimenta aplicirani su ioni mangana, kadmijuma u standardnom rastvoru sa i bez kalcijumovih iona i olovni ioni u standardnom rastvoru u finalnim koncentracijama od 10^{-5}—10^{-3} M i registrovani njihovi efekti na poteencijal mirovanja. Ispitivanja efekata živinih iona izvršena su na izoliranim n. ischiadious žabe, koji su nakon preparacije inkubirani u Ringerovom rastvoru. Metodom ekstracelularne registracije akcionog potencijala, korištenjem elektrostimulacije i oscilografske analize parametara akcionog potencijala izvršena su mjerenja u nekoliko serija. Prva mjerenja (u nultom vremenu) vršena su u svim serijama u Ringerovom rastvoru, a nakon toga nervi su stavljeni u pripremljeni rastvor sa živinim ionima u koncentraciji $5x10^{-3}$ M sa po 8 nerava. Uzimaju se podaci za cijelu seriju nerava, a postupak se ponavlja nakon 15, 30, 45 i 60 minuta.

Uređaj za mjerenje sastoji se iz stimulatora (Generator Tektronix Type 161 and 162) koji je izvor kvadratičnih impulsa definisanog intenziteta, trajanja i frekvence. Sa izvora stimulatora, preko translatora, veza ide na elektrode za stimulaciju, preko kojih prebačeni nerv prima podražaje. Drugi par su elektrode koje služe za registraciju, a one su spojene za osciloskop.

Inkubirani nervi prebacuju se preko elektroda, nađe se pražni intenzitet stimulusa, a potom pri maksimalnom intenzitetu stimulusa na osciloskopu se očitavaju parametri akcionog potencijala.

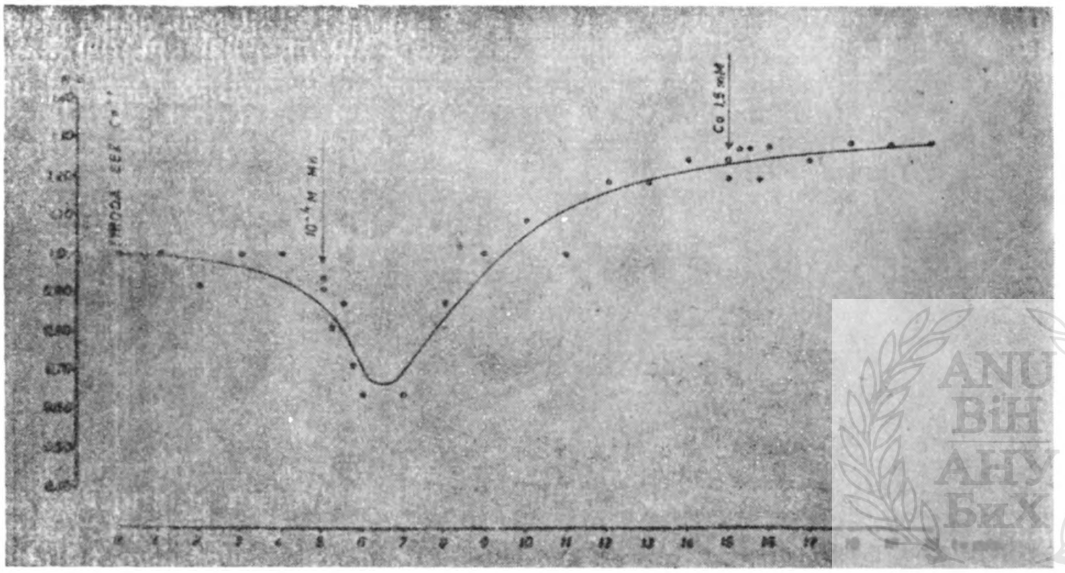
REZULTATI

Rezultati su prikazani grafički u vidu relativnih vrijednosti potencijala mirovanja. Membranski potencijal mjeren u toku pet minuta u fiziološkom rastvoru u svim serijama eksperimenta iznosio je od 39 do 40,2 mV.

Dodati Mn^{2+} ioni u finalnim koncentracijama 10^{-5} M u startu izazivaju neznatan pad potencijala mirovanja, ali nakon 15 sekundi membranski potencijal pada na 92% startne vrijednosti, u 30-toj sekundi na 83%, u 45-toj na 74% i na kraju prve minute aplikacije Mn^{2+} iona vrijednosti potencijala mirovanja iznosile su 72% startne vrijednosti. Međutim, u drugoj minuti aplikacije Mn^{2+} iona membranski potencijal počinje da se progresivno regeneriše i na kraju osme minute nakon aplikacije Mn^{2+} iona potencijal mirovanja se u potpunosti regenerisao. Dodati Ca^{2+} ioni u koncentraciji od 1,5 mM dovode do hiperpolarizacije do 10% iznad početne vrijednosti.

Membranski potencijal pod uticajem Mn^{2+} iona u finalnoj koncentraciji 10^{-4} M u akalcičnom mediju pada u startu na 90% polaznih vrijednosti. Nakon 15 sekundi vrijednosti iznose 88%, u 30-toj sekundi

76% i na kraju prve minute vrijednosti potencijala mirovanja su 65% od startne vrijednosti. U drugoj minuti aplikacije Mn^{2+} iona dolazi do regeneracije potencijala koji se do četvrte minute nakon aplikacije Mn^{2+} regeneriše na startne vrijednosti. U toku daljeg eksperimenta dolazi do postepene hiperpolarizacije, tako da su u 10. minuti nakon aplikacije Mn^{2+} iona vrijednosti membranskog potencijala 36% iznad polaznih vrijednosti. Dodati Ca^{2+} ioni u koncentraciji od 1,5 mM dovode do dalje hiperpolarizacije koja se kreće i do 57% iznad polaznih vrijednosti.



Slika 1. Efekti iona mangana na membranski potencijal u Thyrodeovom rastvoru bez kalcija

Cd^{++} ioni dodati u finalnim koncentracijama od 10^{-5} — 10^{-3} M u normalni rastvor uzrokuju hiperpolarizaciju do 2%. U toku 15, 30 i 45 sekundi nakon aplikacije Cd^{++} potencijal mirovanja zadržava iste vrijednosti, ali nakon prve minute aplikacije Cd^{++} potencijal mirovanja se vraća na polazne vrijednosti i do kraja 15-te minute mjerenja vrijednosti potencijala mirovanja su na nivou kontrolnih vrijednosti.

U akalcičnom mediju vrijednosti potencijala mirovanja iznosile su 35,2 do 36 mV. Dodati Cd^{2+} u finalnim koncentracijama 10^{-5} M + 10^{-3} M uzrokuju pad potencijala mirovanja u startu na 83% kontrolnih vrijednosti. U 45. sekundi vrijednosti su iznosile 70% i na kraju prve minute aplikacije Cd^{2+} 69% startnih vrijednosti. Dalja mjerenja ukazuju na dalji pad potencijala mirovanja i u 10. minuti aplikacije Cd^{++} iznosio je 56% startne vrijednosti.

Membranski potencijal u prisustvu olovnih iona u finalnim koncentracijama od 10^{-5} — 10^{-3} M opada na 64% startne vrijednosti. Ovaj

deprimirajući efekat na potencijal mirovanja je ireverzibilan, jer u toku pet minuta nakon aplikacije olovnih iona nisu se ispoljili znaci regeneracije potencijala mirovanja.

Vrijednosti združenih parametara akcionog potencijala kontrolne grupe mjereni u fiziološkoj otopini prikazani su u tabeli 1.

Tabela 1. SREDNJE VRIJEDNOSTI AKCIONOG POTENCIJALA KONTROLNE GRUPE

vrijeme min.	Prag nadražaja (V)	AP Amplituda (mV)	AP Latenca (μ sec.)	AP Tranjanje (μ sec.)
0	0.43	19.5	386	714
0	0.40	16.5	400	707
15	0.44	18.8	400	700
30	0.43	18.4	364	686
45	0.41	19.8	371	679
60	0.42	19.4	357	709

Srednje vrijednosti efekata Hg^{2+} na združene parametre akcionog potencijala prikazane su na tabeli 2.

Tabela 2. SREDNJE VRIJEDNOSTI EFEKATA Hg^{2+}

Vrijeme min.	Prag nadražaja (V)	AP Amplituda (mV)	AP Latenca (μ sec.)	AP Trajanje (μ sec.)
0	0.42	18.8	457	728
0	0.46	6.4	714	729
15	0.43	16.9	500	793
30	0.51	17.1	457	736
45	0.51	17.0	436	736
60	0.51	18.0	407	714

Evidentan je drastični pad amplitude akcionog potencijala u odnosu na vrijednosti kontrolne grupe od 18,8 na 6,4 mV ($p < 0.001$).

Vrijeme latence je signifikantno prolongirano od 457 μ sec. na 714 μ sec. ($p < 0.001$). Evidentan je efekat Hg^{2+} iona na prag nadražaja od 0.42 V na 0.46 V, ali nije statistički značajan. Toksični efekti Hg^{2+} na združene parametre akcionog potencijala su reverzibilni.

DISKUSIJA I ZAKLJUČCI

Analiza rezultata o efektima manganovih iona na potencijal mirovanja ukazuje da ioni mangana u finalnim koncentracijama od 10^{-5} — 10^{-3} M uzrokuju snažnu inicijalnu depolarizaciju membrana glatkih mišića sa izraženom kasnijom potpunom regeneracijom. Zapaženo

ANU BiH АНУ БиХ

je da, ako nema iona kalijuma u vanjskom mediju, membranski potencijal se regeneriše do nivoa značajne hiperpolarizacije. Može se pretpostaviti da manganovi ioni u niskim koncentracijama kompetiraju sa ionima kalcija za isto mjesto vezivanja u membrani. Vjerovatno manganovi ioni mogu u ovome zamjeniti ione kalcija u stabilizirajućim efektima na membrani glatkih mišića ćelija, ali ne i u prenošenju frakcije struje kroz membranu koja inače pripada kalciju kao nosiocu iona. Rezultati naših istraživanja ne slažu se sa rezultatima Burya i Shuba, u kojima navode da ioni mangana ne uzrokuju promjene u potencijalu mirovanja i otporu membrane glatkog mišića. U našem eksperimentu mi smo pratili i registrovali promjene potencijala mirovanja pod uticajem manganovih iona odmah i svakih 15 sekundi u toku prve minute, a zatim svake minute u narednih 10 minuta, što ovi autori vjerovatno nisu činili.

Rezultati istraživanja ukazuju da ioni kadmijuma u interakciji sa membranskim potencijalom ispoljavaju različite efekte u normalnom Tyrodeovom rastvoru i kada u Tyrodeovom rastvoru nema iona kalcijuma. U normalnom Tyrodeovom rastvoru kadmijumovi ioni u koncentraciji 10^{-4} M, izuzev blage inicijalne hiperpolarizacije, potencijal mirovanja ne mijenjaju. Međutim, ako u vanjskom mediju nema iona kalcijuma, ioni kadmijuma uzrokuju značajno povećanje permeabilnosti ćelijskih membrana, pa potencijal mirovanja progresivno opada na 56% startnih vrijednosti bez tendence k regeneraciji membranskog potencijala. Ovi rezultati sugerišu na kompetitivno djelovanje iona kadmijuma na kalcijumove kanale u membrani glatke mišićne ćelije. U interakciji sa ionima kadmijuma na membrani glatkih mišićnih ćelija kalcijumovi ioni sprečavaju redukciju membranskog potencijala blokirajući pore na membrani i tako regulišu permeabilitet za ione. Rezultati ovih istraživanja su u saglasnosti sa rezultatima Keser-Stanković et al., Salanki et al. o stabilizirajućoj ulozi kalcijumovih iona na ćelijskim membranama, kao i izmijenjenim funkcijama membranskih struktura pod uticajem iona teških metala.

Olovni ioni uzrokuju ireverzibilni pad membranskog potencijala. Ova parcijalna depolarizacija u uslovima aplikacije olovnih iona mogla bi biti u vezi sa registrovanim spastičkim efektima na izolovanom ileumu. Olovo pojačava tonične kontrakcije i istovremeno djeluje na membranu glatkih mišića u cjelini i na dijelove u blizini nervnih završetaka. Očito je da olovni ioni utiču na permeabilnost membrana glatkih mišićnih ćelija. Ova parcijalna depolarizacija vjerovatno je posljedica blokiranja enzimske aktivnosti ATP-aze, čime se remeti mehanizam održavanja jonskih koncentracionih gradijenata membrane. Od mogućih mehanizama o dejstvu olovnih iona može se pretpostaviti da olovni ioni uzrokuju inhibiciju ATP-aze, reducirajući aktivni transport, što dovodi do smanjenog jonskog koncentracionog gradijenta kalijuma na membrani. Inhibicija ATP-aze dovodi do smanjenja energije, pa je onemogućena hidroliza ATP-a, tako da nedostaje energija koja obezbjeđuje aktivni transport. Ova inhibicija dovodi do akumulacije ATP-a u ćeliji uz sinhroni pad intracelularnog kalijuma. Veza između inhibicije ATP-aze i pada kalijuma može se objasniti depresijom membranskog potencijala izazvanog dejstvom olovnih iona i povećanom permeabil-

nošću membrane. Rezultati istraživanja efekata živinih iona na ekscitabilne membrane izolovanog nervus ischiadicus žabe pokazali su da živini ioni uzrokuju reverzibilnu snažnu depresiju amplitude akcionog potencijala, povišenje praga razdraženja i produženje latence. Ovi efekti su vjerovatno posljedica reagovanja živinih iona sa SH ligandima na površini ćelija, što dovodi do poremećaja u funkciji ćelijskih membrana.

THE ESTIMATION OF EFFECTS OF HEAVY METALS ON MEMBRANE AND ACTION POTENTIAL

Summary

Using the technique of intracelular membrane potential registration membrane potential was measured, of the smooth muscle cells in standard Thyrode solution in the presence of Mn^{2+}, Cd^{++} and Pb^{++} as well as in acalcic Thyrode solution without Ca^{++} but in the presence of Mn^{++} and Cd^{++}. Mn^{++} in final concentration of 10^{-5} — 10^{-3} M in standard Thyrode solution at the beginning caused a mild decrease of rest potential and the decrease to reach 72% of the start value at the end of the first minute. However from the second minute after application of Mn^{++} the rest potential was progressive by regenerated and at the end of the eight minute it reached its start value. Ca^{++} added in concentration of 1,5 mM caused hyperpolarisation of 10% over the start value. If Mn^{++} were added in acalcic solution, during the first minute of acalcic state rest potential decreased to 65% of the start value. From the second minute of the application of Mn^{++} membrane potential was regerating and during the fourth minute it reached the start value. In the course of this experiment gradual hyperpolarisation was observed which reached 36% over the start value. Ca^{++} added in Thyrode solution in concentration of 1.5 mM caused further hyperpolarisation to 57% over the start value. Pb^{++} added in the final concentration 10^{-5} — 10^{-3} M in the standard Thyrode solution caused irreversible decrease of the membrane potential to 64% of the start value, This partial depolarisation was maintained during the experiment without tendency to a regeneration of the rest potential. Cd^{++} in the standard Thyrode solutionin concentration 10^{-5} — 10^{-3} M caused a mild initial hiperpolarisation. In acalcic solution the rest potential in the presence of Cd^{++} showed the progressive decrease to 56% of the start value. No tendency of the regeneration of membrane potential was observed. Using the methods of electrostimulation and osciollographic analysis of four essential parametars of the compound action potential, the effects of Hg^{++} on the excitable cell membranes of isolated frog sciatic nerves were studied. The results showed that Hg^{++} in concentration of 5 mM caused a strong depression of amplitude of action potential, an icrease in threshold excitation and prolongation of latency. The changes of amplitude of the action potential and latency were reversible, but the effects of Hg^{++} on threshold excitation were prolonged.

LITERATURA

Bury, V. A. and Shuba, M. F.: In *Physiology of Smooth Muscle.* E. Bulbring and M. F. Shuba. Editors, Raven Press, New York, pp. 65—75, 1976.

Keser-Stanković, Marija., Huković, S., Stanković, D., *Influence of Ions of Heavy Metals on the Effects of Cholinergic, Adrenergic and Somatic Nerve Stimulation. Folia Medica,* Vol. XV, 1, 75—84, 1984.

Keser-Stanković, Marija, Huković, S., Stanković, D.: *Neuromišićna transmisija fetusa različitih životinjskih vrsta u uslovima mijenjanja koncentracije iona kadmija in vitro.* Knjiga zbornika radova Kongresa medicine rada Jugoslavije, Novi Sad, 170—173, 1983.

Keser-Stanković, Marija, Nakaš, M. and Stanković, D.: *Smooth Muscle Cell Membrane Resting Potential at Various Calcium Ions Concentrations.* Periodicum Biologorum PDHI-A, 78, N° 2, 167—168, 1976.

Keser-Stanković, Marija, Nakaš, M., Stanković, D.: *Potassium Depolarization of Smooth Muscle Cell Membranes and Interaction with Application of Lead.* Periodicum Biologorum PDBI-A 78, N° 2, 168—169, 1976.

Rothestein, A.:*Cell Membrane as a Site of Action of Heavy Metals,* Fred. Proc. 18, 1026, 1959.

Salanki, J. and Katalin, S. — Rozsa: *Membrane Efect of Heavy Metals in Molluscan CNS.* Balaton Limnological Research Institute of the Hungarian Academy of Sciences, H-8237 Tihani, Hungary. 8th International Biophysics Congress Book of Abstracts, Bristol 1984.

ANU BiH АНУ БиХ

EKOTOKSIKOLOŠKA ISTRAŽIVANJA DJELOVANJA INTERAKCIJE TEŠKIH METALA SA ANTIDOTIMA NA NEUROMIŠIĆNU TRANSMISIJU

MARIJA KESER-STANKOVIĆ, DRAGAN STANKOVIĆ
Institut za patološku fiziologiju Medicinskog fakulteta, Sarajevo

UDC 612.73/.74:615.856

Apstrakt. Istraživani su efekti antidota AET-a, Cistamina, EDTA i D-penicilamina na neuromišićnoj transmisiji izolovanih inerviranih organa u interakciji sa olovnim ionima. Nađeno je da ispitivane supstance — antidoti ispoljavaju modificirajuće efekte na neuromišićnoj transmisiji u interakciji sa olovnim ionima. AET dat u finalnoj koncentraciji od 10^{-5} — 10^{-3}M blokira kontrakcije izolovanog ileuma, dok na tonus djeluje dvofazno; prvo povećava tonus, a zatim ga smanjuje. Jačina efekta proporcionalna je datoj koncentraciji. Nakon ispiranja tonus i visina kontrakcija se vraćaju na kontrolne vrijednosti u toku 30 minuta. AET dodat 5 minuta prije olovnih iona u posudu za izolovane organe mijenja reakciju olovnih iona na izolovanom ileumu koje u ovom slučaju nije ispoljilo spastične efekte. Cistamin dat u finalnoj koncentraciji od 10^{-5}—10^{-3}M povećava tonus i smanjuje visinu kontrakcija izolovanog ileuma. Kontrolne vrijednosti se uspostavljaju unutar 30 minuta. Cistamin apliciran pet minuta prije olovnih iona inhibirao je spastične efekte olovnih iona. EDTA dat u koncentraciji 10^{-5}—10^{-3}M izaziva povećanje tonusa izolovanog ileuma. Visina kontrakcija nije bitno promijenjena jer dolazi do laganog povećanja apsolutne visine kontrakcija. Nakon ispiranja posude i organa veoma brzo dolazi do spuštanja tonusa. EDTA dat u ovim koncentracijama pet minuta prije aplikacije olovnih iona mijenja osjetljivost izolovanog ileuma na konsekutivno dodavanje olovnih iona. Dodati olovni ioni uzrokuju smanjenje tonusa, dok relativna visina kontrakcija ostaje nepromijenjena. D-penicilamin dodat u posudu za izolovane inervirane organe u koncentracijama 10^{-5}—10^{-3}M povećava tonus i smanjuje relativnu visinu kontrakcija. Nakon ispiranja tonus i visina kontrakcija se postepeno vraćaju na kontrolne vrijednosti. D-penicilamin dat u ovim koncentracijama pet minuta prije olovnih iona u posudu za izolovane organe modifikuje efekte olovnih iona na neuromišićnoj transmisiji ileuma. Olovo povećava tonus izolovanog ileuma, a ako se prethodno da D-penicilamin, olovni ioni spuštaju tonus na nivo bazalne linije, dok se visina kontrakcija postepeno normalizuje.

Ključne riječi: olovo, antidoti, neuromišićna transmisija.

UVOD

Kelatogeni agensi u terapiji saturnizma dati su u prikazu Durakovića (1970). Glavni dio prikaza odnosi se na pojedinačno i komparativno razmatranje djelovanja onih kelatogenih agensa koji su se poka-

zali najuspješnijima u liječenju saturnizma kao što su BAL, EDTA i D-penicilamin. Prikaz njihove efikasnosti razmatran je u zavisnosti od visine doze, načina i dužine trajanja primjene, kao i toksičnog djelovanja tih spojeva.

Ferenzy et al. (1973), ispitujući osmotsku rezistenciju eritrocita miša u uslovima zračenja sa X zracima, našli su da je osmotska rezistencija eritrocita bila smanjena in vivo. Dodavanjem AET-a rezistencija eritrocita se povećala in vitro. Ovi nalazi govore u prilog pretpostavke da SH grupe koje sadrži ovaj radioprotektivni agens popravljaju povećanu permeabilnost membrane eritrocita izazvanu zračenjem. Jamakosmanović et al. (1976) istraživali su evaluaciju protektivnog djelovanja AET-a na akcioni potencijal nervus ischiadicus žabe u uslovima izloženosti UV zračenju. Dobiveni rezultati ukazuju da AET ne mijenja amplitudu akcionog potencijala i ne pokazuje signifikantno zaštitno djelovanje u uslovima UV zračenja, što autori pripisuju njihovom brzom kvantitativnom prenošenju kroz ciklične spojeve. Istraživanja efekata AET-a na membrani glatkih mišićnih ćelija (Keser-Stanković et al., 1978) dokazala su da AET ispoljava depresivni efekat na membranski potencijal. Dodati olovni ioni pojačavaju deprimirajući efekat na membrani glatkih mišićnih ćelija. Drecun i sar. (1975) istraživali su protektivno djelovanje cistamina na bioelektričnu aktivnost A grupe nervnih vlakana u uslovima UV zračenja. Rezultati su pokazali da je protektivno dejstvo cistamina ispoljeno na beta i gama vlakna, i to kod nižih doza UV zračenja. Olovni ioni na izolovanom inerviranom ileumu ispoljavaju izraziti spastički efekat. Cisteamin kao SH protektor dat pet minuta prije olovnih iona u vanjski medij nije modifikovao efekte olova na izolovanom ileumu. Olovo je i u ovom ogledu imalo spastično dejstvo (Keser-Stanković, 1975; Keser-Stanković et al., 1980).

Kontaminacija životne i radne sredine teškim metalima, naročito olovom, kao i sve veća primjena raznih supstanci kao antidota, nameće potrebu sistematskog izučavanja mehanizama njihovog dejstva. Bilo je od interesa istraživati efekte antidota, kao i efekte njihove interakcije sa ionima olova na funkciju neuromišićne transmisije.

MATERIJAL I METODE

U eksperimentu je korišten izolovani ileum sa pripadajućim nervima pacova vrste wistar. Izolovani ileum je prepariran i pripremljen za ispitivanje standardnom metodom po Hukoviću (1967). Transmuralna električna stimulacija vršena je svake minute u trajanju 1 m/sec strujom jačine 5—10 mA, frekvence od 30 Hz. Nakon 4—5 ujednačenih kontrakcija aplicirane su ispitivane suptance u finalnoj koncentraciji od 10^{-5}—10^{-3}M u posudu za izolirane inervirane organe, svaka ispitivana supstanca posebno, registrovani su njihovi efekti u toku pet minuta, a zatim je izvršeno ispiranje i registrovano je još 4—5 kontrolnih kontrakcija.

Ispitivani su slijedeći antidoti:

— AET (aminoetilisotiouranium bromid hidrobromid)

$$H_2N - CH_2 - CH_2 - S - C \begin{matrix} NH_2 \\ NH_2 \end{matrix}$$

— Cistamin $H_2N - CH_2 - CH_2 - S - S - CH_2 - CH_2\ NH_2$;

— EDTA (etilen-diamin-tetra sirćetna kiselina)

$$\begin{matrix} HOOCH_2C \\ HOOCH_2C \end{matrix} N - CH_2 - CH_2 - N \begin{matrix} CH_2COOH \\ CH_2COOH \end{matrix}$$

— D-penicilamin $H_3C - \underset{SH}{\overset{CH_3}{C}} - \underset{NH_2}{\overset{H}{C}} - COOH$.

Na novopripremljenom izolovanom ileumu nakon 4—5 ujednačenih kontrakcija dodavan je rastvor svake ispitivane supstance u određenim koncentracijama i u toku 5 minuta su registrovani njihove efekti. Zatim su bez ispiranja posude za izolovane inervirane organe dodavani olovni ioni u finalnim koncentracijama 10^{-3}M. Efekti interakcije registrovani su u narednih pet minuta, a potom je izvršeno ispiranje posude i organa i registrovano još 5 do 6 kontrolnih kontrakcija.

REZULTATI

AET dodat u finalnoj koncentraciji 10^{-5}—10^{-3}M snažno blokira kontrakcije izolovanog ileuma, dok na tonus djeluje dvofazno — prvo ga povećava, a zatim ga smanjuje. Nakon ispiranja tonus i visina kontrakcija se vraćaju na kontrolne vrijednosti. AET dodat pet minuta prije olovnih iona u finalnim koncentracijama od 10^{-5}—10^{-3}M smanjuje visinu izazvanih kontrakcija, dok na tonus djeluje dvofazno. Prvo ga povećava, a zatim smanjuje. Dodati olovni ioni u finalnim koncentracijama od 10^{-5}—10^{-3}M ne mijenjaju tonus i visinu kontrakcija. Nakon ispiranja posude i organa ne uspostavljaju se kontrolne vrijednosti.

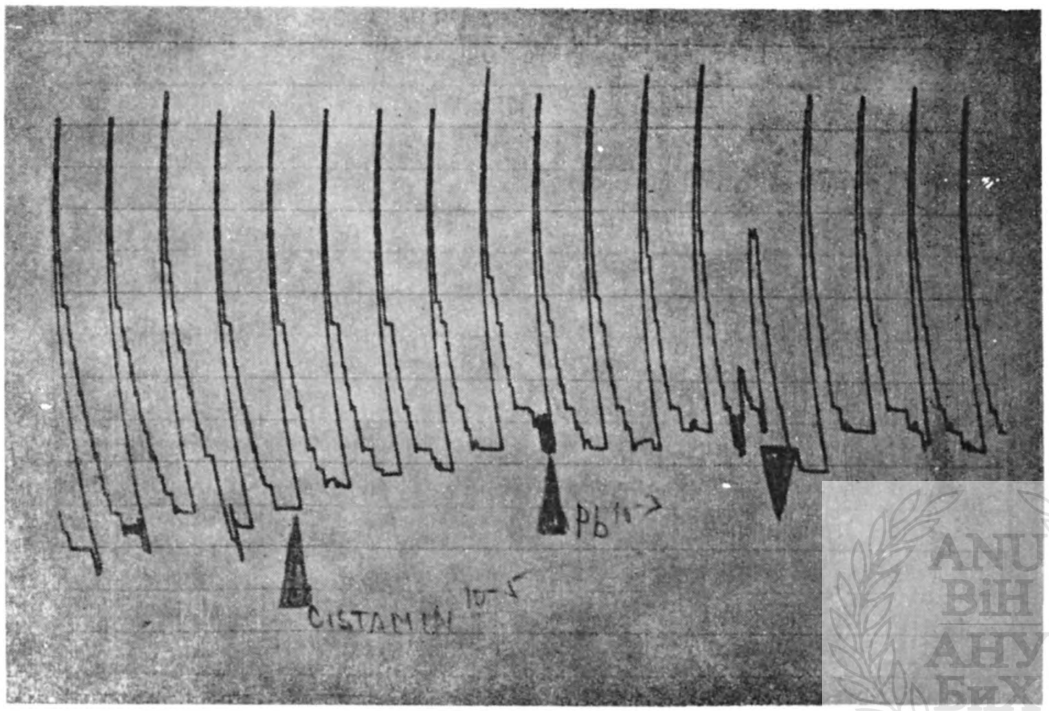
Cistamin dat u finalnoj koncentraciji od 10^{-5}—10^{-3}M povećava tonus izolovanog inerviranog ileuma, a smanjuje apsolutnu visinu kontrakcija. Nakon ispiranja unutar 30 minuta uspostavljaju se kontrolne vrijednosti.

Cistamin dat pet minuta prije aplikacije olovnih iona mijenja reaktivnost organa na konsekutivno dodavanje olova. Na dodate olovne ione tonus se ne povećava, a visina kontrakcija ostaje nepromijenjena.

EDTA dat u koncentraciji 10^{-5}—10^{-3}M izaziva povećanje tonusa izolovanog ileuma. Visina kontrakcija nije bitno promijenjena, jer dolazi do laganog povećanja apsolutne visine kontrakcija. Nakon ispiranja posude i organa vrlo brzo dolazi do spuštanja tonusa na bazalnu liniju.

EDTA dat pet minuta prije olovnih iona mijenja osjetljivost izolovanog ileuma na dodato olovo. Dodati olovni ioni smanjuju tonus bez promjene relativne visine kontrakcija.

D-penicilamin dodat u posudu za izolovane inervirane organe u koncentraciji 10^{-5}—10^{-3}M povećava tonus i smanjuje relativnu visinu kontrakcija izolovanog ileuma. Nakon ispiranja tonus i visina kontrakcija se postepeno vraćaju na kontrolne vrijednosti.



Slika 1. Efekti interakcije cistamina i olova na izolovanom ileumu. Kod znaka ▲ dodat je cistamin u koncentraciji 10^{-5}M, a kod znaka ▲ dodato je olovo u koncentraciji 10^{-3}M. Kod znaka ▼ izvršeno je ispiranje

D-penicilamin dodat pet minuta prije olova u posudu za izolovane organe modifikuje efekte olova na neuromišićnoj transmisiji ileuma. Olovni ioni dovode do spuštanja tonusa na bazalnu liniju, a visina kontrakcija se normalizuje.

Olovni ioni dodati u finalnim koncentracijama od 10^{-5}—10^{-3}M uzrokuju smanjenje apsolutne i relativne visine kontrakcija uz povišenje tonusa organa. Nakon ispiranja tonus i visina kontrakcija se normalizuju unutar 20 minuta.

DISKUSIJA I ZAKLJUČCI

Sve ispitivane supstance — antidoti ispoljavaju modificirajuće efekte na neuromišićnoj transmisiji u interakciji sa olovnim ionima. AET dodat u vanjski medij snažno blokira kontrakcije izolovanog ileuma, dok na tonus organa djeluje dvofazno — prvo ga povećava, a za-

tim smanjuje. Olovni ioni uzrokuju smanjenje apsolutne i relativne visine kontrakcija uz povišenje tonusa organa. U interakciji antidota AET i olovnih iona mijenja se reaktivnost organa. Dodavanje olova nije izazvalo spastičke efekte. AET je u ovom slučaju ispoljio protektivni efekat na olovne ione iako nije uspostavljena restitucija funkcije organa. U uslovima UV zračenja AET je ispoljio protektivni efekat na osmotsku rezistenciju eritrocita (F e r e n c z y et al.), dok je na ekscitabilnim ćelijskim membranama protektivni efekat AET-a izostao (J a m a k o s m a n o v i ć et al., K e s e r - S t a n k o v i ć et al.). Cistamin, slično AET-u, u interakciji sa olovnim ionima ispoljava protektivni efekat. Cistamin dodat u vanjski medij uzrokuje smanjenje apsolutne visine kontrakcija uz povećanje tonusa organa. Dodati olovni ioni ne dovode do daljeg povećanja tonusa ni smanjenja visine kontrakcija. D-penicilamin u interakciji sa olovnim ionima na neuromišićnoj transmisiji ispoljio je izraziti protektivni efekat. D-penicilamin dat u vanjski medij uzrokuje povećanje tonusa uz smanjenje relativne visine kontrakcija. Dodati olovni ioni na prethodno aplicirani D-penicilamin spuštaju tonus na bazalnu liniju, a visina kontrakcija se normalizuje i uspostavlja se funkcija organa. EDTA, slično D-penicilaminu, uzrokuje povećanje tonusa izolovanog ileuma, ali ne mijenja značajno visinu kontrakcije. U interakciji sa olovnim ionima on pokazuje izrazito protektivni efekat, tonus se vraća na kontrolne vrijednosti i uspostavlja se potpuna restitucija funkcije organa. Ispoljeni izrazito protektivni efekti EDTA i D-penicilamina na funkcije neuromišićne transmisije u skladu su sa zapažanjima koja su data u prikazu Durakovića o uspješnosti liječenja saturnizma ovim antidotima. Ispoljeni efekti ispitivanih antidota na neuromišićnoj transmisiji izolovanog ileuma vjerovatno su posljedica pojačane difuzibilnosti tih spojeva kroz ćelijske membrane. Ispoljena njihova toksičnost i pri malim koncentracijama 10^{-5}M ukazuje na potrebu velike opreznosti pri doziranju ovih supstanci. Analiza rezultata interakcije olova i SH protektora upućuje na pretpostavku da se olovni ioni ne vezuju na SH grupe, već da se njegovim dejstvom razbijaju S—S mostovi i stvara se S—Pb kompleks. Stvaranjem S—Pb—S mostova ponovo se uspostavlja permeabilnost membrana. Ispoljeni različiti protektivni efekti ovih supstanci vjerovatno su posljedica različitog afiniteta vezivanja Pb iona na SH grupe ispitivanih SH protektora. Kelatogeni efekat EDTA poznat je po stvaranju kompleksa sa olovom i njegovoj eliminaciji iz organizma. Izraziti protektivni efekat EDTA na neuromišićnoj transmisiji može se pripisati kalcijumu, koji osigurava održavanje gradijenta koncentracije iona na ćelijskim membranama.

ECOTOXICOLOGIC INVESTIGATION OF INTERACTION OF LEAD AND ANTIDOTS ON NEUROMUSCULAR TRANSMISSION

S u m m a r y

All tested antidots used in our experiment manifested modificating effects on neuromuscular trasmission. In interaction with Pb++ the effects of antidots were different.

AET first caused an increase of tonus and then decreased it with a significant decreasing effects on the height of muscular contraction. In interaction with Pb++ spastic action of AET failed.

Cistamin decreased tonus and height of contraction of isolated ileum. In interaction with Pb++ cistamin caused neither changes in tonus nor in height of contraction of isolated ileum. EDTA caused an increase of tonus of isolated ileum, but the height of contraction was not significantly changed. In interaction with Pb ions the reaction of isolated ileum was changed. Tonus showed a decrease to the control value (base line), but relative height of contraction left unchanged. D-penicilamid caused an increased tonus and a decreased relative height of contraction of isolated ileum. In interaction with Pb++ tonus was decreased up to the base line, but the height of contraction showed gradual decrease to the control line.

LITERATURA

Drecun, M., Jamakosmanović, A., Nakaš, M. et al.: *Protektivno djelovanje cistamina na bioelektričnu aktivnost A grupe nervnih vlakana.* Materijali VI Jugoslovenskog simpozija iz biofizike Sarajevo, str. 14—15, 1975.

Duraković, A.: *Kelatogeni agensi u terapiji saturnizma,* Arh. hig. rada 21, 167—183, 1970.

Ferenczy, M., Santha, A., Mandi, E.: *Osmotic Resistance Changes in Mouse Erythrocytes Under the Influence of X Radiation and Radioprotective Compounds.* Honvedorvos, 25, No. 1, 60—63, 1973.

Huković, S.: *Model sistemi u eksperimentalnoj farmakologiji,* ANU BiH. Radovi XXXIV, knjiga 13, 67—84, 1967.

Jamakosmanović, A., Nakaš, M., Leicher-Preka, Zlata et al.: *Evaluation of protective action of AET on the action potential of nerve against UV radiation Periodicum Biologorum,* PDBI-A 78, No. 2, 170—171, 1976.

Keser-Stanković, Marija, Stanković, D.: *The Interaction of AET and Lead on the Membrane Potential of Ileum Smooth Muscle Cells in Normal and Treated Rats.* Iugoslavica Physiologica et Pharmacologica acta. Vol. 14, No 1, 124—125, 1978.

Keser-Stanković, Marija: *Spastic Effects of Lead on Isolated Ileum of Animals Previously Treated with Lead Acetate.* Folia Medica, Vol. X, No 1, 219—230, 1975.

Keser-Stanković, Marija, Stanković, D.: *Interakcija cisteamina i olova na izolovanom ileumu normalnih i tretiranih životinja.* ANU BiH, Odjeljenje medicinskih nauka, knjiga 19, 65—73, 1980.

Teisinger, J.: *Biochemical Responses to Provocative Chelation by Edetate Disodium Calcium.* Arch. Environ. Health, 23, 280, 1971.

PROCJENA RIZIKA EKSPOZICIJE METALIMA NA TKIVIMA EMBRIONA KOKOŠIJEG JAJETA I KULTURI ĆELIJA U EKOTOKSIKOLOGIJI

MARIJA KESER-STANKOVIĆ, DANICA HLAČA, DRAGAN STANKOVIĆ
Institut za patofiziologiju Medicinskog fakulteta, Sarajevo

UDC 615.556 : 591.3

Apstrakt. Istraživani su i komparirani efekti iona srebra, željeza i kalaja na razvijajuća tkiva kokošijeg embriona i na kulture ćelija u finalnim koncentracijama od 10^{-1} — 10^{-5} M. Svaka od ovih koncentracija u količinama od 0,2 ml inokulirana je u razvijajuća tkiva kokošijeg embriona, i to u amnion i žumanjčanu vrećicu i u kulture ćelija in vitro tipa HeLa i GMK. Željezo, esencijalni element u organizmu čovjeka i životinja, i srebro i kalaj, koji se normalno ne nalaze kao esencijalni biološki sastojci, pokazuju očite razlike u toksičnim efektima na razvijajuća tkiva kokošijeg embriona i kontinuirane ćelijske linije HeLa i GMK. Zapažen je snažniji i brži toksični efekat iona srebra i kalaja u odnosu na ione željeza, koji se ispoljava već prvog dana poslije aplikacije, bez obzira na način inokulacije metala. Evidentno je brže uginuće embriona i pri uvođenju u amnion i u žumanjčanu kesu. U odnosu na ione željeza toksični efekat iona srebra i kalaja brže su se ispoljili i na kulturama ćelija, pri čemu su ioni srebra i kalaja izazvali potpuno propadanje ćelija u razređenjima 10^{-1}, 10^{-2}, 10^{-3} M, a ioni željeza samo u razređenju 10^{-1} M Zapaženo je da inokulacija ispitivanih metala u amnion kokošijeg jajeta, uzrokuje brže uginuće embriona nego inokulacija metala u žumanjčanu kesu.

Ključne riječi: metali, razvijajuća tkiva kokošijeg embriona, kultura ćelija.

UVOD

Željezo je esencijalni elemenat u organizmu čovjeka i životinja. Akutna intoksikacija željezom kod eksperimentalnih životinja uslovila je produženje vremena koagulacije, promjenu u stvaranju fibrina i oštećenje jetre (B o t h w e l et al., 1962), dok je dugotrajno davanje željeza uzrokovalo hemosiderozu u mnogim tkivima i organima. Eksperimentalna istraživanja (M o e s c h l i n, 1962) ukazuju da simptomi trovanja željezom protiču u dvije faze. U prvoj fazi dominiraju paralitičke pojave na donjim ekstremitetima, a u drugoj fazi krvavi prolivi. Životinje obično uginu u toku 24 sata nakon davanja željeza. Povećana resorpcija srebra dovodi do lokalne ili generalizovane impregnacije tkiva (argirija) sa oštećenjem tkiva i organa i povećanim aterosklerotičnim

procesima. Veće doze date eksperimentalnim životinjama uzrokovale su plućni edem, hemolizu i hipoplaziju koštane srži (Browning, 1969). Kalaj je metal koji se upotrebljava u industriji boja i parfema. Dodaje se i pastama za zube jer sprječava razvoj karijesa. Zapaženo je i njegovo iritativno lokalno dejstvo. Dat peroralno uzrokuje povraćanje, proliv, grčeve i glavobolju (Grot et al., 1973). Radovi Conine i sar. (1975) ukazuju na njegova depresivna dejstva na CNS, na mišićnu slabost koja progredira do paralize.

Ispoljavanje različitih toksičnih efekata ovih metala podstiče na dalja istraživanja, pa smo u našem eksperimentu postavili cilj da ispitamo toksične efekte iona željeza, srebra i kalaja na razvijajuća tkiva kokošijeg embriona i kulturama ćelija in vitro.

MATERIJAL I METODE

U eksperimentu su korišteni ioni željeza, srebra i kalaja u finalnim koncentracijama od 10^{-1}—10^{-5} M. Svaki od ovih metala u ovim razređenjima inokuliran je u razvijajuća tkiva kokošijeg embriona, i to u amnion i žumanjčanu vrećicu i kulture ćelija HeLa i GMK. Inokulacija u amnion vršena je u po pet fertilnih jaja pripremljenih za inokulaciju u amnionsku vrećicu 10—11 dana starog kokošijeg embriona, na način koji se koristi za inokulaciju virusa influence (Hawkes, 1979). Nakon inokulacije jaja su inkubirana u termostatu na temperaturi 37° C i svakog dana su ovoskopom evidentirana uginula jaja.

Inokulacija metala u žumanjak vršena je sedmog dana inkubacije u termostatu (tehnika za inokulaciju virusa u šumanjčanu vrećicu — Palmer, 1975), i to svako razređenje takođe u po pet jaja. Uginuće embriona je praćeno svakodnevno na isti način kao pri inokulaciji u amnion.

Inokulacija metala u kulture kontinuiranih ćelija HeLa i GMK vršena je na način koji se koristi u virusološkim laboratorijama pri pokušaju izdvajanja virusa (Schmidt, 1969). Jednom sedmično kontinuirane ćelijske linije se tripsiniraju, izaperu, a inokulum ćelija resuspendira u odgovarajućoj hranljivoj podlozi i prenosi u epruvete tako da u svakoj epruveti bude po prilici 200—300 hiljada ćelija. Ćelije se vlastitom aktivnošću priljube uz zid epruvete, razmnožavaju i nakon 2—3 dana takva je kultura ćelija spremna za inokulaciju.

Svako razređenje pojedinog metala inokulirano je u po dvije »porasle« kulture ćelija HeLa i GMK tipa.

Kontrolne kulture ćelija su održavane pod identičnim uslovima kao i one u koje je inokuliran pojedini metal. Efekti metala praćeni su svakodnevnim mikroskopiranjem inokuliranih ćelija i kontrola. Efekat metala na razvijajućim tkivima kokošijeg embriona kao i na kulturama ćelija praćen je tokom 10 dana od dana inokulacije.

REZULTATI

Na tabeli 1 prikazani su efekti Ag^+ pri inokulaciji u amnion i žumanjčanu vrećicu (Tabela 1).

Već u prvom danu nakon inokulacija Ag^+ u amnion uginulo je po 4 od 5 embriona (80%) u razređenju 10^{-1} M i 10^{-2} M. Pri koncentraciji Ag^+ do 10^{-3} M uginuo je prvog dana poslije inokulacije jedan, a drugog dana 3 embriona, odnosno 80%. Koncentracija Ag^+ 10^{-4} M inokulirana u amnion uzrokovala je smrt dva (40%), a u razređenju 10^{-5} M jednog embriona (20%) prvog dana po inokulaciji.

Zapaženo je da su pri razređenju 10^{-1} M uginula 2 embriona prvog dana po inokulaciji u žumanjčanu vrećicu i 3 embriona šestog dana nakon inokulacije, odnosno u ovom razređenju (10^{-1} M) uginuli su svi inokulirani embrioni do šestog dana eksperimenta. Finalna koncentracija 10^{-2} Ag^+ izazvala je smrt 4 inokulirana jajeta u žumance šestog dana i jednog embriona osmog dana inkubacije, odnosno do osmog dana eksperimenta uginuli su svi embrioni inokuliranih jaja.

Iz tabele 2 se vide efekti Ag^+ na kulturama ćelija HeLa i GMK tipa (Tabela 2).

Može se uočiti da ubrzo nakon inokulacije Ag^+, prvog dana eksperimenta, u kulture ćelija u razređenju 10^{-1}, 10^{-2}, 10^{-3} M dolazi do propadanja svih ćelija u kulturi i HeLa i GMK tipa. Oba tipa kulture ćelija u koja su inokulirana razređenja srebra u koncentraciji 10^{-4} i 10^{-5} M nisu pokazala osjetljivost na aplikaciju srebra i u odnosu na kontrolne kulture nije bilo vidljivih promjena.

Tabela 3 predstavlja rezultate inokulacije Fe^{++} u amnion i žumanjčanu vrećicu (Tabela 3).

Registrovano je da je koncentracija 10^{-1} M već u prvom danu uzrokovala uginuće dva, a u drugom danu inkukubacije još dva embriona. U koncentraciji Fe^{++} 10^{-2} M prvog dana uginuo je jedan, drugog dana dva, a četvrtog dana još jedan embrion. U razređenju 10^{-5} M Fe^{++} izazvalo je uginuće 3 embriona, a koncentracija 10^{-5} Fe^{++} jednog embriona prvog dana po inokulaciji u amnion.

Koncentracija 10^{-1} M izazvala je uginuće jednog embriona drugog dana inkubacije u žumanjčanu vrećicu, dok su pri koncentraciji 10^{-2}, 10^{-3}, 10^{-4}, 10^{-5} M svi embrioni ostali živi do kraja eksperimenta.

Ioni željeza primijenjeni u koncentraciji 10^{-1} M izazvali su u ćeliji tipa HeLa propadanje kulture prvog dana inokulacije, a GMK tipa drugog dana poslije inokulacije.

U razređenju 10^{-2} M kulture ćelija tipa HeLa ostale su nepromijenjene, a tipa GMK jedna kultura je propala, dok je druga ostala nepromijenjena u odnosu na kontrolu.

Bez znatnih promjena ostale su sve preostale kulture u koje je aplicirano željezo u koncentracijama 10^{-3}, 10^{-4} i 10^{-5} M.

Inokulacija iona kalaja u amnion u koncentraciji od 10^{-1} M izazvala je prvog dana inokulacije uginuće četiri embriona. Drugog dana inokulacije uginuo je jedan embrion, što znači da je ova koncentracija uzrokovala uginuće svih embriona. Koncentracija od 10^{-2}, 10^{-3} i 10^{-4} M

Tabela 1. EFEKTI SREBRA NA RAZVIJAJUĆA TKIVA KOKOŠIJEG EMBRIONA PRI INOKULACIJI U AMNION

Koncentracija Ag^+	Dani										Uginulo	Živo	Uginulih u %
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10			
10^{-1} M	4/5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	4	1	80
10^{-2} M	4/5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	4	1	80
10^{-3} M	1/5	3/4	0	0	0	0	0	0	0	0	4	1	80
10^{-4} M	2/5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	3	40
10^{-5} M	1/5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	4	20

EFEKTI SREBRA NA RAZVIJAJUĆA TKIVA KOKOŠIJEG EMBRIONA PRI INOKULACIJI U ŽUMANJČANU KESU

Koncentracija Ag^+	Dani										Uginulo	Živo	Uginulih u %
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10			
10^{-1} M	2/5	0	0	0	0	3/3	0	0	0	0	5	0	100
10^{-2} M	0	0	0	0	0	4/5	0	1/1	0	0	5	0	100
10^{-3} M	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	5	0
10^{-4} M	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	5	0
10^{-5} M	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	5	0

Tabela 2. EFEKTI SREBRA NA KONTINUIRANE KULTURE ĆELIJA He La i GMK

Koncentracija metala		Dani										Propale ćelije kulture	Kulture bez prom.	Propale kulture %
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10			
10^{-1} M	HeLa	+	—	—	—	—	—	—	—	—	—	+	—	100
	GMK	+	—	—	—	—	—	—	—	—	—	+	—	100
10^{-2} M	HeLa	+	—	—	—	—	—	—	—	—	—	+	—	100
	GMK	+	—	—	—	—	—	—	—	—	—	+	—	100
10^{-3} M	HeLa	+	—	—	—	—	—	—	—	—	—	+	—	100
	GMK	+	—	—	—	—	—	—	—	—	—	+	—	100
10^{-4} M	HeLa	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	GMK	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
10^{-5} M	HeLa	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	GMK	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

ANU BiH AHУ БиХ

Tabela 3. EFEKTI ŽELJEZA NA RAZVIJAJUĆA TKIVA KOKOŠIJEG EMBRIONA PRI INOKULACIJI U AMNION

Koncentracija Fe^{++}	Dani										Uginulo	Živo	Uginulih u %
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10			
10^{-1} M	2/5	2/3	0	0	0	0	0	0	0	0	4	1	80
10^{-2} M	1/5	2/4	0	1/2	0	0	0	0	0	0	4	1	80
10^{-3} M	1/5	0	1/4	0	0	0	0	0	0	0	2	3	40
10^{-4} M	3/5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3	2	60
10^{-5} M	1/5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	4	20

EFEKTI ŽELJEZA NA RAZVIJAJUĆA TKIVA KOKOŠIJEG EMBRIONA PRI INOKULCAJI U ŽUMANJČANU KESU

Koncentracija Fe^{++}	Dani										Uginulo	Živo	Uginulih u %
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10			
10^{-1} M	0/5	1/5	0	0	0	0	0	0	0	0	1	4	20
10^{-2} M	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	5	0
10^{-3} M	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	5	0
10^{-4} M	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	5	0
10^{-5} M	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	5

Tabela 4. EFEKTI ŽELJEZA NA KONTINUIRANE ĆELIJE HeLa i GMK

Koncentracija metala	Tip kulture ćelija	Dani										Propale ćelije kulture	Kulture bez prom.	Propale kulture %
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10			
10^{-1} M	HeLa	+	—	—	—	—	—	—	—	—	—	+	—	100
	GMK	0	+	—	—	—	—	—	—	—	—	+	—	100
10^{-2} M	HeLa	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	GMK	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
10^{-3} M	HeLa	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	GMK	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
10^{-4} M	HeLa	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	GMK	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
10^{-5} M	HeLa	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	GMK	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

ANU BiH АНУ БиХ

Tabela 5. EFEKTI RAZLIČITIH KONCENTRACIJA IONA KALAJA NA RAZVIJAJUĆA TKIVA KOKOŠIJEG EMBRIONA INOKULACIJA U AMNION

Broj dana nakon inokulacije	KONCENTRACIJA IONA KALAJA OD 10^{-1} — 10^{-5} M				
	10^{-1}	10^{-2}	10^{-3}	10^{-4}	10^{-5}
1	4/5 x	2/5	2/5	2/5	1/5
2	1/1	1/3	1/3	0/3	0/4
3	0	0/2	0/2	0/3	0/4
4	0	0/2	0/2	0/3	0/4
5	0	0/2	0/2	0/3	0/4
6	0	0/2	0/2	0/3	0/4
7	0	0/2	0/2	0/3	0/4
8	0	0/2	1/2	0/3	0/4
Broj uginulih do kraja eksperimenta	5	3	3	2	1
Broj živih do kraja eksperimenta	0	2	2	3	4
Procenat uginulih (%)	100	60	60	40	20

EFEKTI RAZLIČITIH KONCENTRACIJA IONA KALAJA NA RAZVIJAJUĆA TKIVA KOKOŠIJEG EMBRIONA INOKULACIJA U ŽUMANJČANU VREĆICU

Broj dana nakon inokulacije	KONCENTRACIJA IONA KALAJA OD 10^{-1} — 10^{-5} M				
	10^{-1}	10^{-2}	10^{-3}	10^{-4}	10^{-5}
1	1/5 x	0/5	1/5	0/5	0/5
2	0/4	0/5	0/4	0/5	0/5
3	0/4	0/5	0/4	0/5	0/5
4	0/4	0/5	0/4	0/5	0/5
5	0/4	0/5	0/4	0/5	0/5
6	0/4	0/5	0/4	0/5	0/5
7	0/4	0/5	0/4	0/5	0/5
8					
Broj uginulih do kraja eksperimenta	1	0	1	0	0
Broj živih do kraja eksperimenta	4	5	4	5	5
Procenat uginulih (%)	20	0	20	0	0

Legenda: x — uginulo; 0 — živo

ANU BiH АНУ БиХ

pri inokulaciji prvog dana uslovile su uginuće po dva embriona, dok je drugog dana uginuo po jedan embrion (60%). Koncentracija 10^{-5} M

Kontinuirane ćelije HeLa i GMK uslovile su izrazitu osjetljivost pri koncentracijama 10^{-1} i 10^{-2} M jer je došlo do potpunog propadanja kulture ćelija HeLa i GMK. Ostale koncentracije nisu ispoljile toksični efekat na kontinuirane ćelije.

Inokulacija iona kalaja u žumanjčanu vrećicu uslovila je uginuće po jednog embriona.

Tabela 6. EFEKTI RAZLIČITIH KONCENTRACIJA IONA KALAJA NA KONTINUIRANE ĆELIJE HeLa i GMK

Koncentracija iona kalaja u M	Tip kulture ćelija	DANI 1	2	3	4	5	6	7	8	Propale ćelije kulture	Ćelije bez promj.	Propale kulture ćelija (%)
10^{-1}	HeLa	+	—	—	—	—	—	—	—	+	—	100
	GMK	+	—	—	—	—	—	—	—	+	—	100
10^{-2}	HeLa	+	—	—	—	—	—	—	—	+	—	100
	GMK	+	—	—	—	—	—	—	—	+	—	100
10^{-3}	HeLa	0	0	0	0	0	0	0	0	0		0
	GMK	0	0	0	0	0	0	0	0	0		0
10^{-4}	HeLa	0	0	0	0	0	0	0	0	0		0
	GMK	0	0	0	0	0	0	0	0	0		0
10^{-5}	HeLa	0	0	0	0	0	0	0	0	0		0
	GMK	0	0	0	0	0	0	0	0	0		0

DISKUSIJA I ZAKLJUČCI

Analiza rezultata ukazuje da su toksični efekti iona srebra, kalaja i željeza na razvijajućim tkivima kokošijeg embriona i u kulturi ćelija in vitro različiti. Zapaženo je da su toksični efekti iona srebra i kalaja na žive ćelije jače ispoljeni u odnosu na efekte iona željeza. Najjači toksični efekat ispoljili su ioni srebra, kako pri inokulaciji u amnion i u žumanjčanu vrećicu kokošijeg embriona tako i na kulture ćelija in vitro. Drastični efekti ovog metala ispoljeni su već prvog dana eksperimenta pri svim koncentracijama koje su primijenjene u ovom eksperimentu. Ioni kalaja ispoljili su izrazitu toksičnost pri inokulaciji u amnion u koncentracijama od 10^{-1} do 10^{-5} M već prvog dana poslije inokulacije. Toksični efekti kalaja ispoljeni su i na kulturama ćelija, pri čemu su koncentracije od 10^{-1} i 10^{-2} M uzrokovale uginuće obje kulture ćelija već prvog dana inokulacije. Analizirajući efekte iona željeza, zapaženo je da su toksični efekti ovog metala sporiji. Oni nisu izraženi na svim ispitivanim strukturama i ne javljaju se prvog dana inokula-

cije, kakav je slučaj kod ostala dva ispitivana metala. Zapažena je izrazita osjetljivost kokošijeg embriona na inokulaciju iona srebra i kalaja u amnion, gdje su koncentracije od 10^{-1} i 10^{-2} M uzrokovale smrtnost 80% embriona. Smrtnost embriona zapažena je pri inokulaciji i ostalih koncentracija. Uspoređivanje toksičnih efekata željeza, srebra i kalaja pri inokulaciji u žumanjčanu vrećicu embriona i u kulture ćelija uočavaju se jači toksični efekti iona srebra i kalaja u odnosu na željezo.

U ovom slučaju ioni srebra inokulirani u žumanjčanu vrećicu ispoljili su jači toksični efekat u odnosu na inokulirane ione željeza i kalaja. Analiza efekata iona željeza za kulture ćelija ukazuje na nejednaku osjetljivost HeLa i GMK ćelija na ione ovog metala. Tip HeLa ćelija pokazuje veću osjetljivost, jer su ove linije ćelija uginule već prvog dana eksperimenta pri razređenju 10^{-1} M, dok je tip GMK pri ovom razređenju propao drugog dana nakon inokulacije. Koncentracije od 10^{-2} M uzrokovale su propadanje ćelijskih linija tipa GMK, što nije bio slučaj kod kulture tipa HeLa ćelija.

THE RISK ASSESSMENT OF EXPOSITION TO HEAVY METALS ON CELLS OF CHICKEN EMBRYO AND TISSUE CULTURES IN ECOTOXICOLOGY

Summary

The effects of metal ions — Ag^+, Fe^{++}, Sb^{++} on the hen embryo and tissue culture in final concentrations of 10^{-1} — 10^{-5} M was studdied. Each concentration, soluted in 0,2 ml, was inoculated in the tissue of hen embryo, in amnion and in yolk sac as well as in tissue culture in vitro cells HeLa and GMK lines. Fe^{++}, the essential element in the animal and in the human body and Ag^+ and Sb^{++}, wich normally are not present as essential biological elements, manifested considerable differences in their toxical effects on the cell hen embryo as well as on the continual cell lines HeLa and GMK. It vas observed stronger and faster toxicological effects of Ag^+ and Sb^{++} than Fe^{++}, which manifested their toxicological effects already first day after application regardless of the mothod od metal application. The death of embryo was evident wery quickly after inoculation of metal ions into amnion and into the yolk sac. The toxical effects of Ag^+ and Sb^{++} were faster manifested in the cell culture, where Ag^+ and Sb^{++} caused the death of cells in the solution of 10^{-1} — 10^{-2} and 10^{-3} M, but Fe^{++} showed the same effects only in concentration of 10^{-1} M. It was observed that inoculation of those metal ions in amnion of the hen embryo caused a faster death of cells than the inoculation of the same metals in yolk sac.

LITERATURA

Bothwell, T. H., Finch, C. A.: *Iron Metabolism,* Little Brow. et Co Boston, 1962.

Browning, E.: *Toxicity of Industrial Metals,* Butterworth, London, 1969.

Conine, D. L., Yum, M. N., Martz, R. C. et al.: *Toxicity of Sodium Pantafluorostannite, a New Anticariogenic Agent. I Comparisonof the Acute Toxicity of Sodiumpentafluorostannite, Sodium flouride and Stannous Chloride in Mice and or Rats.* Toxicol. app. Pharmacol. 33, 21—26, 1975.

De Groot, A. P.: *Subacute Toxacity of Inorganic Tin Influenced by Dietary Levels of Iron and Copper.* Food Cosmet. Toxicol, 11, 955—962, 1973.

De Groot, A. P., Feron, V. J., Til, H. P.: *Short-Term Toxicity Studies on Some Salts and Oxides of Tin Rats.* Food Cosmet. Toxicol. 11, 19—30, 1973.

Forschale-, I. et al.: Brit. J. Surg. 41, 379, 1954.

Hawkes, R. A.: *General Principles Underlying Lab. Diagn. of Viral inf.*, ed. Lennette, E. H. and Schmidt, N. J. Diagan, Proc. for Viral, Ricketts, and Clamydial Inf., 1979.

Moeschlin, S. Schnider, U.: Schweiz, med. Wchr., 92, 1295, 1962.

Palmer, D. F., Dowdle, W. R., Coleman, M. T. et al.: *Advanced Lab. Techn. for Infl. Diagn.*, U. S. Depart. of Health, Education and Welfare Publi. Health Service 1975.

ANU BiH АНУ БиХ

ANU
BiH
АНУ
БиХ

EKOTOKSIKOLOŠKO ISPITIVANJE RIZIKA OD INHALIRANIH PARA LAKIH I TEŠKIH BENZINA KAO I TRIHLORETILENA U TOKU GESTACIJE

JASNA ĐURIČIĆ
Institut za patološku fiziologiju Medicinskog fakulteta, Sarajevo

UDC 616—099:547.3:599.32

Apstrakt. Istraživani su organski rastvarači iz grupe petrolejskih ugljikovodonika (laki i teški benzini), kao i trihloretilen i njihov uticaj na proces embriogeneze i neuromišićne transmisije u pacova. U eksperimentu je korišteno 216 ženki pacova vrste wistar (160 eksperimentalnih i 56 kontrolnih). Za vrijeme prvog i drugog gestacionog perioda eksperimentalne ženke su bile tretirane sa organskim rastvaračima u inhalatornoj dozi od 0,5/4500 ml. Klinički znakovi intoksikacije i hematološke promjene su praćeni u toku eksperimenta. Dva do tri dana pred porod polovina eksperimentalnih ženki je žrtvovana, a njihovi fetusi su pregledani i vađeni. Želudac i mokraćni mjehur su izolovani od ženki, njihovih mladih i iz fetusa, te je ispitivana neuromišićna transmisija. Rezultati istraživanja su pokazali da su svi ispitivani organski rastvarači izazvali kliničke znakove intoksikacije u gravidnih ženki, uz promjene hematoloških parametara. Trihloretilen je jedino uticao na proces razvoja tako što je uslovio rađanje mladih manje težine kao i uginuća. Svi ispitivani organski rastvarači su manifestovali inhibitorni efekat na funkciju neuromišićne sinapse fetusa mladih i odraslih ženki.

Ključne riječi: benzini, trihloretilen, pacovi, gestacija, hematološki parametri, neuromišična transmisija.

UVOD

U okviru borbe za očuvanje čovjekove okoline danas se sve više vrše ispitivanja individualne izloženosti mnogim ekotoksinima. Tako su Hajimirgha i sar. (1986), ispitujući halogenirane ugljikovodonike, našli prisustvo trihloretilena u krvi kod trećine neprofesionalno eksponiranih ispitanika.

U ispitivanjima fetalne distribucije nekih alifatskih ugljikovodonika i trihloretilena, koja su Withey i Karpinch (1989) vršili na pacovima od 17 dana trudnoće, pokazali su da postoji pozitivna korelacija između koncentracija trihloretilena u majki i fetusa. Efekte trihloretilena na reproduktivnu funkciju mužjaka pacova ispitivali su Zenick i sar. (1984), dajući od 10—1000 mg/kg trihloretilena u toku 5 dana sedmično kroz šest nedelja i našli su da, i pored znatne kon-

centracije trihloretilena i njegovih metabolita u muškim reproduktivnim organima, nije bilo znakova spermatotoksičnosti. Nasuprot ovim zapažanjima, Mauson i sar. (1984) su, izlažući ženke pacova trihloretilenu u koncentraciji od 1000 mg/kg dnevno dvije sedmice prije začeća i u toku gestacionog perioda od 21 dan, uslovili uginuće ženki, a težina mladih je bila znatno smanjena, uz pojavu uginuća mladih pri rođenju.

Ispitivanja djelovanja nafte i njenih derivata na razvoj mnogih životinjskih vrsta su pokazala da mogu da imaju embriotoksično djelovanje. Hoffman (1979) je pokazao na embrionu pataka da direktno aplicirana sirova nafta izaziva značajne promjene u smislu preživljavanja embriona, dok je Ellenton (1982) ukazala na značajno smanjenje težine i dužine pilećih embriona. Cavanaugh i sar. (1983) su pokazali da ingestija sirove nafte usporava sazrijevanje gonada kod pataka. Carpenter i sar. (1978) su, ispitujući djelovanje petrolejskih ugljikovodonika na ljude i životinje, izazvali pojavu tremora i uginuća pacova. Istraživanja djelovanja trihloretilena na miševima Anne Tucker i sar. (1981) dovela su do pojave ataksije, gubitka refleksa ispravljanja i uginuća životinja.

Rao i Panday (1980) su, ispitujući hepatički metabolizam hema u pacova, utvrdili da benzen smanjuje koncentraciju hepatičnog hema, dok benzini uzrokuju supresiju aktivnosti bubrežne ALA dehidrataze. Fujita i sar. (1984) su našli depresiju stvaranja eritrocita i jetrene D DALK u pacova izloženih trihloretilenu.

Zbog različitih aspekata toksičnosti koje pokazuju petrolejski i hlorirani ugljikovodonici kako za ljude tako i za životinje, odlučili smo se da ispitamo njihovo djelovanje na ženke pacova u periodu gestacije i razvoj mladih uz praćenje hematoloških parametara. S obzirom na afinitet ovih toksina za nervno tkivo, a još nedovoljno istraženo njihovo djelovanje na osjetljive strukture neuromišićne spojnice u procesu njenog razvoja od fetusa do odraslih ženki, odabrali smo izolovane organe za ispitivanje neuromišićne transmisije.

MATERIJAL I METODE

U eksperimentu smo koristili lake i teške benzine iz grupe petrolejskih ugljikovodonika, kao i trihloretilen iz grupe hloriranih ugljikovodonika. Ukupno je korišteno 216 ženki Wistar pacova istog legla i starosti, težine oko 200 grama koje su bile podijeljene u 5 grupa po 32 ženke, a kontrolnu grupu je sačinjavalo 56 ženki. Eksperimentalne ženke su bile izložene djelovanju para lakih benzina (frakcije od 0,2—U5 i 0,2—U10), zatim parama teških benzina (frakcije od 0,2—U6 i 0,2—U11), dok je peta grupa bila izložena djelovanju trihloretilena. Prije pristupa izvođenju eksperimenta ispitali smo ponašanje ženki u staklenom zvonu volumena 4500 ml i bez aplikacije toksičnih supstanci i ustanovili da životinje dobro podnose boravak u zvonu i kroz duži period vremena. Pošto smo životinje namjeravali da eksponiramo organskim rastvaračima u toku pola, odnosno cijelog gestacionog perioda, koji kod pacova

iznosi 21 dan, morali smo i utvrditi dozu rastvarača koju su životinje mogle podnijeti u svakodnevnoj ekspoziciji i našli smo da ona iznosi 0,5 ml toksične supstance raspršene iz šprice u staklenom zvonu volumena 4500 ml. Vrijeme držanja životinja u staklenom zvonu je iznosilo 5 minuta. Ispitivanje navedenih supstanci je rađeno u prvom i drugom gestacionom periodu da bi se odredio njihov uticaj na fetogenezu i embriogenezu, tako da je svaka grupa od 32 ženke bila podijeljena u podgrupe od 16 ženki. Nakon izvršene koncepcije u toku 5 dana zajedničkog držanja u kavezu sa mužjacima, ženke su bile odvojene i uključene u tretman sa odgovarajućom supstancom počevši od 5-og dana koncepcije za prvi, odnosno od 12-og dana koncepcije za drugi gestacioni period.

Na početku kao i na kraju eksperimenta, radi praćenja toksičnih efekata na hematopoezni sistem, uzeta je krv od ženki i određivani su standardnim metodama broj eritrocita, leukocita, retikulocita i diferencijalna krvna slika. U toku ekspozicije praćeno je vrijeme latence, znaci intoksinacije, dužina trajanja simptoma kao i vrijeme oporavka, odnosno uginuća životinja. Na jedan do dva dana pred porod polovina ženki iz svake podgrupe je bila žrtvovana, a od uzete krvi su urađene hematološke pretrage. Dobiveni podaci su statistički obrađeni na kompjuteru. Također je registrovan broj i izgled fetusa.

Od žrtvovanih ženki, kao i njihovih fetusa i mladunčadi korišteni su izolovani inervirani organi radi ispitivanja djelovanja pomenutih organskih rastvarača na neuromišićnu transmisiju. Kao model za ispitivanje poslužili su izolovani inervirani želudac i mokraćni mjehur preparirani standardnom metodom prema H u k o v i ć u i sar. (1963, 1967). Ispitivane supstance su aplicirane u vodeno kupatilo u rastvoru Thyrode u koncentracijama od 0,01; 0,1 i 1,0 ml/20 ml. Električna stimulacija je vršena pomoću stimulatora II impulsima veće jačine (30—40 mA, 20 Hz) za izolovane organe fetusa.

REZULTATI

Ustanovljeno je da već u prvoj minuti tretmana životinje pokazuju znakove intoksikacije u smislu uznemirenosti ili obamrlosti, koji su kod primjene lako isparljivih benzina bili ispoljeni sa kraćim vremenom latence, ali i sa bržim oporavkom (tabela 1). Pri aplikaciji teških benzina razlike su postojale ne samo u vremenu pojave i trajanja oporavka već su se uz tahipneu javljali podrhtavanje i grčevi pojedinih dijelova tijela kao što su glava, trup i ekstremiteti. Također je zapažena mnogo češća pojava kolapsa kod ženki koje su bile inhalirane sa teškim benzinima. Sve ove navedene pojave su bile daleko najizraženije pri aplikaciji trihloretilena koji je u četiri slučaja doveo i do egzitusa životinja. Rezultati pretraga krvi su pokazali smanjen broj eritrocita, leukocita, retikulocita kao i vrijednosti hemoglobina i to statistički značajan kod primjene ispitivanih supstanci od početka gestacionog perioda (tabela 2). Pomjeranja unutar diferencijalne krvne slike su bila u smislu relativne limfocitoze na račun smanjenja neutrofilnih granulocita.

Tabela 1. SIMPTOMI INTOKSIKACIJE U TOKU TRETMANA GRAVIDNIH ŽENKI LAKIM BENZINOM 0,2—U5

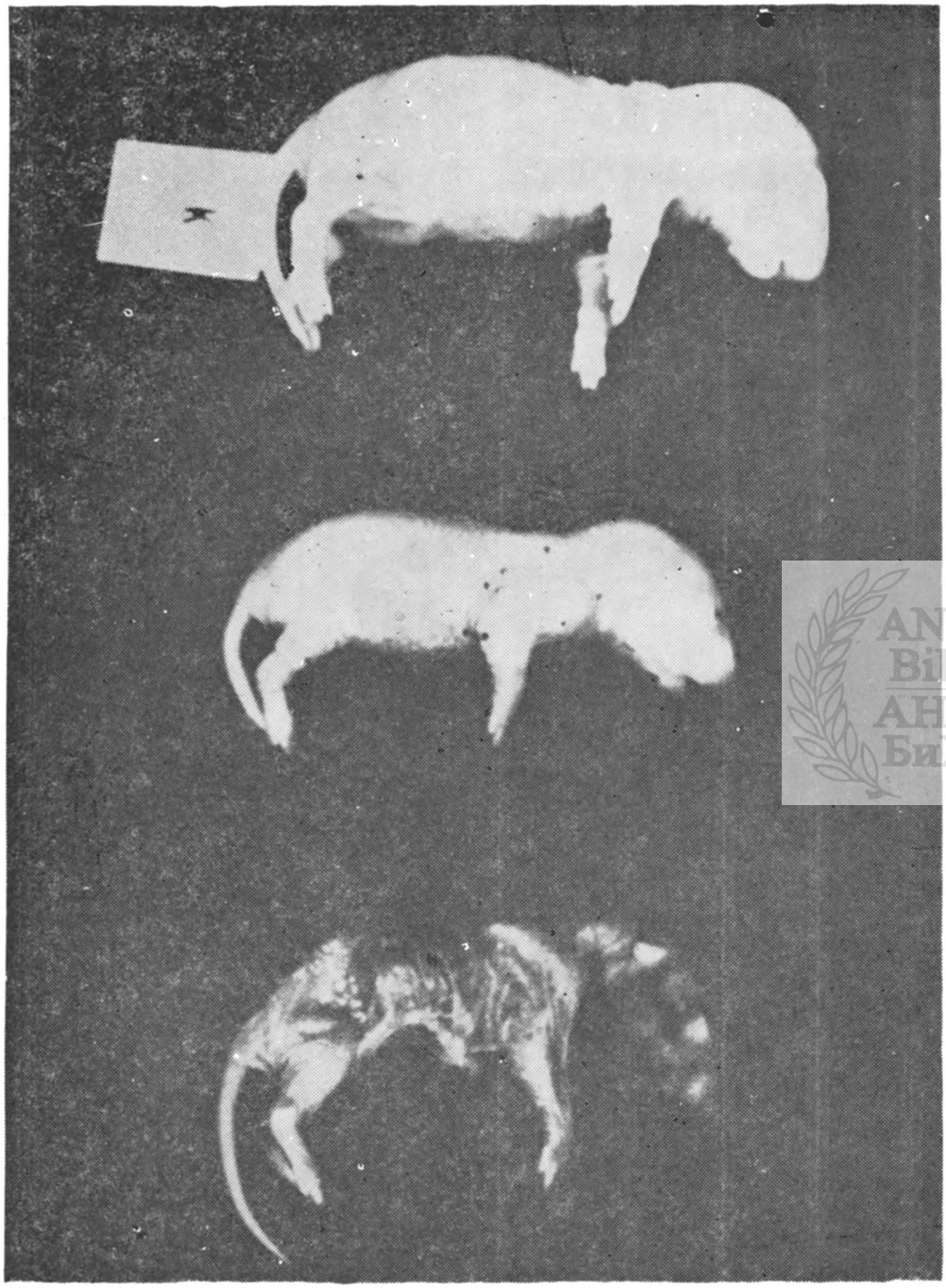
Broj ženki	Vrijeme latence	Vrijeme oporavka	Ekscitacija	Klonulost	Tahipnea	Drhtanje	Kolaps
1	1	1,5	++	+	+	—	—
2	1	1	+	++	—	—	—
3	1	1	++	+	+	—	—
4	2	1	++	++	—	—	—
5	1	1,5	++	++	+	—	—
6	2	2	++	++	+	+	—
7	2	1	++	+++	—	+	—
8	1	1,5	++	++	+	—	—
9	1	1,0	+++	++	+	—	—
10	2	1,0	++	++	+	—	—
11	2	1,5	+++	++	—	—	—
12	1	2	++	+++	+	+	—
13	2	2	+++	++	+	—	—
14	2	2	++	++	—	+	—
15	1	2	+++	++	++	—	—
16	1	1	+++	++	+	—	—

Tabela 2. HEMATOLOŠKE PROMJENE POD UTICAJEM LAKOG BENZINA 0,2—U10 U I GESTACIONOM PERIODU

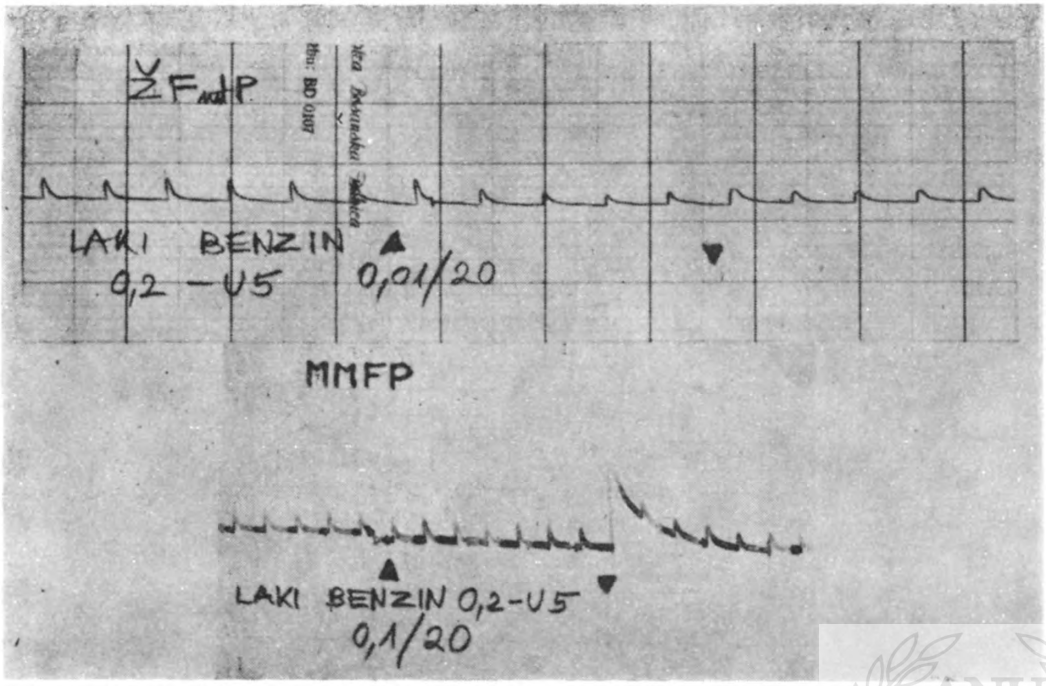
Ispitivane vrijednosti $(n = \frac{32}{2})$	Eritrociti	Leukociti	Hemoglobin	Retikulociti
X na početku eksperimenta	6,750.630	10516,8	70,31	36,13
X na kraju eksperimenta	6,303.130	9415,6	66,25	30,56
t test	4,77 S p < 0,01	3,28 p < 0,01	3,19 S p < 0,01	6,45 S p < 0,01

HEMATOLOŠKE PROMJENE NASTALE U II GESTACIONOM PERIODU

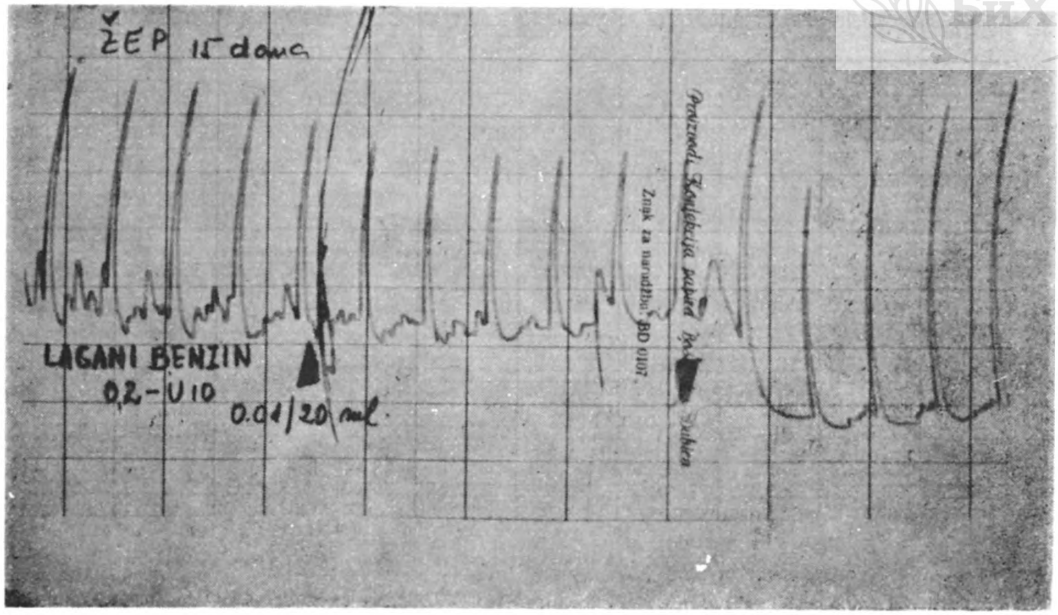
Ispitivane vrijednosti $(n = \frac{32}{2})$	Eritrociti	Leukociti	Hemoglobin	Retikulociti
X na početku eksperimenta	6,701.880	11437,5	79,88	32,13
X na kraju eksperimenta	6,450.000	10287,5	73,38	26,69
t test	1,80	1,42	4,91	1,12



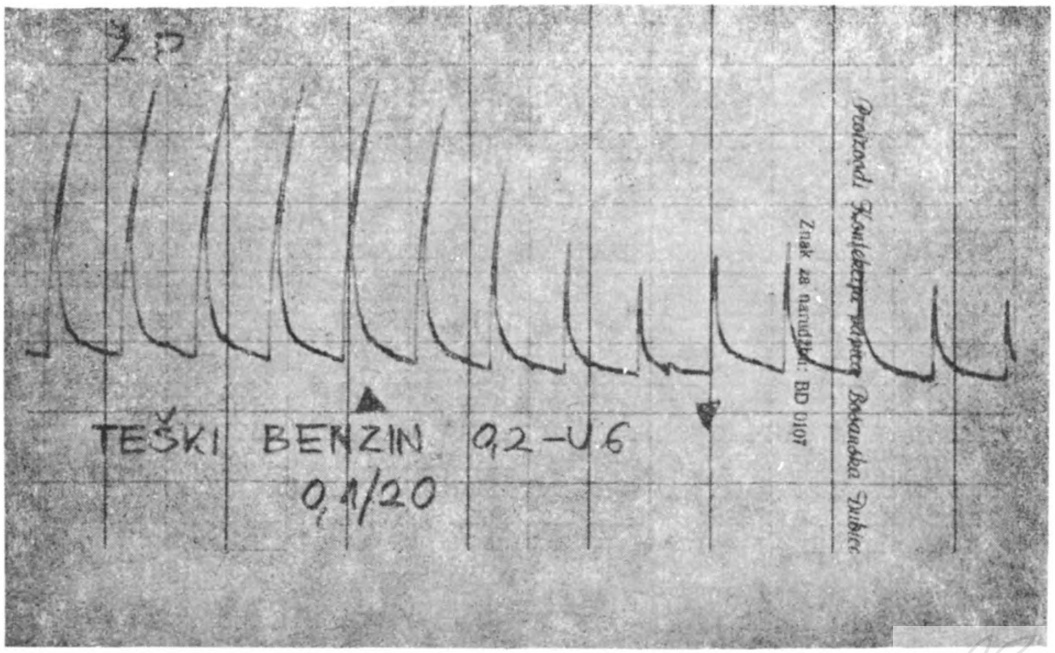
Slika 1. Prikazani su jedan neonatus pacova kontrolne grupe i dva tek rođena pacova od ženki koje su bile inhalirane sa trihloretilenom. Vidi se razlika u veličini, a također postoji i razlika u boji kože (jedan je mrtvorođen).



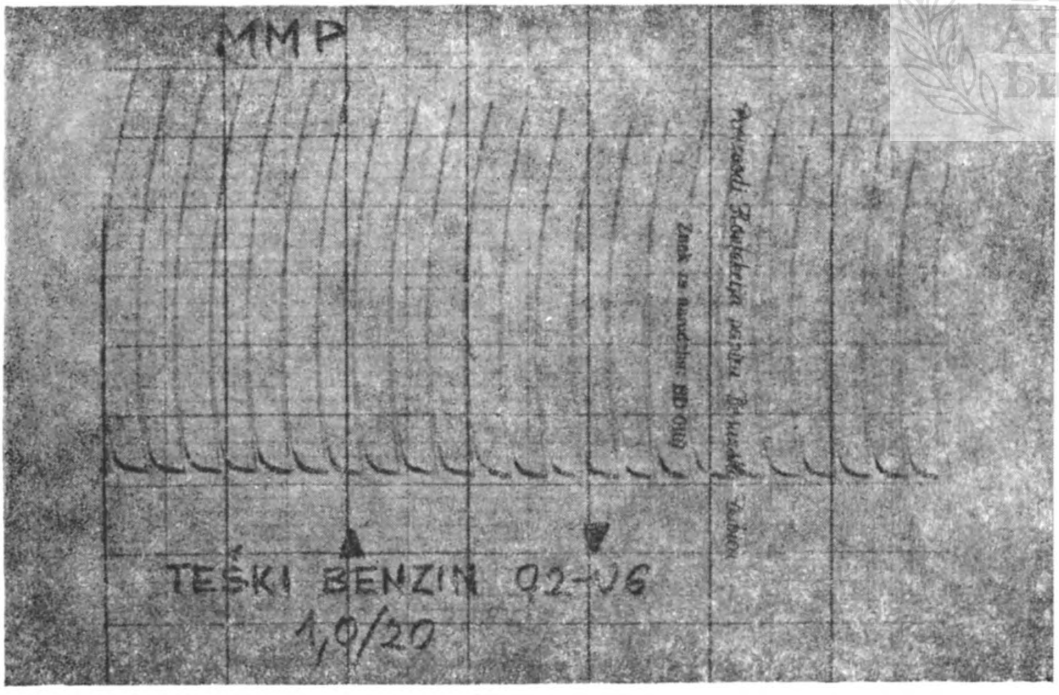
Slika 2. Efekti lakog benzina 0,2—U5 na mišićne kontrakcije izolovanog želuca i mokraćnog mjehura iz fetusa pacova. Kod znaka ▲ dodat je benzin u vodeno kupatilo, a kod znaka ▼ je isprano



Slika 3. Kontrakcije izolovanog inerviranog želuca pacova starog petnaest dana. Kod znaka ▲ dodat je lagani benzin 0,2—U10 u koncentraciji od 0,01/20 ml, a kod znaka ▼ izvršeno je ispiranje

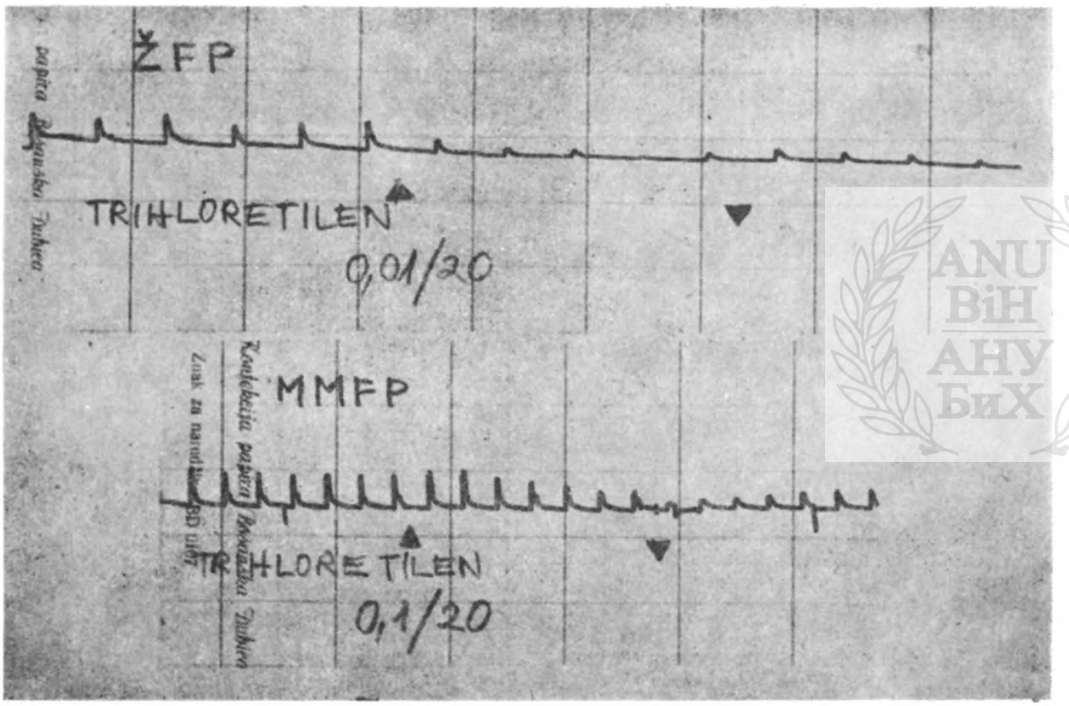


Slika 4. Kontrakcije izolovanog želuca pacova. Kod znaka ▲ dodat je teški benzin 0,2—U6, a kod znaka ▼ izvršeno je ispiranje. Visina kontrakcije se ne vraća na kontrolne vrijednosti



Slika 5. Kontrakcije izolovanog inerviranog mokraćnog mjehura pacova. Kod znaka ▼ dodat je teški benzin 0,2—U6, a kod znaka ▼ izvršeno je ispiranje

Vanjskim pregledom fetusa, kao i tek rođenih životinja ustanovili smo da je jedino primjena trihloretilena od svih ispitivanih supstanci dovela do poremećaja razvoja u smislu rađanja mladunčadi koja su bila bljeđa i manje težine u odnosu na mladunčad ostalih oglednih i kontrolnih ženki (slika 1). Također je bilo mrtvorođenih mladunčadi, a 4 ženke su egzitirale u toku eksperimenta. Aplikacija lakih i teških benzina u koncentraciji od 0,01; 0,1 i 1,0/20 ml Tirode dovela je do smanjenja kontrakcija izazvanih električnom stimulacijom želuca i mokraćnog mjehura izolovanih iz fetusa (slika 2), neonatusa (slika 3) i odraslih ženki. Ovi efekti su bili jače izraženi kod primjene teških benzina (slika 4, 5), tako da se nakon ispiranja kupatila visina kontrakcija nije vraćala na kontrolne vrijednosti.



Slika 2. Efekti trihloretilena na izolovanom inerviranom humanom ureteru. Gornji dio slike: trihloretilen u koncentraciji 7 · 10—3 M. Donji dio slike: trihloretilen u koncentraciji 150 · 10—3 M

Trihloretilen je ispoljio također depresivan efekat na proces neuromišićne transmisije na svim ispitivanim organima, tako da je smanjenje visine izazvanih kontrakcija želuca fetusa bilo izrazito već kod primjene najmanje doze od 0,01/20 ml, a efekat je bio ireverzibilan (slika 6). Osjetljivost na aplikaciju supstanci je bila više izražena kod organa izolovanih iz mlađih životinja u odnosu na odrasle ženke. Jačina efekta je bila proporcionalna datoj dozi.

DISKUSIJA I ZAKLJUČCI

Izlažući gravidne ženke pacova parama benzina i trihloretilena u ozi od 0,5/4500 ml dobili smo izraženu sliku trovanja koja je varirala ovisnosti od upotrebljenog rastvarača, ali su kod svih ženki bili izra-ni narkotički simptomi. Neurološki simptomi, kao što su pojava fi-og tremora pa do grčeva pojedinih mišića, se uklapaju u već ranije pisanu sliku trovanja ovim organskim rastvaračima (C a r p e n t e r, 978; T u c k e r, 1981). Među ispitivanim supstancama trihloretilen je okazao najjači neurotropizam.

Ispitujući njihovo djelovanje na neuromišićnoj spojnici pokaza-smo da i na najmlađim strukturama, kao što su to izolovani inervi-ani organi fetusa (želudac i mokraćni mjehur), ispitivani rastvarači ıanifestuju svoje inhibitorno djelovanje, koje je jače izraženo što su napse mlađe. Tako su dobiveni efekti na izolovanim organima tek ro-enih životinja jače izraženi nego kod odraslih. Ovi efekti su bili pro-orcionalni datoj dozi rastvarača, a inhibicija prenosa impulsa kroz si-apsu je bila ireverzibilna kod teško isparljivih benzina kao i kod tri-loretilena, vjerovatno kao posljedica težih promjena u propustljivosti ıembrane. Što se tiče osjetljivosti organa, jači efekti su dobiveni na ıastričnim nervima želuca nego na pelvičnim nervima mokraćnog mje-ura.

Dobiveni rezultati hematoloških pretraga ukazuju na smanjenu egeneratornu moć krvi (smanjen broj eritrocita, retikulocita i hemo-lobina), što je u skladu sa navedenim istraživanjima drugih autora R a o i P a n d y a, 1980; F u j i t a i sar., 1984). Pomijeranje unutar di-erencijalne krvne slike u smislu relativne limfocitoze govori o reakciji rvi na unesene toksine.

Ispitujući djelovanje benzina kao i trihloretilena na formiranje loda, ustanovili smo da, iako nisu nađene morfološki vidljive defor-ıacije fetusa i mladunčadi, trihloretilen je kao najjači upotrebljeni ›ksin u ovoj studiji uticao na razvoj mladunčadi, tako da su se javlja-ı i mrtvorođena mladunčad (M a u s o n, 1984). Također je primjena ·ihloretilena i u ovim malim koncentracijama bila dovoljna da izazove ginuće gravidnih ženki.

Ispoljena izrazita toksičnost ispitivanih organskih rastvarača na iše sistema dokazana in vivo, kao i ispitivanjem in vitro, u ovom ek-perimentu upućuje na opravdanost daljeg sistematskog izučavanja me-anizama njihovog dejstva.

ECOTOXICOLOGICAL RISC INVESTIGATION OF INHALED LIGHT AND HEAVY BENZINE VAPOURS AS WELL AS TRICHLOROETHYLENE IN THE COURSE OF GESTATION

Summary

Organic dissolvers from the group of petroleum hydrocarbons (lighht and eavay benzines) were investigated as well as trichloroethylene, and their influen-e on the process of embryogenesis and neuromuscular transmission in rats. 16 female rats of the Wistar species (160 experimental and 56 controlling) were

used. During the first and the second gestation period the experimental females were treated with organic dissolvers in an inhalatory dose of 0.5/4500 ml. Clinical signs of intoxication and haematologic changes were observed in the course of the experiment. Two to three days before delivery half of the experimental females were killed, and their foetuses investigated and taken out. The stomach and the urinary bladder were isolated from females, their youngs and foetuses, and the neuromuscular transmission was investigated. The results of the investigation showed that all the examined organic dissolvers caused clinical signs of intoxication in the gravid females with changes of haematologic parameters. Trichloroethylene only influenced the process of development causing the birth of the young of a reduced weight and deaths. All the examined organic dissolvers manifested an inhibitory effect on the neuromuscular synapsis function of the foetuses, young and grown females.

LITERATURA

Carpenter, C. P., Geary, L. D., Myers, R. C., et al.: *Petroleum Hydrocarbons Toxicity Studies XVI, Animal Response to N-Nonane Vapor,* Toxicol. Appl. Pharmacol. 44/1, 53—61, 1978.

Cavanaugh, K. P., Goldsmith, A. R., Holmes, W. N. and Follet, B. K. et al.: *Effects of Ingested Petroleum on the Plasma Prolactin Levels During Incubation and on the Breeding Succes of Paired Mallard Ducks.* Arch. Environ. Contam. Toxicol. 12/3, 335—341, 1983.

Ellenton, J. S.: *Teratogenic activity of aliphatic and aromatic fractions of Prudhoe Bay crude and fuel oil in the chicken embryo,* Toxicol. Appl. Pharmacol. 63.209—215, 1982.

Hajimirgha, H., Ewers, U., Jansen-Rosseck, R. and Brockhaus, A. et al.: *Human Exposure to Volatile Halogenated Hydrocarbons from the General Environment.* Int. Arch. Occup. Environ. Health, 58/2, 141—150, 1986.

Fujita, H., Koizumi, A., Yamamoto, M. et al.: *Inhibition of Aminolevulinate Dehydratase in Trichloroethylene Exposed Rats and the Effect of Heme Regulation.* Biochim, Biophys, Acta Ser. Gen. Subj., 800/1, 1—10, 1984.

Hoffman, D. J.: *Embryotoxic and Teratogenic Effects of Crude Oil on Mallard Embryos one Day of Development.* Bull. Environm. Contam. Toxicol, 22, 632—637, 1979.

Huković, S. i Bubić, I.: *Problemi autonomne inervacije mokraćnog mjehura. Izolirani mokraćni mjehur s autonomnim nervima štakora i miša kao model za farmakološka istraživanja,* Acta Medica Iugoslavica, 17, 279—239, 1963.

Huković, S., Begić, M. i Radivojević, M.: *Izolirani želudac štakora i miša sa pripadajućim nervima kao model sistem za ispitivanje u farmakologiji.* Radovi ANU BiH, 40, Odjeljenje medicinskih nauka, 15, 11—118, 1967.

Mauson, J. M., Murphy, M., Richdale, N. and Smith, M. K.: et al.: *Effects of Oral Exposure to Trichloroethylene on Female Reproductive Function.* Toxicology, 32/3, 229—242, 1984.

Rao, G. S. and Pandya, K. P.: *Hepatic Metabolism of Heme in Rats After Exposure to Benzene, Gasoline and Kerosene.* Arch. Toxicol. 46, 313—317, 1980.

Tucker, A. N., Sanders, V. M., Barnes, D. W. et al.: *Toxicology of trichloroethylene in the Mouse.* Toxicol Appl. Pharmacol, 62, 351—375, 1981.

Zenick, H., Blackburn, K., Hope, E. et al.: *Effects of Trichloroethylene Exposure on Male Reproductive Function in Rats.* Toxicology, 31/3—4, 237—250, 1984.

Withey, J. R. and Karpinch, K.: *The Fetal Distribution of Some Aliphatic Chlorinated Hydrocarbons in the Rat After Vapor Phase Exposure,* Biol. Res. Pregnancy Perinatal., 6/2, 79—88, 1985.

TOKSIKOLOŠKE METODE ISPITIVANJA NA IZOLOVANIM ORGANIMA PREPARIRANIM IZ USNE ŠUPLJINE

ELVEDINA KAPIĆ
Institut za farmakologiju i toksikologiju Medicinskog fakulteta, Sarajevo

UDC 615.9:616.31

Apstrakt. Jedan od najčešćih puteva ulaska ekotoksina u organizam su usta, pa je pokušano da se nađe pogodan model-sistem iz usta i ždrijela da bi se ustanovio neposredan uticaj ekotoksina. Opisani su model-sistemi, izolirani inervirani organi, i to mišići jezika sa pripadajućim nervima i mišićni dio ždrijela sa ograncima motornih nerava, i korišteni su za ispitivanje djelovanja organskih otapala i soli teških metala. Pokazano je da je djelovanje navedenih ksenobiotika dvofazno. U manjim koncentracijama u početku povećavaju efekt stimulacije, a zatim dolazi do smanjenja efekta stimulacije pripadajućih nerava. Opisani izolirani inervirani organi mogu poslužiti u analizi djelovanja i otrovnosti pomenutih materijala.

Ključne riječi: izolirani organi, stomatologija, organska otapala, teški metali.

UVOD

U okruženju čovjeka se nalazi veliki broj ksenobiotika i ekotoksina, čiji je glavni put unošenje u organizam ustima ili udisanjem. Djelovanje i kinetika ksenobiotika je drugačija ovisno o putu unošenja (Bielsen and Anderson, 1989). Ksenobiotici mogu imati akutan direktan toksičan efekt na sluznici usta ili na mišićnim strukturama jezika i farinksa, ali je na neuromišićnu transmisiju vjerovatniji njihov efekat nakon resorpcije, tj. djelovati iz krvi na mišiće jezika i farinksa.

Lokalni — direktni toksički efekt, odnosno indirektni efekt na strukture usta se rijetko ispituju u laboratoriju na životinjama, a pogotovu na izolovanim strukturama iz usta. U toksikološkim ispitivanjima dolaze u obzir farmakološki metodi ispitivanja kao poseban metod toksikoloških ispitivanja jer se tako mogu ustanoviti djelovanja otrova a dijelom i kinetika, odnosno kretanje toksina. Inače, opisane su brojne uspješne farmakološke metode u toksikologiji (Zbinden and Gross, 1979).

Ovaj rad je potpomognut sredstvima Saveznog sekretarijata za razvoj, Beograd.

Konvencionalne toksikološke analize uglavnom otkrivaju biohe mijske promjene parametara i promjene struktura, a manje promjen funkcija, odnosno djelovanja toksina. Kod trovanja, međutim, dolaze u obzir klinički simptomi i znaci kao što su slabost, glavobolja, tremor simptomi sa strane gastrointestinalnog trakta, palpitacije, pa sve d težih disfunkcija kardiovaskularnog trakta, CNS, endokrinog sistema.

Stomatolog može doći u kontakt sa više ksenobiotika, kao što s na pr. živa, fenolski spojevi i sl. Scarlett i sar. (1988) su našli u kosi stomatologa dva puta više žive nego kod kontrola (3± 0,6 ppm).

Simptomi trovanja metalima mogu ukazati na poremećaj neuro mišićne transmisije. Isto tako, u akutnim trovanjima sa organskim ota palima dolazi do poremećaja koji ukazuju na poremećaje nervnog i mo tornog sistema.

Cilj ovog rada je da opiše promjene reakcije mišića farinksa jezika pod uticajem organskih otapala i teških metala. Organska ota pala su benzen, ksilen i trihloretilen, a soli metala su živin hlorid olovni acetat.

METODE

Eksperimenti su se vršili na izoliranim organima sa njima pripa dajućim nervima. Ksenobiotik je bio injiciran u posudu za izolovan organe koji su u isto vrijeme bili električki stimulirani preko pripada jućih motornih nerava. Prati se promjena izazvanih kontrakcija i pro mjena bazalne linije.

Eksperimentalne životinje su bili bijeli domaći miševi prosječn težine od 20 g i Wistar štakori težine 200 g. Životinje su nabavljene iz vivarija Vinča i iz domaćeg legla. Nakon dekapitacije prepariraju s slijedeći organi: izolovani jezik sa pripadajućim motornim nervom farinks sa pripadajućim motornim nervom. U prvom slučaju se iz jezi ka preparira tanak longitudinalni nerv sa vidljivim motornim nervom koji se golim okom može primijetiti kako ulazi u mišić. U slučaju kad se preparira farinks, onda se preparira počevši od granice usta do gor njeg dijela ezofagusa. Nervi za farinks se prepariraju tako da se u tra heju koja je usko priljubljena uz ezofagus uvede elektroda i transmu ralno stimulira traheja. Kao rezultat pomenute stimulacije, kontrahira ju se mišići farinksa.

Nakon preparacije organ se stavi u posudu za izolovane organe koja sadrži 20 ml Tyrodeove otopine. Tyrodeova otopina se zagrijava na 32°C, aerira sa kiseonikom. Pripadajući motorni nerv se uvlači u bipolar nu elektrodu. Kod preparacije izolovanog farinksa se motorni nervi sti muliraju tako da se transmuralno stimulira kranijalni dio traheje, a iz među nerava traheje i mišića farinksa postoji veza i dolazi do kontrak cije mišića farinksa na takvu stimulaciju.

Stimulacija pripadajućih nerava se vrši na dva načina. Prvi način je tetanička stimulacija svake minute u trajanju od jedne sekunde. Pa rametri takve tetaničke stimulacije su 10 Hz, 10 mA, 1 mSek. Drugi na

čin stimulacije je samo jednim kvadratičnim impulsom slijedećih parametara: 10 mA, 1 Hz, 1 mSek, a impuls se ponavlja svakih deset sekundi. Posuda u kojoj se nalazi organ se ispire svakih deset minuta ukoliko se ne ispire učestalije nakon davanja ksenobiotika.

Mišićni dio organa je spojen izometrijskim transducerom. Mjeri se sila mišića. Visina izazvanih kontrakcija se mijenja pod uticajem ksenobiotika ovisno od vrste i koncentracije. Kontrola se vrši prije i poslije dodavanja ksenobiotika, i vrši se upoređivanje. Ksenobiotici koji su injicirani su bili: otapala benzen, ksilol, trihloretilen i soli metala: živin hlorid i olovni acetat.

REZULTATI

Rezultati se mogu podijeliti u opis svojstava nove preparacije i opis djelovanja ksenobiotika.

1. Efekt stimulacije pripadajućih motornih nerava

Efekt stimulacije pripadajućih motornih nerava je kontrakcija izoliranih poprečno prugastih mišića farinksa i jezika. Konstantni električni podražaji u konstantnim intervalima izazivaju podjednake kontrakcije. Kontrakcije su brze i jednofazne. Mogu se ponavljati a da se ne smanji visina izazvanih kontrakcija, ukoliko se stimulacija ponavlja u propisanim intervalima, te ukoliko je oksigenacija obilna. Tetaničke izazvane kontrakcije sa stimulusima od 10 Hz su veće, dulje traju i mogu imati dvofazni karakter, tj. prvo će doći do brze kontrakcije, iza čega slijedi sporija, ali manja kontrakcija. Ukoliko oksigenacija nije dovoljna, relativno brzo će opadati visina izazvanih kontrakcija mišića jezika. Izolovani mišići farinksa su manje osjetljivi na hipoksiju.

2. Uticaj ksenobiotika otapala

Od ksenobiotika otapala su primijenjeni benzen, ksilen i trihloretilen. Benzen će ovisno od koncentracije dovesti prvo do povećanja visine izazvanih kontrakcija oba tipa mišića. Pražna koncentracija kod koje još može da se registruje efekt benzena je 10^{-4} mola. Sa većom koncentracijom benzena se registruju veći efekti. U dvostruko većoj koncentraciji od pražne koncentracije će doći ne samo do povećanja visine izazvanih kontrakcija nego se povećava bazalna linija — tonus. Nakon ispiranja benzena visina izazvanih kontrakcija i bazalna linija se postepeno vraćaju na kontrolne vrijednosti. Ukoliko benzen ostane dulje vremena u posudi za izolirane organe, onda se visina kontrakcija polako vraća na kontrolne vrijednosti, a zatim i ispod kontrolnih vrijednosti. Drugo otapalo upotrijebljeno u ovom radu je bio ksilen, odnosno dimetilbenzen. Za razliku od benzena, ksilen će smanjivati efekt stimulacije pripadajućih nerava. Registrovane su slične promjene bez obzira na oblik stimulacije, tj. nakon tetaničke ili nakon pojedinačne stimulacije. Trihloretilen kao organsko otapalo ima povećavajući uticaj na efekt

stimulacije pripadajućih nerava. Efekt stimulacije motornih nerava farinksa će biti pojačan pod uticajem trihloretilena u koncentraciji 10^{-4} mola. Ukoliko je koncentracija veća, reakcija je dvofazna, tj. poslije početnog povećanja, dolazi do smanjenja efekta stimulacije, tj. do smanjenja visine izazvanih kontrakcija. Djelovanje je isto i sa tetaničkom ili pojedinačnom stimulacijom.

3. Uticaj ksenobiotika metala

Ispitivani su efekti živinih i olovnih soli. Živin hlorid u koncentraciji 10^{-5} mola će povećati visinu izazvanih kontrakcija mišića farinksa i jezika. Uz povećanje visine izazvanih kontrakcija, doći će do povećanja bazalne linije. Ovisno od koncentracije živinih iona, povećanje će biti veće do određene koncentracije od 10^{-3} mola, kad će doći do dvofazne reakcije, tj. kad će od početnog povećanja dolaziti do smanjenja visine izazvanih kontrakcija. Nakon ispiranja, ovisno od koncentracije, će ostati povećana visina kontrakcija ako se radilo o manjim dozama, dok će nakon većih koncentracija (10^{-3} mola), nakon ispiranja doći do paralize efekta nervne stimulacije.

Drugi ispitivani metalni ksenobiotik je bio olovni acetat. Olovo, ovisno od doze, povećava efekt stimulacije motornih nerava. Početna doza, kad se može registrovati efekt olova, je 10^{-5} mola. U većim koncentracijama se registruje dvofazan efekt, tj. prvo će doći do povećanja iza čega slijedi smanjenje efekta stimulacije. Nakon ispiranja efekt stimulacije se sporo vraća na kontrolne vrijednosti.

DISKUSIJA

Opisane su dvije preparacije izolovanih organa iz usne šupljine, i to izolovani mišić jezika i izolovani mišić farinksa koji se sa pripadajućim nervima stavljaju u uslove in vitro, te se na njima vrše ispitivanja ksenobiotika. Radi se o poprečno-prugastim mišićima, čija je neurotransmisija farmakološki nikotinskog tipa i veoma slična neurotransmisiji skeletnih mišića. Nervi su holinergični po tipu somatski nervi. Stimulacijom motornih nerava će se dobiti kontrakcije tetaničkog ili pojedinačnog tipa. Farmaci, toksini i ksenobiotici, ovisno od doze, će povećavati ili smanjivati visinu izazvanih kontrakcija i bazalnu liniju sa koje polaze kontrakcije.

Ksenobiotici, toksini koji se nalaze u okolini, prostoru radne sredine, između ostalih su organska otapala i teški metali. Otapala ispitivana u ovom radu su benzen, ksilen i trihloretilen, a teški metali su soli žive i olova. Pomenuta otpala, posebno benzen i derivati, su poznati kao supstance koje u uslovima in vitro mogu inhibirati enzime, a za metale je poznato da, osim inhibicije enzima, dovode do oslobađanja autakoida i neurotransmitora (R u i s et al., 1988; M c I n t o s h et al., 1989; O u d a r et al., 1989). Povećanje efekta stimulacije pripadajućih nerava u akutnom eksperimentu sa benzenom je vjerovatno rezultat aktivacije protein kinaze C; protein kinaza C je enzim potreban za transdukciju

signala (Da Silva et al., 1989). Benzen je poznati multipotencijalni kancerogen koji u organizam ulazi inhalacijom i oralno (Maltoni et al., 1989).

Što se tiče trihloretilena i sličnih spojeva i njegovog efekta na organe i tkiva, razlikuju se slabometabolizirajući i dobrometabolizirajući solventi. Trihloretilen spada u dobrometabolizirajuće. Za ispitivanje njihovog djelovanja razrađene su posebne metode i modeli (Droz et al., 1989, Opdam and Smolder, 1989). U ovom eksperimentu trihloretilen je djelovao stimulantno na efekt stimulacije pripadajućih nerava. Trihloretilen je hepatokancerogen u mišijoj jetri (Crebelli and Carera, 1989).

Ovisno od doze, soli žive i olova djeluju dvofazno. U manjim koncentracijama će povećati efekt stimulacije nerava, dok će u većim koncentracijama djelovati dvofazno, i to prvo će povećati efekt stimulacije nerava da kasnije dođe do smanjenja. Živa je ksenobiotik i toksin sa kojom stomatolozi imaju čest kontakt. U kosi stomatologa je dva puta više žive nego kod kontrola (Scarlett et al., 1988). Pare žive oštećuju fetuse stomatološkinja (Gelbier and Ingram, 1989). Akutni biološki efekt žive na izoliranim mišićima jezika i farinksa je vjerovatno posljedica inhibicije holinesteraze i ujedno oslobađanja neurotransmitora (Hare et al., 1989).

Danas se mnogo piše o djelovanju olova, toksina koji djeluje na više organa. Posebno se diskutuje da li male doze olova mogu dovesti do zaostalosti djece i starijih (Cory-Slechta et. al., 1989). Drugi tvrde da male doze olova nemaju dokazane veze sa zaostalošću djece (Cooney et al., 1989). Olovni ioni u ovom akutnom eksperimentu su doveli do povećanja efekta stimulacije nerava. Vjerovatno je efekt olova u ovom eksperimentu dijelom bio preko Ca^{++} (Rius et al., 1988).

Izolirani mišići farinksa i jezika su pogodni modeli iz usne šupljine da se na njima može ispitivati djelovanje ksenobiotika. Derivati petroleumske industrije, benzen i slični spojevi se očituju u ovim eksperimentima sa povećanjem efekta stimulacije motornih nerava. Ioni metala također povećavaju efekt stimulacije motornih nerava. Pomenuti model-sistemi mogu dakle poslužiti u analizi toksičnih efekata raznih ksenobiotika.

PHARMACOLOGICAL METHODS IN TOXICOLOGY ON THE ISOLATED INNERVATED ORGANS FROM THE MOUTH

Summary

Isolated and innervated organs from the mouth were prepared. They were strited muscles from the tongue and from the farinx. They were prepared with the motore nerve and set up in an isolated organ bath. The induced contractions were recorded and the xenobiotics-ecotoxins were injected. The toxins were benzen and derivatives, trichlorethilen, mercury and lead. It was found that they increase the effect of nerve stimulation, they increased the height of induced conctractions, depending on concentration. The explanation of the effect was that they inhibit enzymes and they free the neurotransmittors.

LITERATURA

Bielsen, J. B. and Andersen, O.: *Effects of Dose on Intestinal Absorption and Relative Organ Distribution.* Toxicology, 59, 1—10, 1989.

Cooney, G. H., Bell, A., McBride, W., and Carter, C.: *Low-Level Exposures to Lead: The Sydney Lead Study.* Dev. Med. Child Neurol. 31, 640—649, 1989.

Cory-Slechta, D. A., Weiss, B. and Cox, C.: *Tissue Distribution of Pb in Adult vs. Old Rats: A Pilot Study.* Toxicology, 59, 139—150, 1989.

Crebelli, R. and Carera, A.: *Genetic Toxicology of I, I, 2, — trichloroethylene.* Mutat. Res. 221, II—37, 1989.

Da Silva, C., Fan, X. and Castagna, M.: *Benzene-Mediated Protein Kinase C Activation.* Environ. Health Perspect. 82, 91—95, 1989.

Droz, P. O., Wu, M. M. and Cumberland, W. G.: *Variability in Biological Monitoring of Organic Solvent Exposure. II. Application of a Population Physiological Model.* Br. J. Ind. Med., 46, 547—558, 1989.

Gelbier, S. and Ingram, J.: *Possible Foetotoxic Effects of Mercury Vapour: A Case Report.* Public Health, 103, 35—40, 1989.

Hare, M. F., Minnema, D. J., Cooper, G. P. and Michaelson, I. A.: *Effects of Mercuric Chloride on (^3H) dopamine Release From Rat Brain Striatal Synaptosomes.* Toxicol. Appl. Pharmacol. 99, 266—275, 1989.

McIntosh, M. J., Meredith, P. A., Moore, M. R. and Goldberg, A.: *Action of Lead on Neurotransmission in Rats.* Xenobiotica, 19, 101—113, 1989.

Maltoni, C., Ciliberti, A., Cotti, G. et al.: *Benzene, an Experimental Multipotential Carcinogen: Results of the Long-Term Bioassays Performed at the Bologna Institute of Oncology.* Environ. Health Perspect, 82, 109—124, 1989.

Opdam, J. J. G. and Smolders, J. F. J.: *A Method for the Retrospective Estimation of the Individual Respiratory Intake of a Highly and a Poorly Metabolising Solvent During Rest and Physical Exercise.* Br. J. Ind. Med., 46, 250—260, 1989.

Oudar, P., Caillard, L. and Fillion, G.: *The Effects of Inorganic Lead on the Spontaneous and Potassium-Evoked Release of ^3H-5-HT from Rat Cortical Synaptosome Interaction with Calcium.* Pharmacol. Toxicol. 64, 459—463, 1989.

Rius, R. A., Govoni, S., Bergamaschi, S. et al.: *Mechanisms of the Effect of Lead on Brain Neurotransmission: A Calcium Mediated Action.* Sci. Total Environ. 71, 441—448, 1988.

Scarlett, J. M., Gutenmann, W. H. and Lisk, D. J.: *A Study of Mercury in the Hair of Dentists and Dental — Related Professionals in 1985 and Subcohort Comparasion of 1972 and 1985 Mercury Hair Levels.* Toxicol. Environ Health 25, 373—381, 1988.

Zbinden, G. and Gross, F.: *Pharmacological Methods in Toxicology,* Pergamon Press, Oxford, 1979.

DJELOVANJE EKOTOKSINA NA IZOLOVANI INERVIRANI HUMANI URETER

IRIS RAJMAN, BORIS VUJOVIĆ i SEID HUKOVIĆ
Institut za farmakologiju i toksikologiju Medicinskog fakulteta, Sarajevo

UDC 615.017:502

Apstrakt. Posmatran je motilitet izolovanog inerviranog humanog uretera dobijenog nakon odgovarajućih hirurških intervencija u zavisnosti od djelovanja ekotoksina. Kontrakcije su mjerene izometrijski nakon stimulacije električnom strujom. Ispitivano je djelovanje organskih rastvarača: benzola, ksilola i trihloretilena u raznim koncentracijama. Početna istraživanja ukazuju na to da benzol i trihloretilen smanjuju efekt električne stimulacije, i to u dozno ovisnom obliku. Ksilol povećava efekt stimulacije.

Preparacija izolovanog inerviranog humanog uretera nije do sada korištena za istraživanja u toksikologiji. U radu su prezentirani rezultati početnih istraživanja na izolovanom inerviranom humanom ureteru, čija se preparacija pokazala kao pogodna za buduća istraživanja u toksikologiji.

Ključne riječi: humani ureter, in vitro, benzol, ksilol, trihloretilen.

UVOD

Istraživanja na humanim izolovanim inerviranim tkivima in vitro su rijetka u toksikologiji. Razlog za to je, pored poštovanja etičkih principa, i manja mogućnost dobivanja uzoraka humanog tkiva za rad in vitro.

Humani izolovani ureter nije često korišten u istraživanjima (Lembeck, 1988). Ekotoksini čije je djelovanje ispitivano u ovom radu su organski rastvarači: benzol, ksilol i trihloretilen. Ove supstance se već dugo koriste u industriji kao rastvarači, ali i kao osnove za sintezu drugih hemijskih supstanci. Posebno se koriste u proizvodnji boja i plastike, te u industriji kože i gume. U organizam ove supstance uglavnom dospjevaju inhalacionim putem i mogu izazvati simptome akutnog ili hroničnog trovanja, od nadražaja gastro-intestinalnog trakta do depresije CNS-a i oštećenja koštane srži (Curtis, 1985; Casarett i Doull, 1986). Toksični efekti su uglavnom posljedica nastanka aktivnih metabolita, poput fenola i njemu sličnih supstanci (Snyder et al., 1981).

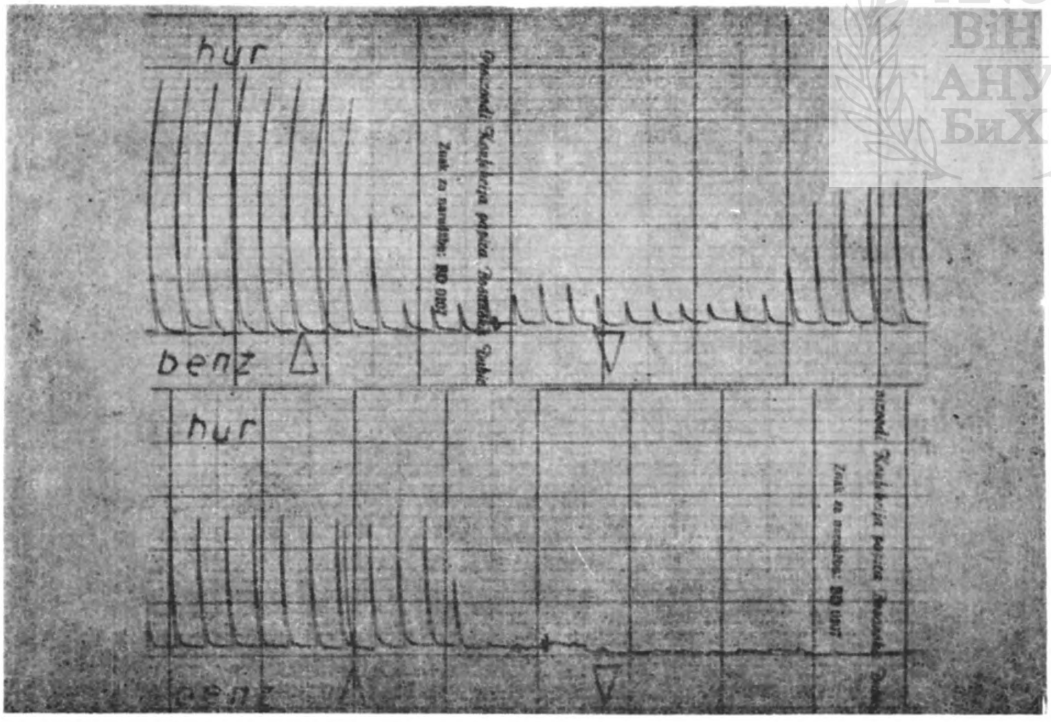
Cilj ovog rada je bio da se ispita djelovanje navedenih organskih rastvarača na glatku muskulaturu humanog uretera kao i da se ispita mogućnost korištenja izolovanog inerviranog humanog uretera za dalja istraživanja u toksikologiji.

MATERIJAL I METODE

Dijelovi humanih uretera koji su korišteni za rad pri ispitivanju pripremljeni su za rad klasičnim metodama rada sa izolovanim inerviranim organima u uslovima elektrostimulacije.

Odmah nakon odstranjivanja iz organizma u toku odgovarajućih operacija (transplantacija bubrega ili nefrektomija), dio uretera dužine 1—2 cm se stavlja u Tyrodeov rastvor i brzo prenosi u kupatilo za izolovane organe. Taj dio uretera se ostavlja u 20 ml oksigenirane Tyrodeove otopine zagrijane na 32° C. Pošto je vrijeme potrebno za adaptaciju tkiva dugo, ureter se ostavlja u kupatilu za izolovane organe bar 20 sati.

Proksimalni kraj uretera se poveže sa izometrijskim transducerom, a distalni kraj se veže za platinske elektrode od kojih se jedna uvuče u lumen uretera, a druga je izvan lumena. Električna stimulacija je vršena svake minute u trajanju od 1 sec električnom strujom jačine 30 mA, frekvence 20 Hz i širine impulsa od 1 msec.

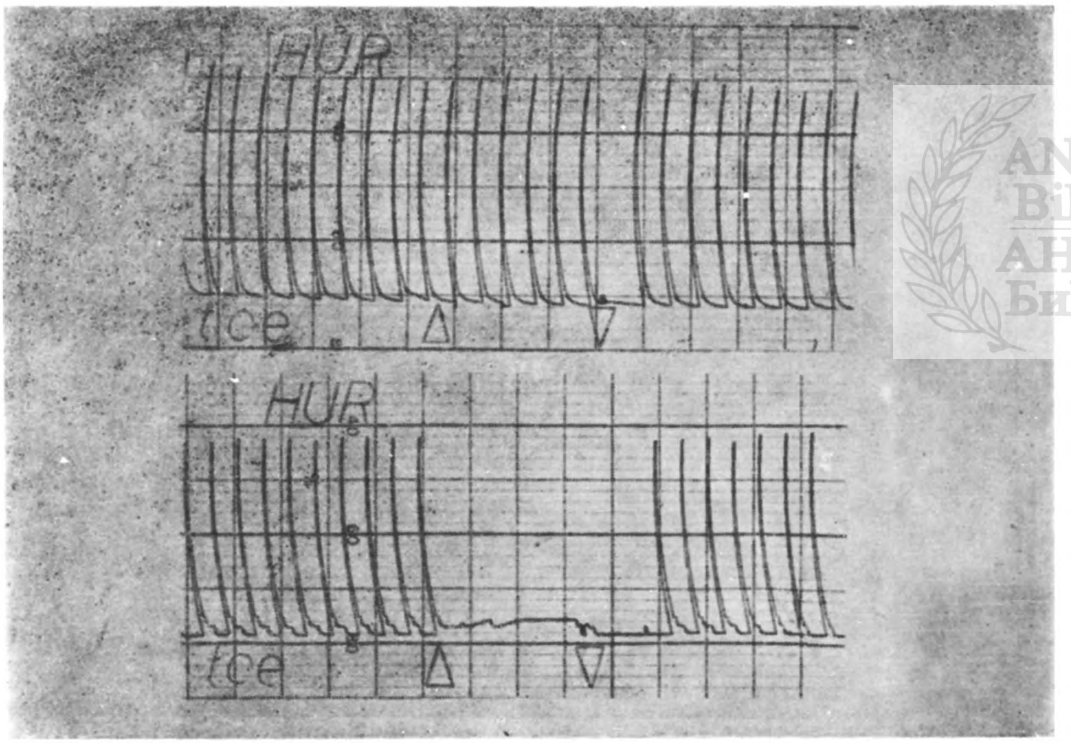


Slika 1. Efekti benzola na izolovanom humanom ureteru. Gornji dio slike: benzol dodat u koncentraciji 65 · 10^{-3} M. Donji dio slike: benzol dodat u koncentraciji 130 · 10^{-3} M

Prije početka stimulacije, adaptirani organ se ispere nekoliko puta, a zatim se registruju kontrolne kontrakcije. Nakon toga se dodaju ispitivane supstance u volumenu od 0,2 ml i 0,4 ml. Organ se izlaže djelovanju supstance u trajanju od 6—8 minuta i za to vrijeme se vrši registracija kontrakcija. Nakon toga se kupatilo i organ isperu nekoliko puta i registruju se naredne kontrakcije.

REZULTATI

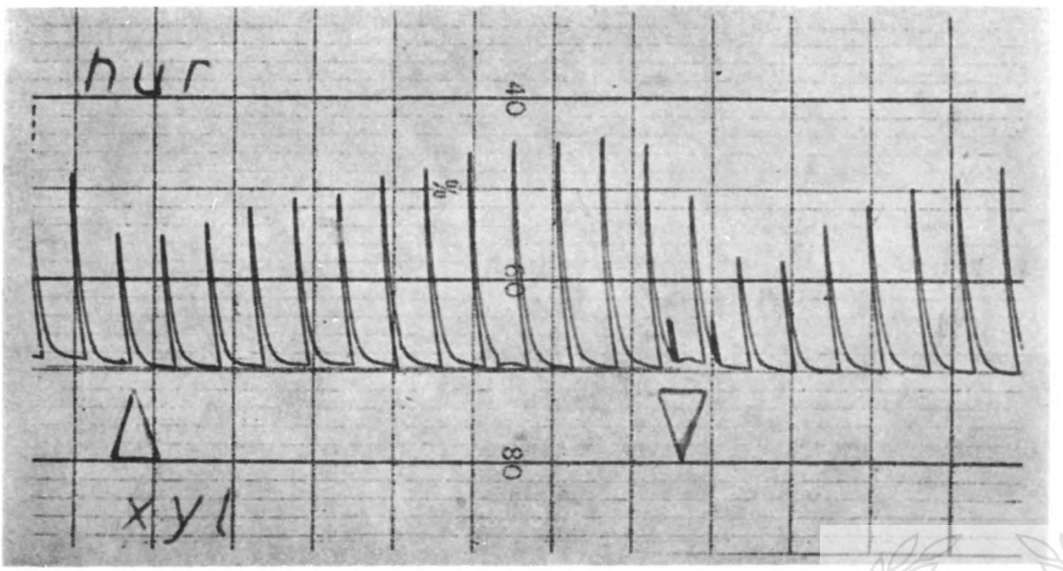
Benzol u koncentraciji od 0,2 ml/20 ml smanjuje visinu kontrakcija za 75 ± 22%. Ovo smanjenje se javlja tek nakon početnog blagog povećanja visine kontrakcija jer benzol pokazuje dvofazno djelovanje. U koncentraciji od 0,4 ml/20 ml benzol najprije blago povećava, a zatim vidno smanjuje visinu izazvanih kontrakcija za 84 ± 8,5% (sl. 1).



Slika 2. Efekti trihloretilena na izolovanom inerviranom humanom ureteru. Gornji dio slike: trihloretilen u koncentraciji $75 \cdot 10^{-3}$ M. Donji dio slike: trihloretilen u koncentraciji $150 \cdot 10^{-3}$ M

Trihloretilen u koncentraciji od 0,2 ml/20 ml nema uticaja na tonus i visinu izazvanih kontrakcija. U dozi od 0,4 ml/20 ml trihloretilen izaziva inhibiciju efekta stimulacije koja je reverzibilna (sl. 2).

Ksilol u koncentraciji 0,2 ml/20 ml vrlo malo povećava visinu izazvanih kontrakcija. U koncentraciji 0,4 ml/20 ml povećava visinu izazvanih kontrakcija za 20 ± 5,3% (sl. 3).



Slika 3. Efekti ksilola na izolovani inervirani humani ureter. Ksilol je dodan u koncentraciji 190 · 10⁻³ M

DISKUSIJA

Rezultati početnih istraživanja na izolovanom inerviranom humanom ureteru pokazuju da se ova preparacija može koristiti za analizu djelovanja ekotoksina. Pokazalo se da efekt stimulacije nakon dodavanja benzola i trihloretilena biva smanjen u zavisnosti od koncentracije. Ksilol djeluje u smislu povećanja efekta stimulacije.

Djelovanje benzola i trihloretilena može se objasniti njihovim potencijalnim antiholinergičkim djelovanjem (Kullendorf et al., 1987) mada tip nervne transmisije u humanom ureteru nije sasvim tačno utvrđen.

Drugo tumačenje može biti u vezi sa blokiranjem kalcijumskih kanala jer je poznato da blokatori kalcijumskih kanala smanjuju efekte stimulacije izolovanog inerviranog humanog uretera (Andersson and Forman, 1986).

Ksilol bi mogao djelovati poput kalcijum agonista koji povećavaju amplitudu izazvanih kontrakcija izolovanog humanog uretera (Hertle and Nawrth, 1989).

Obim ispitivanog materijala je bio ograničen brojem izvršenih operacija i detaljna analiza će se provesti u narednim istraživanjima. Obzirom na vrijednost koju imaju rezultati dobijeni istraživanjem na

humanim tkivima, prezentirani su ovi početni rezultati. Preliminarna istraživanja ukazuju na pogodnost ove preparacije za buduća istraživanja u toksikologiji.

EFFECTS OF THE TOXINS ON THE ISOLATED INNERVATED HUMAN URETER

Summary

Ureteral motility was studied in isolated innervated human ureter preparations after adding various toxins. Ureters were removed during surgery. Contractions were monitored and recorded isometrically after an electric stimulation. Investigated organic solvents were benzene, xylene and trichlorethylene.

Preliminary results indicate that benzene and trichlorethylene decreased the height of the induced contractions in a dose dependent way. Xylene increased the height of the induced contractions without affecting the base line tone.

Such a preparation has not been used in toxicological investigations so far. The results of preliminary investigations with isolated innervated human ureter are presented in this paper. This preparation seems to be usefull in further toxicological investigations.

LITERATURA

Andersson, K. E. and Forman, A. (1986): *Effects of callcium chanell blockers on urinary tract smooth muscles,* Acta Pharmacol. Toxicol., 58, 193—200.

Casarett and Doull's Toxicology: The basic science of poisons, Klaassen, C. D., Amdur, M. O. and Doull, J. (1986), Macmillan Publishing Co., New York, Toronto, London.

Curtis, D. (1985): *Principles of toxicology,* In Goodman and Gilman's: *The pharmacological basis of therapeutics,* 7th edition, Gilman, A. G., Goodman, L. S., Rall, T. W. and Murad, F. (eds.), Macmillan Publishing Co., New York, Toronto, London, 1628—1651.

Hertle, L. and Nawrth, H. (1989): *Stimulation of voltage deppendent contractions by calcium shannel activator Bay K 8644 in the human upper urinary tract in vitro,* J. Urol, 141, 1014—1018.

Kullendorf, C. M., Elmer, M. and Alm, P. (1987): *Urinary bladder innervation in children,* J. Pediatr. Surg., 22, 240—242.

Lembeck, F. (1988): *Alternativen zum Tierversuch,* Georg Thieme Verlag, Stuttgart.

Snyder, R., Longacre, S. L., Witmer, C. M., Kocsis, J. J., Andrews, L. S. and Lee, E. W. (1981): *Biochemical toxicology of benzene,* Reviews in Biochemical Toxicology, Vol. 3, New York, 123—153.

ANU
BiH
АНУ
БиХ

IDENTIFIKACIJA ORGANSKIH SUPSTANCI U ATMOSFERI GRADA ZENICE METODOM GASNA HROMATOGRAFIJA — SPEKTROMETRIJA MASA

BRANKO NIKOLIN, MIROSLAV ŠOBER, MILAN TOMLJENOVIĆ, MELIHA LEKIĆ, IGOR DAVOR GAON
Farmaceutski fakultet, Sarajevo

UDC 551.51 : 547

Apstrakt. U atmosferi grada Zenice se dugi niz godina organizovano provodi praćenje sadržaja nekih neorganskih supstanci, zagađivača atmosfere kao što su sumpordioksid, karbon monoksid, karbon dioksid, teški metali, čađ i dr. Identifikacija organskih supstanci, posebno onih grupacija koje dovode do akutnih ili hroničnih intoksikacija, do sada u Zenici nije sveobuhvatno vršena.

U cilju identifikacije različitih klasa organskih supstanci koje su kao aerozagađenje prisutne u atmosferi, primijenjeno je pet različitih načina sakupljanja uzoraka. Uzorci su sakupljeni na sloju aktivnog uglja, na sloju silikagela, na filterima od staklenih vlakana, na filterima od ugljenog filca i na ispiralicama sa toluenom. Identifikacija je provedena gasnom hromatografijom i vezanim sistemom gasna hromatografija — spektrometrija masa. Identificirani spojevi su iz klase alkil supstituiranih fenola, policikličkih aromatskih ugljikovodika i njihovih alkil derivata, alkilni derivati benzena, normalni, razgranati i ciklični alkani i alkeni i njihovi alkoholi i ketoni, te heterociklički spojevi sa nitrogenom i sumporom. U grupaciji policikličkih aromatskih ugljikovodika evidentno je prisutno više supstanci koje posjeduju izrazita kancerogena svojstva.

Ključne riječi: identifikacija, organske supstance, zagađenje atmosfere, gasna hromatografija, spektrometrija masa, policiklički aromatski ugljikovodici.

UVOD

Toksični efekti organskih supstanci koje su do danas otkrivene u atmosferi kao zagađivači, detaljno su opisani u literaturi mada se ne može reći da su do kraja istraženi, što se posebno odnosi na interakcije prilikom ekspozicije neorganskim i organskim zagađivačima. Dobro su poznati efekti lakih aromatskih ugljikovodika kao što su benzen i njegovi alkilni derivati, koji u organizmu prelaze u fenole i ispoljavaju mielotoksično djelovanje uzrokujući pojavu leukopenije, pancitopenije, aplastične anemije, limfocitopenije, trombocitopenije i hipoplastične promjene koštane srži (I.A.R.C., 1982). Novija istraživanja

Rad je finansirao SIZ nauke BiH u okviru projekta DC V.

ukazuju i na imunotoksične efekte benzena koji kod eksponiranih radnika uzrokuju sniženje koncentracije imunoglobulina G i A u serumu. Ovo potvrđuje i činjenica da kunići izloženi benzenu pokazuju veći rizik kod nastanka tuberkuloze i pneumonije, kao i smanjen odgovor antitijela na bakterijske antigene (Dean et al., 1986). Aromatski amini također posjeduju značajna toksična svojstva. Anilin može dovesti do hronične kongestije slezene i sarkoma slezene (Goodman et al., 1984). Osim toga, anilin se metaboliše u fenilhidroksilamin, koji je jak otrov hematopoetskog sistema i uzrokuje methemoglobinemiju. Naftilamin je također karcionogen za više vrsta, uključujući i ljude (Hicks et al., 1982). Izomeri 2-amino derivata antracena i fenantrena su izrazito karcinogeni. Antramin-2 uzrokuje različite tipove tumora na mjestima udaljenim od mjesta aplikacije, također uzrokujući tumore i pri perkutanoj aplikaciji. Fenantramin-2 uzrokuje leukemiju i brojne druge vrste tumora (Williams and Weisburger, 1986).

Policiklični aromatski ugljikovodici koji nastaju pri procesima koksovanja (Janiševa, et al., 1985), prilikom livenja željeznih ingota (Qvilliam et al., 1985), kao i prilikom sagorijevanja drveta, uglja i drugih fosilnih goriva (Choundhury and Bush, 1981) predstavljaju grupaciju spojeva čiji mnogi članovi ispoljavaju značajno mutageno i karcinogeno djelovanje (Yang et al., 1977; Grimmer et al., 1983).

Zbog svega navedenog, sasvim je jasno zašto identifikacija i određivanje organskih polutanata, a posebno policikličnih aromatskih ugljovodika u atmosferi, danas pobuđuje sve veći interes. Grad Zenica s tog aspekta predstavlja izuzetno zanimljivo područje, pošto su kapaciteti željezare i koksare smješteni u neposrednoj blizini najužeg gradskog jezgra.

Cilj ovog rada je bio da se primjenom selektivnih načina sakupljanja uzoraka i ekstrakcije, kao i primjenom efikasnih instrumentacijskih tehnika gasnom hromatografijom i sistemom gasna hromatografija—spektrometrija masa identificiraju organske supstance i izvrši njihova selekcija za eventualno permanentno praćenje.

MATERIJAL I METODE

Sakupljanje uzoraka

Ispitivanju su podvrgnuti uzorci lebdećih čestica i uzorci vazduha sakupljeni u periodu od 6. 12. 1989. do 22. 12. 1989. na dva mjesta u gradu: kod hotela »Internacional« i u Tetovu.

Ispitano je pet različitih načina uzorkovanja: adsorpcija na aktivnom uglju, adsorpcija na silikagelu, sakupljanje na filterima od staklenih vlakana, sakupljanje na filterima od specijalno priređenog ugljenog filca i uzorkovanje u ispiralicama sa toluenom. Za adsorpciju na aktivnom uglju korišten je granulirani aktivni ugalj Karbozak R (proizvođač »Miloje Zakić«, Kruševac). Granule su usitnjene na veličinu zrna 0,63—0,50 mm i ekstrahovane tri puta u karbon disulfidu

a potom aktivirane na 400°C u struji nitrogena u trajanju od 15 sati. Cjevčice za uzorkovanje su sadržavale ukupno 450 mg ovako pripremljenog adsorbensa.

Za adsorpciju na silikagelu su korištene cjevčice punjene silikagelom koji je bio usitnjen na veličinu čestica 0,63—0,50 mm i dva sata aktiviran na 120°C. Ukupna količina ovako priređenog adsorbensa u cjevčici je iznosila 700 mg.

Za sakupljanje na filterima od ugljenog filca korišten je ugljeni filc Zavoda za materijale Instituta »Boris Kidrič«, Vinča. Filc je prethodno prečišćen ključalim karbon disulfidom uz upotrebu povratnog hladila u trajanju od jednog sata i čitava procedura je ponovljena tri puta.

Filteri od staklenih vlakana Sartorius SM 134 00 su korišteni bez prethodne obrade.

Uzorkovanje u ispiralicama je provedeno upotrebom svježe destiliranog toluena proizvođača »Kemika«, Zagreb.

Za sakupljanje uzoraka na filtere od staklenih vlakana korišten je uređaj za sakupljanje lebdećih čestica LIB proizvođača Freilinger und Ritschel GmbH. Prosječna količina propuštenog vazduha je bila oko 350 m^3. Za sva ostala sakupljanja korištene su vibracione pumpe sa gasnim satovima George Willson LTD, uz prosječnu ukupnu količinu propuštenog vazduha od 260 litara.

Obrada uzorka

Granulirani aktivni ugalj iz cjevčice je ekstrahovan dva puta sa po 2 ml karbondisulfida, prvo 5 minuta na vibromikseru a onda 30 minuta na mućkalici. Treći put je ekstrakcija vršena u 2 ml karbondisulfida 30 minuta u ultrasoničnom kupatilu. Sva tri ekstrakta su sjedinjena i u struji nitrogena uparena na oko 300 mikrolitara, koji su dalje podvrgnuti hromatografskoj analizi.

Silikagel je ekstrahiran na isti način kao što je opisano za granulirani ugalj, jedino je ovdje kao rastvarač korišten etanol. Filter od ugljenog filca je usitnjen i ekstrahovan 20 sati benzenom u aparaturi po Soxhletu. Benzenski ekstrakt je pod sniženim pritiskom uparen na mali volumen i podvrgnut daljoj hromatografskoj analizi. Na isti način je obrađen i filter od staklenih vlakana.

Identifikacija i određivanje

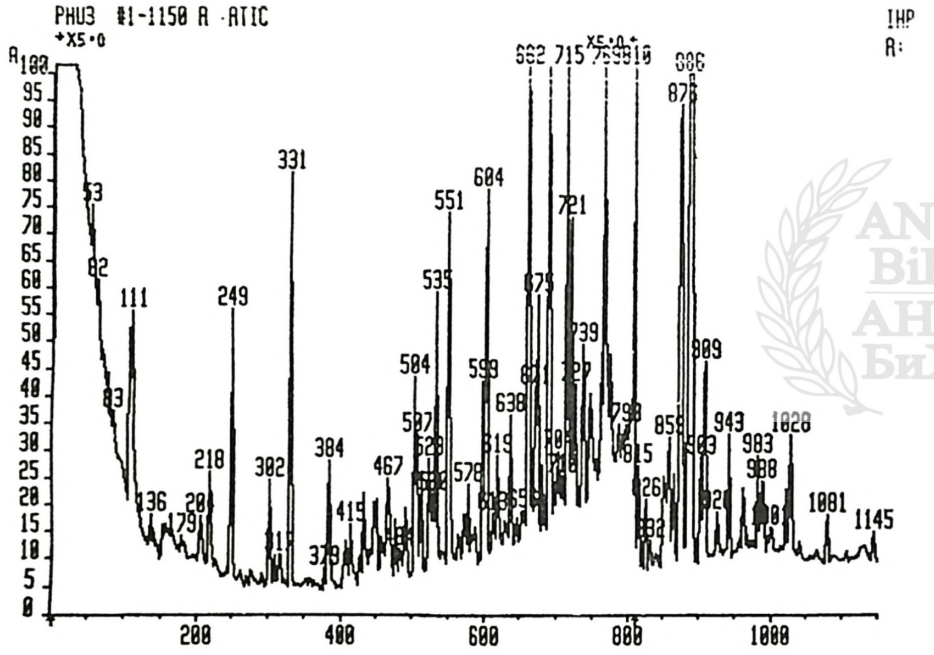
Za identifikaciju i određivanje su korištene metode gasna hromatografija i gasna hromatografija — spektrometrija masa. Gasna hromatografija je provedena na hromatografu DANI 3800 HR uz upotrebu kapilarne kolone SE-30 dimenzija 25 m x 0,32 mm (proizvođač »Perkin Elmer«). Gas nosač je bio helijum; upotrebljen je plamenojonizacijski detektor, a hromatogrami su registrirani na pisaču »Perkin Elmer« 56.

Gasna hromatografija — spektrometrija masa je provedena korištenjem gasnog hromatografa DANI 3800 HR uz kapilarnu kolonu

DB-1 dimenzija 25 m x 0,32 mm (J. and W. Scientific) i helijum kao gas nosač. Korišten je dvostrukofokusirajući spektrometar masa VG 7070 E (VG Analytical), a rezultati su registrovani i obrađeni primjenom računara Digital PDP 8/a i PDP 11/23 (Digital Equipment Corporation). Jonizacija je provedena udarom elektrona energije 70 eV.

REZULTATI

Ekstrakt lebdećih čestica sakupljenih na filterima od staklenih vlakana predstavljao je krajnje kompleksnu smjesu različitih organskih spojeva, o čemu svjedoči i hromatogram totalne jonske struje prikazan na slici 1.

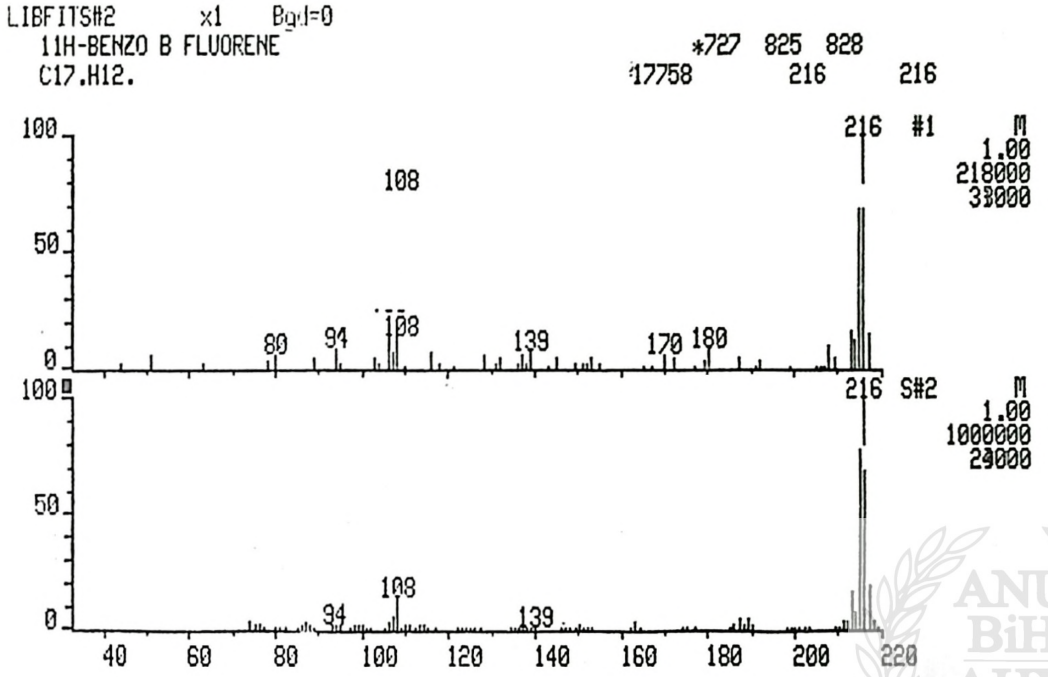


Slika 1. Hromatogram totalne jonske struje ekstrakta lebdećih čestica

Koristeći biblioteku masenih spektograma Nacionalnog biroa za standarde SAD, u prikazanom hromatogramu totalne jonske struje na slici 1 neke od ukupno prisutnih supstanci su identificirane, i to iz grupe policikličnih aromatskih ugljikovodika:

— naftalen, acenaften, 2,3,6,-trimetilnaftalen, fluoren, fenantren, antracen, 3-metilfenantren, 4,5,9,10-tetrahidropiren, benzonaftofuran, 2, 7-dimetilfenantren, fluoranten, 2-fenilindol, dibenzotiofen, piren, 1-metilpiren, 11-H benzo /b/ fluoren, 11-metilbenzo /a/ fluoren, benzo /c/ fenantren, benzo /b/ fluoranten, benz /a/ piren i dibenz /a,h/ antracen.

Primjer identifikacije na osnovu pretraživanja biblioteke spektrograma masa prikazan je na slici 2.



Slika 2. Spektogram supstance izolovane sa filtera od staklenih vlakana (gornji) i spektrogram 11-H benzo /b/ fluorena iz NBS biblioteke spektrograma masa (donji)

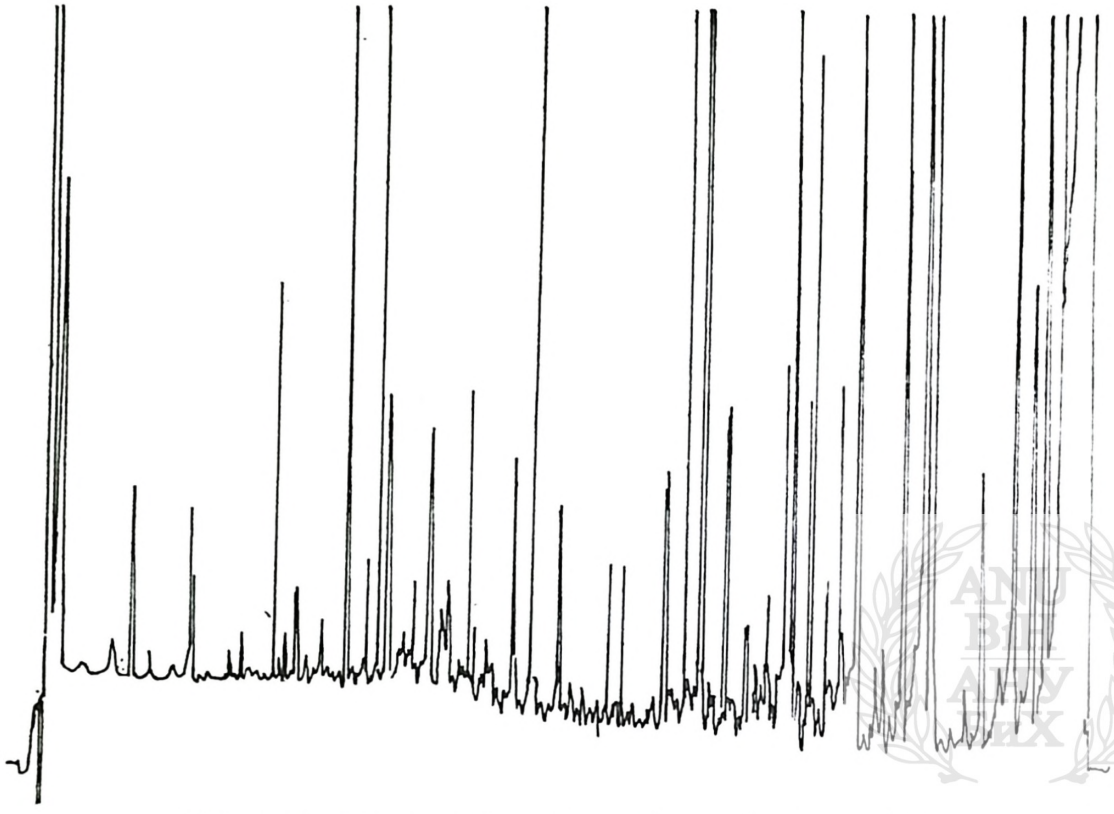
Gornji spektrogram masa je od supstance ekstrahovane sa filtera od staklenih vlakana, dok donji spektrogram odgovara 11H benzo /b/ fluorenu. Očito je da postoji potpuno slaganje, počevši od molekularnog jona na m/z 216, koji je ujedno i bazni signal u oba spektrograma, pa do svih ostalih masa karakterističnih za fragmentaciju ove supstance.

U ekstraktima dobijenim obradom filtera od ugljenog filca identificirani su slijedeći spojevi: 1,1-bifenil, benzen 2,5-cikloheksadien, 2,3-dimetilnaftalen, 1,4-dimetilnaftalen, 1,6-dimetilnaftalen, 1,8-dimetilnaftalen, bifenilen, alkani od C_{10} do C_{15}, alkani od C_{15} do C_{20}, alkani preko C_{20}, supstituisani aminonaftaleni, supstituisani etilnaftaleni, piren i fluoren.

Tipičan hromatogram ekstrakta sa filtera od ugljenog filca dobijen na kapilarnoj koloni SE-30 uz upotrebu plamenojonizacijskog detektora prikazan je na slici 3.

U ekstraktima dobijenim sa granuliranog aktivnog uglja, identificirani su slijedeći spojevi: 2,5-dimetilheksan, 2-butil, 5-metiltiazol, 3-etiloktan, 2,2,6-trimetiloktan, 2-etilheksanol-1, 1-hloroktan, 1,3,5-trime tilbenzen, 1,2,4-trimetilbenzen, 1-etil, 3-metilbenzen, 1-etil, 2-metilbenzen,

izopropilbenzen, 2,5-dimetilundekan, 1-(2-metilbutil), 1-(metilpropil)-ciklopropan, 2-etil, 1-heksanol. 2,4-dimetilheptanol-4, 3,4-dimetilheptanol-4 i 1,4-dietilbenzen.



Slika 3. Hromatogram ekstrakta sa filtera od ugljenog filca

U ekstraktima dobijenim obradom silikagela identificirane su slijedeće supstance:

— 2,4-bis (1,1-dimetiletil) fenol, 3,5-bis (1,1-dimetiletil) fenol, 9-H-fluoren-2-karbonitril, 2,4,6-tris (1,1-dimetiletil) fenol i 2-acetil-5,8-dihidroksi-5-metoksi-1,4-naftokinon.

U toluenskom dijelu koji je sakupljen putem ispiralice identificirane su slijedeće supstance:

— benzen, etilbenzen, benzaldehid, 1,3,5-trimetilbenzen, 1,2,4-trimetilbenzen, 1,2,3-trimetilbenzen, 1-etil, 3-metilbenzen, 1-etil, 4-metilbenzen, 2,4-dimetil-2,3-heptadien-5-in, 5-(1-metilpropiliden)-1,3-cikloheptadien, undekan, biciklo-3,2,1-oktan-2,3 bis (metilen), 1-(2-metilfenil) etanon, 1,3,5-tris (metilen)-cikloheptan, 2-metil-5-(1-metiletenil)-2-cikloheksen-1-01, 2,3-dihidro-2-metil-benzofuran, 2-pentiltiofen, 1-etil-1,2-dihidro-3H-indazol-3-on, 1,2,4-trietilbenzen, biciklo-4,4,1-undekan-1,3,5,7,9-pentaen-11-on, 1-metilinden, naftalen, azulen, 5-metilundekan, 2,5-dimetildodekan, 2-metilnaftalen, 1-etiliden-1H-inden i 4,5,6,7,8,9,10,11-oktahidro-1H-ciklodekapirazol.

DISKUSIJA

Ovaj rad je bio samo preliminarni test, koji je trebao omogućiti uvid u spektar prisutnih organskih supstanci u atmosferi Zenice u ispitivanom usko ograničenom periodu. Rezultati opravdavaju bojazan da je stanje aerozagađenja u Zenici komplikovanije nego što se može zaključiti samo na osnovu klasičnih pokazatelja, kao što su SO_2, CO, CO_2, čađ, oksidi nitrogena i teški metali. Prisustvo identificiranih takvih mutagena i karcinogena, kao što su benz (a) piren, benzofluoranten, benz (a) antracen i dibenz (a,h) antracen ne samo da značajno povećava rizik nastanka neoplastičnih oboljenja u čitavoj populaciji nego već sada svojim kumulativnim genotoksičnim djelovanjem utiče na zdravlje budućih generacija. Ovdje se ne smije zanemariti ni prisustvo policikličnih aromatskih ugljikovodika koji sami nemaju mutageno ili karcinogeno djelovanje, kao što je slučaj sa pirenom, ali u reakciji sa oksidima nitrogena iz atmosfere daju genotoksične nitro derivate (Arey et al., 1986). Zbog toga bi čitavu ovu grupaciju spojeva trebalo obavezno uključiti u rutinsku proceduru svakodevnog praćenja koncentracije organskih zagađivača, čime bi se dobili ne samo pokazatelji trenutnog stanja aerozagađenja nego i polazne vrijednosti za praćenje efikasnosti svih postupaka usmjerenih na smanjenje zagađenja životne sredine.

Identifikacija alkilnih derivata fenola, kao i alkilnih derivata benzena ukazuje na moguće mielotoksične efekte te pojave pancitopenije i aplastične anemije.

Kao što se vidi iz popisa identificiranih supstanci, prisutni su alkilni derivati fenola, ali ne i fenol. Sakupljanje fenola na silikagelu nije bilo uspješno vjerovatno zbog njegove desorpcije sa silikagela za vrijeme uzorkovanja, uslovljene njegovom isparljivošću. Primjenom kriogenih tehnika kod uzorkovanja omogućilo bi se sakupljanje fenola, kao i jako isparljivih merkaptana, koji su nosioci neprijatnog mirisa vazduha. Nažalost, u ovoj fazi eksperimenta uređaji za kriogeni rad nisu bili na raspolaganju, tako da ni ova vrsta istraživanja nije bila moguća.

Na kraju treba napomenuti da eventualni toksični efekti prisustva velikog broja alifatskih ugljikovodika i njihovih derivata u literaturi nisu na zadovoljavajući način obrađeni, posebno sa aspekta njihovog istovremnog djelovanja sa karcinogenim supstancama te njihovog eventualnog promotorskog efekta. Ova činjenica otvara čitav niz neriješenih problema koji stoje pred savremenom toksikologijom i njihovim rješavanjem bi se svakako dopunila slika koju ovdje prikazana istraživanja daju o stanju aerozagađenja u ispitivanom periodu.

ORGANIC SUBSTANCES IDENTIFICATION IN THE ATMOSPHERE OF THE CITY OF ZENICA USING THE METHOD OF CHROMATOGRAPHY — MASS SPECTROMETRY

Summary

The location of metallurgic complex, together with power plants and coke production in an urban center, results in an appropriate atmospheric pollution

part of which are organic compounds in a significant amount. A longterm exposition to some organic compounds may result in chronic toxic or genotoxic effects, so identification of such compounds means a necessity in planning of permanent monitoring. It was the aim of this paper. Concernig the nature of air pollution in this case, various classes of organic compounds were expected in atmosphere which caused a different sampling procedures to be applied. Samples were collected on glass fiber filters, activated charcoal, silica-gel layers, on filters made of specially prepared coal tissue and in impingers filled with toluene. The identification was performed by gas chromatography and gas chromatography — mass spectrometry. Alkyl substituted phenols, alkyl derivatives of benzene, polycyclic aromatic hydrocarbons and their alkyl derivatives, normal, branched and cyclic alkanes and alkenes, aminonaphthalenes, aliphatic alcohols and ketones and heterocyclic compounds with nitrogen and sulfur were identified.

LITERATURA

Arey, J., Zielinska, B., Atkinson, R., Winer, A. M., Ramdahl, T. and Pitts, J. N. Jr.: *The Formation of Nitro PAHs from the Gas Phase Reaction of Fluoranthene and Pyrene with the OH Radical in the Presence of No_x,* Atmos. Environ., 1986, 20, 2389—2345.

Choundhury, D. R., Bush, B.: *Chromatographic-Spectrometric Identification of Airborne Polynuclear Aromatic Hydrocarbons,* Biomed. Mass Spectr., 1985, 12, 142—150.

Dean, S. H., Murray, M. J., Ward, E. C.: *Toxic Responses of the Immune System,* in: Toxicology — The Basic Science of Poisons, Edited by Klaasen, C. D., Amdur, M. O., Doull, J. Macmillan Publishing Company New York 1986. pp 245—285.

Grimmer, G., Brune, H., Deutsch-Wenzel, R. et al.: *The Contribution of Polycyclic Aromatic Hydrocarbon Fraction with Different Boilling Ranges to the Carcinogenic Impact of Emission Condensate from Coal Fired Residential Furnaces as Evaluated by Topical Application to the Skin of Mice,* Cancer Letters, 1983, 28, 203—211.

Goodman, D. G., Ward, J. M., Reichardt, W. D.: *Splenic Fibrosis and Sarcomas in F344 Rats Fed Diets Containing Aniline Hydrochloride, 4,4 — 'Sulfonilidianiline or D and C Red,* J. Natl. Cancer Ins., 1984, 73, 265—270.

Hicks, R. M., Wright, R., Wakefield, J. St. J.: *The Induction of Rat Bladder Cacner by 2-naphthylamine,* Br. J. Cancer, 1982, 46, 646—650.

IARC: *Evaluation of the Carcinogenic Risk of Chemical to Tumors,* IARC Monografs, 1982, 29, 93—148.

Janiševa, N. Ja., Kireeva, I. S., Černičenko, I. A., Balenko, N. V., Pavlova, N. A.: *Gigieničeskie problemo ohrani okružajuščej sredi ot zagrjaznenija kancerogenami,* Zdorovja, Kiev 1985, pp. 6—11.

Quilliam, M. A., Lant, M. S., Kaiser-Farelli, G. et al.: *Identification of Polycyclic Aromatic Compounds in Mutagenic Emission From Steel Casting,* Biomed. Mass Spectrom., 1985, 12, 142—150.

Williams, G. M., Weisburger, J. H.: *Chemical carcinogens,* in: *Toxycology — The Basic Science of Poisons,* Edited by Klaasen, C. D., Amour, M. O., Doull, J. Macmillan Publishing Company, New York, 1986, pp. 99—173.

Yang, S. K., Gelboin, H. V., Trump, B. F., Antrup, H., Haris, C. C.: *Metabolic Activation of Benzo (a) Pyrene and Binding to DNA in Cultured Human Bronchus,* Cancer Res., 1977, 35, 1210—1215.

PRIMJENA METODE HROMATOGRAFSKE IDENTIFIKACIJE LIPIDNIH KOMPONENATA TKIVA U EKOTOKSIKOLOGIJI

KOVILJKA STOJKOV
Institut za fiziologiju i biohemiju »Dr Aleksandar Sabovljev« Medicinskog fakulteta, Sarajevo

UDC 612:597(497.15)

Apstrakt. Metodom tankoslojne hromatografije na Silica gelu (G) razvijene su komponente neuaralnih lipida i fosfolipida iz ekstrakata slatkovodnih riba radi korišćenja rezultata u rješavanju taksonomskog statusa vrsta koje pripadaju slivovima rijeka Bosne i Hercegovine.

Pored kvantitativne analize, spektrofotometrijskim metodama vršena je i kvantitativna denzitometrijska analiza preko fotografske folije, kao i kvalitativna analiza hromatograma neutralnih lipida i fosfolipida. Identificirane su slijedeće frakcije neutralnih lipida: mono- i digliceridi, holesterol, slobodne masne kiseline i trigliceridi, a od fosfolipidnih frakcije: lizolecitin, lecitin, fosfatidiletanolamin, fosfatidilserin i neidentificirane frakcije označene kao »artefakt« koje imaju tkivno-specifične karakteristike.

Ključne riječi: riba, tkivo, ekstrakt, hromatografija, neutralni lipidi, fosfolipidi, frakcije.

UVOD

Tehnika tankoslojne hromatografije na Silica gelu intenzivnije se koristi od 1956. g., kada je Egon Stahl uveo jednostavan način pripreme tankog sloja Silica gela na staklenim pločama. Ova tehnika je posebno pogodna za kvalitativnu analizu lipidnih frakcija u biološkom materijalu. Robinson i Phillips (1963) pokazali su da se može razdvojiti do deset i više frakcija fosfolipida ovom tehnikom, ali je kvantitativna analiza predstavljala veći problem. Naša metoda tretira i kvantitativnu analizu lipidnih frakcija hromatograma.

Kvantitativnu analizu frakcija tehnikom eluiranja frakcija, razvijanjem boje i fotometriranjem, radili su Robinson i Phillips (1963), Kahovcova i Odavić (1969), Tore et al. (1972). Denzitometrijsku metodu analiziranja hromatograma, koristili su Blond et al. (1971), Wirlund et al. (1972), Wagstaff et al. (1974) i Giridhar et al. (1974). U rutinskom i istraživačkom radu primjenjuju se često obje metode, Hojnacki i Smith (1974). Naša metoda denzitometrije sastoji se u fotografisanju hromatograma sa razvijenim lipidnim frakcijama, a zatim u razvijanju snimka na transparentnoj foliji i

potom denzitometriranje frakcija u denzitometru sa propusnom svjetlosti (Jadrić S., Stojkov K., et al., 1977). Relativni odnosi koncentracija pojedinih frakcija lipida izračunati su na osnovu ekstinkcionih vrijednosti pojedinih frakcija i ukupne sume svih frakcija.

MATERIJAL I METODE

Materijal za analize su bili uzorci tkiva slatkovodnih riba iz slivova rijeka Bosne i Hercegovine. Korišteni su uzorci: srca, bubrega, jetre, slezene, skeletnog mišića i crijeva, a ribe su pripadale vrstama: Ctenopharyngodon idella, Cyprinus carpio, Barbus barbus, Salmo trutta, Leuciscus svallize i Leuciscus cephalus.

Uzorci od po jednog grama svakog organa homogenizirani su u smjesi hloroforma i metanola u odnosu 2:1 (v/v); homogenat je filtriran, evaporiran do suhog lipidnog ostatka, a ovaj potom rastvoren u određenoj količini hloroforma — hloroformski ekstrakt (Odavić R., 1964).

Za određivanje ukupne količine lipida koristili smo metodu Zöllnera i Kircha (1962), za ukupni holesterol metodu McIntera i Ralstona (1954), a za ukupne fosfolipide metodu Berenbluma i Chaina (1938), modificiranu od Longa (1953). Koncentracije triglicerida i slobodnih masnih kiselina dobijali smo iz prethodnih podataka matematičkim putem.

Metoda tankoslojne hromatografije rađena je na staklenim pločama 20 x 20, firme DESAGA u debljini sloja Silica gela od 0,5 mm i aktiviranim pločama na 115°C 30 minuta. Hloroformski ekstrakt je apliciran u količini od 10—20 mikrolitara u vidu linije (E. Stahl 1958, Mangold, 1974).

Jednodimenzionalna uzlazna hromatografija neutralnih lipida vršena je u komorama (kadama) 30 minuta na + 4°C, uz upotrebu standarda i solventa u sastavu: petroleter; ledena octna kiselina; eter u odnosu 85:1:15 (v/v). Fosfolipidne frakcije hromatografisane su u kadama na sobnoj temperaturi u trajanju od 55 minuta, uz upotrebu standarda i solventa slijedećeg sastava: hloroform; metanol; voda u odnosu 65:25:4 (v/v).

Vizuelizacija frakcija rađena je 50% sulfatnom kiselinom, a identifikacija frakcija prema standardima i R_f vrijednošću pojedine frakcije. Hromatogram je fotografisan a pozitiv razvijen na transparentnoj fotografskoj foliji i denzitometriran u Beckmanovom denzitometru bez filtera. Registrovana krivulja je analizirana tako da su sabrane sve dobijene ekstinkcione vrijednosti za svaku frakciju i na osnovu tih vrijednosti izračunate relativne koncentracije pojedinih frakcija.

REZULTATI I DISKUSIJA

U tabeli 1 prikazani su rasponi vrijednosti od najniže do najviše (u mg/gram) koncentracije za ukupne lipide, holesterol, fosfolipide trigliceride i slobodne masne kiseline. Rezultati se odnose na ekstrakte

tkiva riba iz familije Cyprinidae. Izražena je dobro pravilnost u zastupljenosti ukupnih lipida i pojedinih frakcija. Najveća koncentracija lipida uočava se u ekstraktima crijeva i jetre, a najmanja u srčanom i skeletnom mišiću, što je i očekivano s obzirom metaboličke uloge ovih organa.

Tabela 1. RASPON VRIJEDNOSTI KONCENTRACIJA LIPIDNIH FRAKCIJA IZ TKIVA RIBA PREDSTAVNIKA PORODICE CYPRINIDAE (mg/gr)

Tkivo	ukupni lipidi	holesterol	fosfolipidi	trigliceridi i masne kiseline
Skeletni mišić	13,42— 24,45	1,42— 3,46	2,07— 6,23	6,60—16,16
Srce	7,98— 20,17	1,63— 3,79	1,35— 4,00	4,15 12,70
Jetra	24,14—105,64	6,13—27,01	3,28—21,47	14,73—74,44
Crijevo	63,07—113,31	4,67—15,17	2,81— 8,31	52,59—89,83
Bubreg	14,49— 30,69	3,31— 8,28	2,77— 8,14	8,53—16,83
Slezena	17,08— 28,27	4,14— 7,12	4,55— 7,91	6,10—17,12

Rezultati prikazani u tabeli 1 potvrđuju zapažanja drugih autora da postoje razlike u sadržaju lipidnih frakcija u istim tkivima različitih vrsta, kao i u različitim tkivima istih vrsta i u kvalitativnom i kvantitativnom odnosu (Torpe, 1970; Harper, 1973; Nikolić, 1975; Stojkov i Brkić, 1975). Istraživanja provedena na drugim životinjskim vrstama također pokazuju prisustvo izrazitih razlika u lipidnom sastavu. Dok su kod jednih (kunić, pacov) 50% lipidnog sastava neutralni lipidi (Rooney et al., 1974; Tochima i Akino, 1972), kod drugih su pretežno prisutne fosfolipidne komponente (Hunter et al., 1973; Harper, 1973).

Dalja analiza neutralnih lipida vršena je denzitometriranjem hromatograma sa razdvojenim frakcijama preko transparentne folije u Beckmanovom denzitometru.

Tabela 2. RELETIVNE VRIJEDNOSTI FRAKCIJA NEUTRALNIH LIPIDA U PROCENTIMA KOD CTENOPHARYNGODON IDELLA

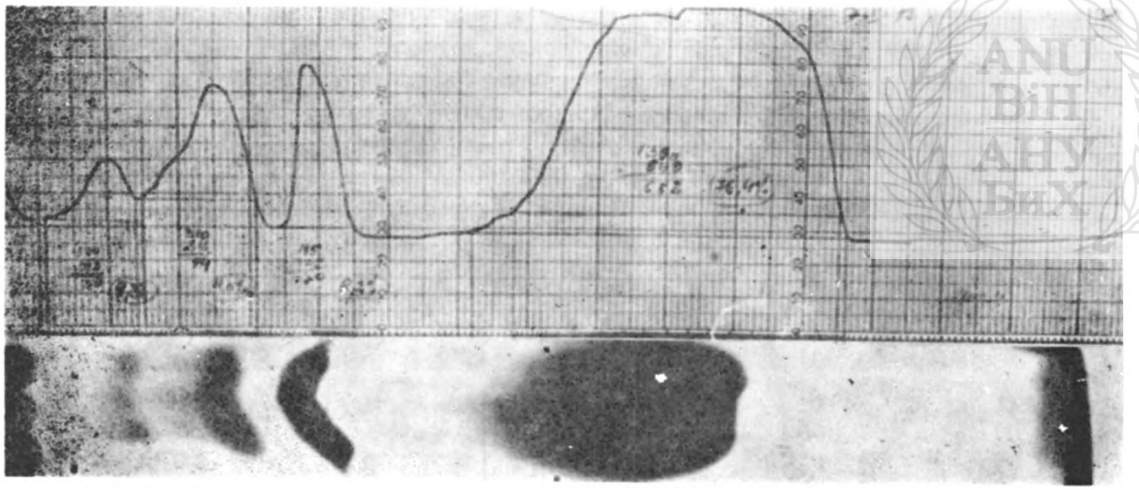
Tkivo	trigliceridi	masne kiseline	holesterol	mono i digliceridi
Srce	27,8	20,0	42,1	trag
Bubreg	60,4	17,4	19,3	2,7
Jetra	84,2	5,4	8,5	1,7
Slezena	70,8	6,5	20,4	2,2
Skeletni mišić	77,8	6,6	14,1	1,9
Crijevo	80,0	7,9	9,8	2,1

U tabeli 2 prikazani su rezultati kvantitativne denzitometrijske analize hromatograma neutralnih lipida iz tkiva (srce, bubreg, jetra, slezena, skeletni mišić i crijevo) ribe Ctenopharyngodon idella. Dobijene

su frakcije mono i digliceride kao jedna frakcija, holesterol masne kiseline i trigliceridi, posmatrano od starta prema frontu, kako je i prikazano na slici 1, zajedno sa načinom denzitometriranja. Frakcije mono i digliceride su u vrlo malim koncentracijama od pojave »traga«, koji nije mogao da se denzitometrira do relativne koncentracije od 2,2%. Frakcija triglicerida je bila uvijek prisutna u ispitivanim tkivima i njena relativna koncentracija je vrlo visoka u jetri i crijevu, od 84,2—80,0%.

Tabela 3. RELATIVNE VRIJEDNOSTI FRAKCIJA NEUTRALNIH LIPIDA U PROCENTIMA KOD CYPRINUS CARPIO

Tkivo	trigliceridi	masne kiseline	holesterol	mono i digliceridi
Srce	36,1	21,7	40,7	1,5
Bubreg	56,7	19,4	20,0	3,9
Jetra	79,2	7,6	10,1	3,1
Slezena	74,3	6,7	17,4	1,6
Skeletni mišić	72,2	8,3	15,2	4,3
Crijevo	78,6	6,8	10,4	4,2



Slika 1.

U tabeli 3 dati su rezultati denzitometrijske analize dobijene iz istih tkiva kod ribe Cyprinus carpio, gdje je mogla da se dobije koncentracija za mono i digliceride u svim organima. Vrijednosti su kod ove vrste nešto veće, do 4,3% i 4,2% u skeletnom mišiću i crijevu. Trigliceridi su i kod ove vrste najzastupljeniji u crijevu i jetri, a najmanja koncentracijaje nađena u srcu.

Tabela 4 sadrži rezultate dobijene u ekstraktima tkiva Barbus barbus, gdje se zapaža nešto veća koncentracija masnih kiselina nego kod prethodnih vrsta u svim organima izuzev jetre i slezene.

Tabela 4. RELITIVNE VRIJEDNOSTI FRAKCIJA NEUTRALNIH LIPIDA U PROCENTIMA KOD BARBUS BARBUS

Tkivo	trigliceridi	masne kiseline	holesterol	mono i digliceridi
Srce	47,5	22,5	25,1	4,9
Bubreg	48,6	31,5	16,7	3,2
Jetra	80,1	6,2	10,0	2,7
Slezena	75,1	6,5	16,2	2,2
Skeletni mišić	72,0	14,1	13,1	0,8
Crijevo	75,0	11,1	10,0	3,9

Tabela 5. RELATIVNE VRIJEDNOSTI FRAKCIJA NEUTRALNIH LIPIDA U PROCENTIMA KOD SALMO TRUTTA

Tkivo	trigliceridi	masne kiseline	holesterol	mono i digliceridi
Srce	46,8	22,1	30,9	0,2
Bubreg	51,2	23,2	21,8	3,8
Jetra	38,4	42,8	17,2	1,6
Slezena	56,6	22,2	17,6	4,1
Skeletni mišić	50,6	28,2	21,0	0,8
Crijevo	65,7	15,7	14,4	4,0

U tabeli 5 su dati rezultati frakcija neutralnih lipida iz tkiva Salmo truta. Pored uobičajeno visokih vrijednosti za trigliceride, uočava se veća koncentracija masnih tkiva i vrlo male vrijednosti mono i diglicerida.

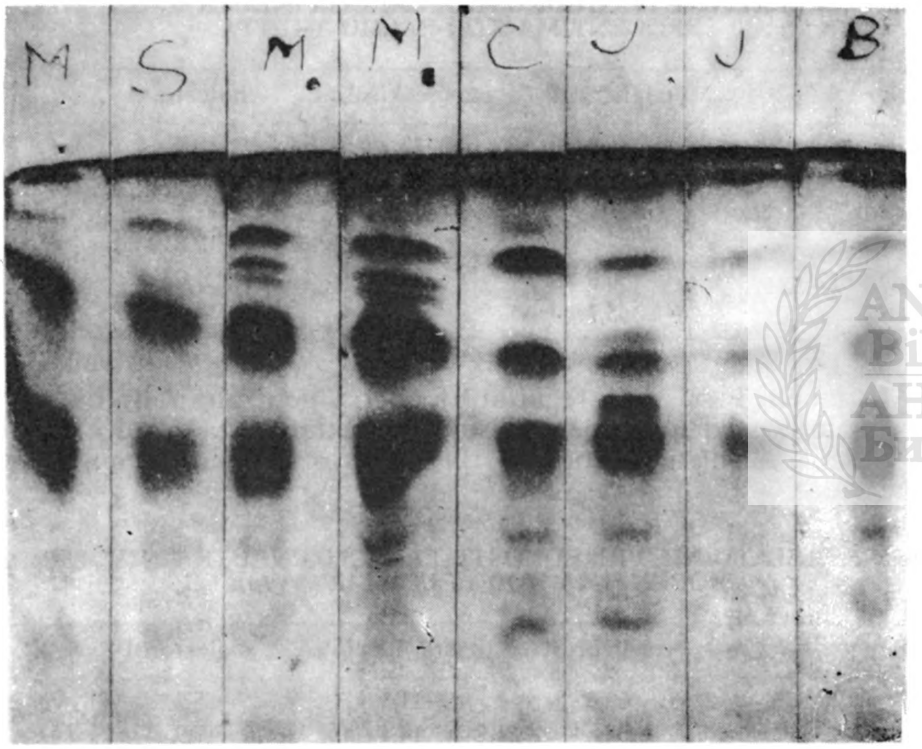
Tabela 6. RELATIVNE VRIJEDNOSTI FRAKCIJA NEUTRALNIH LIPIDA U PROCENTIMA KOD LEUCISCUS SVALLIZE

Tkivo	trigliceridi	masne kiseline	holesterol	mono i digliceridi
Srce	69,8	11,1	15,7	3,4
Bubreg	65,2	14,4	17,9	2,5
Jetra	74,2	11,1	10,7	4,0
Slezena	55,6	20,1	15,4	8,9
Skeletni mišić	73,3	15,1	11,6	trag
Crijevo	69,1	20,8	8,0	2,1

U tabeli 6 prikazani su rezultati denzitometrijske analize neutralnih lipidnih frakcija dobijenih iz ekstrakata tkiva Leuciscus svallize. Izrazito je velika koncentracija triglicerida u srcu ove vrste, dok je koncentracija holesterola približno ujednačena u ispitivanim tkivima, što se primjećuje i kod Leuciscus cephalus-a u tabeli broj 7, sa izuzetkom rezultata iz ekstrakta crijeva i kod jedne i druge vrste.

Tabela 7. RELATIVNE VRIJEDNOSTI FRAKCIJA NEUTRALNIH LIPIDA U PROCENTIMA KOD LEUCISCUS CEPHALUS

Tkivo	trigliceridi	masne kiseline	holesterol	mono i digliceridi
Srce	62,5	17,9	19,5	trag
Bubreg	64,2	16,6	16,7	2,5
Jetra	59,1	21,8	13,5	5,4
Slezena	62,6	19,3	15,9	2,2
Skeletni mišić	83,4	3,5	12,9	trag
Crijevo	75,9	14,3	5,9	3,7



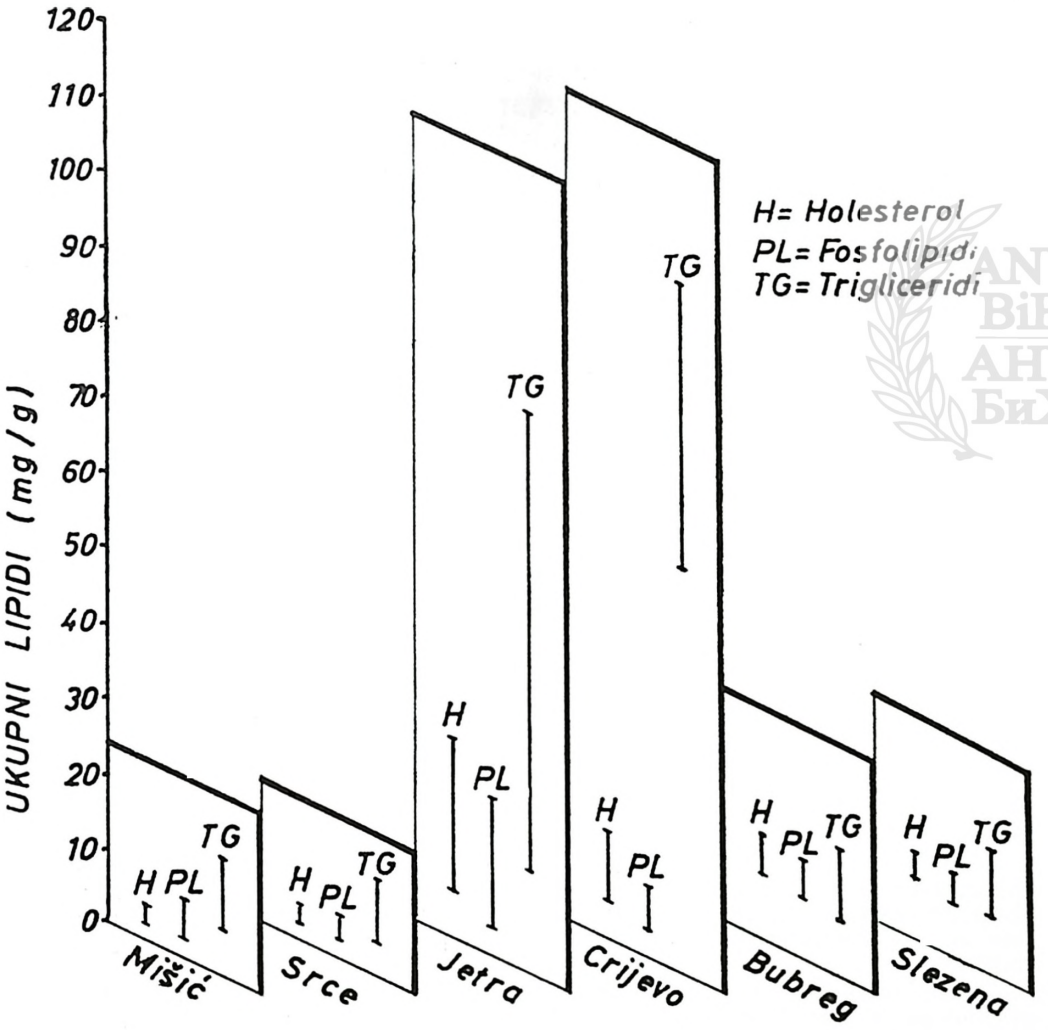
Slika 2.

Kvalitativna analiza hromatograma fosfolipidnih frakcija prikazana je na slici 2.

Hromatogram fosfolipida iz istih tkiva kao riba pokazuje od starta prema frontu frakcije lizolecitina sfingomijelina, lecitina fosfatidilserina i fosfat idiletanolamina i još najmanje 2—3 neidentificirane frakcije. Činjenica je da ribe žive u vodenoj sredini i da su samim tim bespomoćna živa bića u suprotstavljanju ekološkim toksinima. Smatra se da ekologija ima posljedice ne samo na njihove morfološke, kariološke, histološke i dr. promjene već i na biohemijske i fiziološke karakteris-

tike vrste. Upravo su ispitivane lipidne materije, jedne od najpodložnijih, ako ne i najpodložnije organske materije u sastavu živih bića, uticajima ekotoksina. Upravo se na ovim lipidnim komponentama in vivo i in vitro mogu sprovoditi oksidacije ili autooksidacije, čiji su produkti poznati kao: peroksidi, aldehidi, ketoni, ozoni, oksidovane masne kiseline.

Pri oksidacijama na fosfatidnim frakcijama (fosfatidiletanolamin, fosfatidilholin) nastaju, naročito u jetri, lipoperoksidi, koji vrlo brzo povećavaju nivo hidro i alkil peroksida u zavisnosti od prisutnih ekozagađivača. O ulozi fosfolipidnih komponenata u strukturi i funkciji ćelijske membrane živih bića odavno se zna, ali uticaj sredine baš kod riba na fosfolipide još u potpunosti nije ispitan.



Grafikon 1. Odnos pojedinih frakcija holesterola, fosfolipida i triglicerida

ZAKLJUČCI:

U radu je korištena klasična kvantitativna spektrofotometrijska metoda za određivanje ukupnih lipida, holesterola, fosfolipida, triglicerida i slobodnih masnih kiselina. Pored toga korištena je metoda tankoslojne hromatografije i njena denzitometrijska analiza preko transparentne folije za dobijanje relativnih koncentracija frakcija neutralnih lipida (Jadrić, S., Stojkov, K. et al., 1977).

Od frakcija neutralnih lipida identificirane su skoro u svim ispitivanim tkivima frakcije: mono- i diglicerida, holesterola, masnih kiselina i triglicerida. Najveću relativnu koncentraciju imala je frakcija triglicerida, a najmanju frakcija mono- i diglicerida, koja nije prelazila vrijednost od 9%, a u nekim tkivima je bila prisutna samo u tragovima. Odnos holesterola prema koncentracijama triglicerida i masnih kiselina, upoređen sa podacima dobijenim kvantitativnim putem, pokazuje slaganje u granicama pogreške jedne i druge metode. Ovo nam pokazuje da se tankoslojna hromatografija na ovaj način može uspješno primjeniti za kvantitativnu analizu lipida, pa i u njima prisutnih toksina. Slične rezultate dobili su istraživači na drugim vrstama: kao u pogledu različitih koncentracija po organima tako i po vrstama (Sanina i Epshtein, 1972; Bruce, 1974; Kunc i Rumpl, 1972).

Kvalitativna analiza hromatograma fosfolipida (sl. 2) pokazala je da količinski preovladava frakcija fosfatidiletanolamina i fosfatidilholina u poređenju sa ostalim frakcijama fosfolipida iz tkiva riba, što su našli i drugi autori (Kreps, 1956, 1967; Smirnov, 1970; Bottino et al., 1967; De Koning, 1968; Galli, Fumagalli, 1968).

Prisustvo »atrefakata« na hromatogramima ekstrakata tkiva ispitivanih ribljih vrsta iz slivova rijeka BiH, po našoj pretpostavci, su posljedica življenja u neodgovarajućoj i zagađenoj okolini. Ispitivanja uticaja ekosredine na lipidne materije organa živih bića zahtjeva, pored velikih materijalnih izdataka, i dugoročna seriozna i udružena ispitivanja (istraživanja).

APPLICATION OF THE METHOD OF CHROMATOGRAPHIC IDENTIFICATION OF LIPID COMPOMENTS OF TISSUE IN ECOTOXICOLOGY

Summary

In the work we tried to describe the method of detection and quantitative chromatogram analysis of neutral lipids extracted from different tissue extracts obtained from 6 types of fishes. This technique can be applied for the identitication and characterization of lipid tissue components in the species exposed to ecotoxine.

The method of detection and chromatogram analysis involves detection on photo-material, densitometry. The results of quantitative analysis of neutral lipids which are presented in 6 tables show a high degree of reproducibility and are compatible with those obtained with classical analytical and quantitative methods.

Qualitative analysis of phospholipids showed that phosphatidylcholin and phosphatidyl ethanolamin represent the types of lipids which dominate in all the thypes of tissues.

This corelates well with Smirnov's (1970) and Femagalli's (1976) results that also detected same tissue types in the fishes of different sorts.

LITERATURA

Blond, J. P., Lemarchal, P., Le Breton, E. (1971): *Determination densitometrique des phospholipides apres chromatographie en couche mince et revelation sulfamolybdique,* Biochimie 53, 1221—1230.

Bondarenko, B. N. (1973): *Quantitative Determination of Lipids by Thin Layer Chromatography,* Voprosy Medicinskoj himiji 19, 438—442.

Berenblum, I., Chain, E. (1938): *An Improved Method for the Colorimatric Determination of Phosphate,* Biochem. J. 32, 295—301.

Bottino, Nestor R., Jeffrey, Lela M., Reiser, Raymond (1967): *The Lipids Antractic Fish,* Antarct. J. U. S. 2, 5.

Bruce, A. (1974): *Skeletal Muscle Lipids. II.: Changes in Phospholipid Composition in Man from Foetal to Middle Age,* J. Lipid Res. 15, 103—108.

Giridhar, V., Dalah, F. R., Winsten, S. (1974): *Molibdenum Blue Reagent Used in Determination of the Lecithin (Sphingomyelin Ratio in Amniotic Fluid)* Clin. Chem. 20, 513—519.

Harper, H. A. (1973): *Review of Physioloigcal Chemistry;* Lange, Los Altos.

Hojnacki, J. L., Smith, S. C. (1974): *Separtion of Six Lipid Classes on one Thin Layer Chromatogram,* J. Chromatography 90, 365—370.

Kahovcova, J., Odavić, R. (1969): *A simple Method for the Quantitative Analysis of Phospholipids Separated of Serum Lipids by a Simple TLC Charring Method,* Clin. Chim. Acta 46, 63—67.

Mangold, H. K. (1974): *Thin Layer Chromatography,* »Clinical Biochemistry«, Vol. I, str. 13.

Robinson, N., Phillips, D. M. (1963): *Quantitative Thin Layer Chromatography of Serum Phospholipids,* Clin. Chim. Acta. 8, 385—392.

Sanina, O. I., Epshtein, S. F. (1972): *Study of Phospholipids in Skeletal Muscle Nuclei in Normal State and During Distrophy,* Ukr. Biohim. Žurnal. 44, 740—746.

Torres, J. F., Jodos, D. C., De Fregosi, R. V. (1971): *Determination de las fracciones lipidcas sericas po microcromatografia en capa delgada,* Rev-Assoc. Bioquimicas. Argent. 36, 136—140.

Toshima, N., Akino, T. (1972): *Alveolar and Tissue Phospholipids of Rat Lung,* Tohoku J. Exp. Med. 108, 253—259.

Wagstaff, T., Whyley, G. A., Freedman, G. (1974): *The Measurement of the Lecithin,* Ann. Clin. Biochem. 11, 24—28.

Zöllner, N., Kirch, K. (1962): *Ueber die quantitative Bestimung von Lipoidem (Mikrometode),* Z. Ges-Exp. Med. 135, 545—562.

Yeung, S. K. F., Kiskis, A. (1974): *Molecular Species of Ethanolamine Phosphatides of Dog and Pig Kidney,* Canad. J. Biochem, 52, 830—838.

ANU BiH

ANU
BiH
АНУ
БиХ

UVODNE NAPOMENE O KVALITETU LIJEKOVA

JELA GRUJIĆ-VASIĆ

U okviru ciljeva *Zdravlje za sve do 2000. godine* i jugoslavenske strategije za postizanje ovih ciljeva, posebno onih koji su u vezi sa kvalitetom zdravstvenih usluga, u Sarajevu je održano više značajnih kolokvija i javnih skupova od kojih će se ovom prilikom navesti najvažniji a to su:

— *Konferencija u obezbjeđivanju kvaliteta zdravstvenih usluga,* organizator: Akademija nauka i umjetnosti Bosne i Hercegovine, Međuakademijski odbor za organizaciju zaštite zdravlja, Sarajevo, 22. maj 1986;

— *I kolokvij zdravstvene zaštite u Jugoslaviji do 2000. godine,* Sarajevo — Igman, 1—8. IX 1985, organizatori: Savezni komitet za rad, zdravstvo i socijalnu zaštitu, Beograd; Institut za socijalnu medicinu i organizaciju zdravstvene zaštite, Sarajevo; Savezni zavod za zdravstvenu zaštitu Beograd; Savez zajednica zdravstvene zaštite Jugoslavije, Beograd;

— *Stručni sastanak koordinatora Jugoslavenske strategije i ciljeva zdravlje za sve do 2000. godine,* Sarajevo, 30—31. 01. 1987. g., organizator: Institut za socijalnu medicinu i organizaciju zdravstvene zaštite Sarajevo.

U materijalima Evropskog ureda SZO: *Principi obezbjeđenja kvaliteta zdravstvenih usluga* kao jedan od zaključaka navodi se da postoje mogućnosti za poboljšanje kvaliteta usluga na svim organizacijskim nivoima zdravstvene zaštite, počevši od individualne interakcije između pacijenta i onog koji pruža uslugu pa kroz sve jedinice ustanova i regiona u zemlji. Imajući u vidu značaj kvaliteta zdravstvenih usluga kao i značaj njihove kontrole, kojoj je SZO posvetila posebnu pažnju u 1989. godini, a prateći i situaciju zdravstva u BiH, mi smo se danas u ovoj kući sastali da kažemo nešto i o kvaliteti usluga i njihovoj kontroli, i to o onom dijelu zdravstvenih usluga koje se odnose na kontrolu kvaliteta lijekova.

Dio uvodnog izlaganja na javnom sastanku Odjeljenja medicinskih nauka *Dobivanje kvalitetnog lijeka.*

Treba napomenuti da je ovo prvi javni skup u ANUBiH koji kao glavnu temu obrađuje oblast koja je od interesa za sve grane farmacije, a posebno za one koje su vezane za kontrolu lijeka i kvalitet usluga u farmaciji kao dijelu zdravstvene zaštite.

Kada se govori o kvalitetu i kontroli kvaliteta lijekova, mora se posmatrati cjelokupan rad farmaceutske struke, jer svaki dio rada u farmaceutskoj djelatnosti utiče na kvalitet lijeka. Opšte je poznato da zdravstvene djelatnosti mogu dati kvalitetne usluge samo ako ispunjavaju određene uslove. Nabrojiće se neki od njih: resursi, dobra organizacija i pravne regulative, ozbiljan i profesionalan pristup u bilo kojoj fazi rada i kvalitetan stručni kadar. Sve ovo vrijedi i za farmaceutsku djelatnost i bez dobrog kadra nije moguće dati kvalitetnu uslugu. Ovdje će se samo navesti kadrovska situacija u farmaceutskoj službi: u Jugoslaviji je u 1971. bilo zaposleno 3.829 farmaceuta. U narednim godinama broj zaposlenih farmaceuta se povećava:

— 1976. zaposleno je 4.574;
— 1980. zaposleno je 5.174;
— 1986. zaposleno je 6.145 farmaceuta.

Godišnja stopa zapošljavanja farmaceuta u zadnjih 15 godina iznosi oko 4%. Naizgled zadovoljavajuća, ova stopa je niža nego kod svih drugih zdravstvenih profila.

U 1986. kretanje broj zaposlenih farmaceuta u odnosu na broj stanovništva predstavljeno je u narednoj tabeli.

Tabela 1. KRETANJE BROJA FARMACEUTA U ODNOSU NA STANOVNIŠTVO 1986. GOD.

Teritorija	Broj stanovnika u 000	Broj farmaceuta	Opterećenost (broj stanovnika)	Obezbijeđen. na 10 000 stanovnika stopa
Jugoslavija	22425	6145	3650	2,74
BiH	4125	670	6155	1,62
Crna Gora	584	115	5078	1,97
Hrvatska	4601	1820	2528	3,95
Makedonija	1909	318	6003	1,66
Slovenija	1892	855	2213	4,52
Srbija	9314	2368	3933	2,54
SRS van SAP	5694	1712	3326	3,01
SAP Kosovo	1584	95	16674	0,60
SAP Vojvodina	2035	561	3627	2,76

Sada je situacija u Bosni i Hercegovini nešto bolja.

Po pitanju specijalističkog kadra u 1986. godini, registrirano je svega 473 specijalista, što predstavlja 7,7% od ukupnog broja farmaceuta. Od specijalnosti najviše je zastupljena biohemija (311 ili 65%). Ostale specijalnosti predstavljene su u tabeli 2.

Tabela 2. BROJ SPECIJALISTA U 1986. GODINI

Specijalisti	Broj
Ispitivanje lijekova	51
Biohemija	311
Toksikologija	14
Sanitarna hemija	23
Ispitivanje ljekovitog bilja	12
Ostali	62
Ukupno	473

Mora se napomenuti da je za dobar i kvalitetan rad u farmaciji, kao i za dobru kontrolu ovog rada, potrebna kontinuirana postdiplomska nadgradnja. Od farmaceuta se traži da rade na principima savremene zdravstvene zaštite i savremene farmakoterapije. Neoboriva je tvrdnja da svaki farmaceut koji ne obnavlja i ne osvježava svoje znanje poslije pet godina nije u stanju da ide ukorak sa savremenom farmaceutskom naukom, a poslije deset godina praktično je izgubljen za savremenu zdravstvenu zaštitu po pitanju mogućnosti da se ponovo rehabilituje. Imajući u vidu značaj koji ima stručni kadar u obavljanju kvalitetnih usluga, paralelno sa pažnjom koja se poklanja resursima treba u istoj mjeri pokloniti pažnju dodiplomskom i posdiplomskom uzdizanju kadrova, jer u protivnom oni neće moći da odgovore onim zahtjevima koje pred njih postavlja savremena kvalitetna zdravstvena zaštita.

Napomena: Brojčani podaci uzeti su iz materijala *Tematska konferencija: obrazovanje i usavršavanje kadrova farmaceutskih delatnosti*, Beograd 1988, organizator: Savez Farmaceutskih društava Jugoslavije, Savez zdravstvenih radnika Jugoslavije, Društvo farmaceutskih tehničara u saradnji sa Saveznom konferencijom Saveza socijalističkog naroda Jugoslavije i Saveznim većem sindikata Jugoslavije.

ANU
BiH
АНУ
БиХ

KVALITET U ISTRAŽIVANJU LIJEKOVA

SEID HUKOVIĆ i DUBRAVKA POTKONJAK
Institut za farmakologiju i toksikologiju Medicinskog fakulteta, Sarajevo

UDC 615.017

Apstrakt. U godini kvaliteta zdravstvene zaštite obavezno je ispitivati kvalitet lijekova. Kvalitet lijekova obuhvata kvalitet dobivanja i kvalitet upotrebe lijekova. U dobivanju lijekova, posebno novih, važna je farmakološka analiza, a to je među prvim koracima koje treba učiniti. Kvalitet istraživanja lijekova je prema tome od izuzetne važnosti. U kvalitetnom istraživanju lijekova jedna od prvih odluka koje treba donijeti je odluka da li je ispitivana supstanca pogodna za dalja istraživanja ili je treba odbaciti. Da se smanji opasnost od lažno-pozitivnih ili lažno-negativnih rezultata, korisno se mogu upotrijebiti istraživanja in vitro. Od istraživanja in vitro neophodna su ispitivanja na izoliranim organima kao model-sistemima. Od izoliranih organa posebno su kvalitetna istraživanja sa izoliranim organima koji se električki stimulišu uz istovremenu aplikaciju ispitivane supstance. Stimulišu se vanjski ili unutrašnji nervi i doda ispitivana supstanca koja će eventualno promijeniti efekt stimulacije nerva, a što se ne može vidjeti ako nema istovremene stimulacije. Na taj način se dobijaju rezultati koji imaju bolju prognostičku vrijednost.

Ključne riječi: model-sistemi, izolirani organi, kvalitet istraživanja.

UVOD

Upravo se navršila »Godina kvaliteta u zdravstvenoj zaštiti«, u kojoj se raspravljalo o raznim aspektima zdravstvene zaštite. Jedan od važnih aspekata kvaliteta zdravstvene zaštite su lijekovi, a u godini kvaliteta i kvalitet lijekova. Dva su osnovna aspekta kvaliteta lijekova; dobivanje i upotreba lijekova. Dobivanje i istraživanje lijekova ne spada samo u medicinsku naučnu oblast nego se dobivanjem i istraživanjem lijekova više ili manje bave sve naučne oblasti od prirodoslovnih, tehničkih do društvenih naučnih oblasti, naravno uz medicinske naučne oblasti, struke i discipline.

U raspravi o kvalitetu zdravstvene zaštite treba spomenuti dva osnovna kvaliteta koji su u međusobnoj vezi. Jedan kvalitet je kvalitet života pod uticajem lijekova (Bulpit and Fletcher, 1990;

Izradu ovog rada je sufinansirao SIZ nauke BiH.

Palmer et. al., 1990), a drugi kvalitet je ukupnost svih činilaca koji osiguravaju kvalitetan i siguran rad zdravstvene zaštite. Prvi korak u procesu procjene kvaliteta života je prelaženje od apstraktnog koncepta prema operacionalnoj definiciji (Kerlinger, 1973), a to je »konstituitivna definicija« u smislu fizikalnog, društvenog zdravlja i dobrog soocijalng funkcionisanja (Callender, 1990). Operacionalne definicije su obično jasnije i preciznije.

Dva su aspekta lijekova o kojima se najviše piše, a to su, kako je ranije napomenuto, a) dobivanje i, sa njim u vezi, istraživanje lijekova i b) racionalna upotreba lijekova. Isto tako se kvalitet zdravstvene zaštite, što se tiče lijekova, može svesti na dva osnovna kvaliteta, a to su: a) efektivnost i sigurnost lijeka i b) dostupnost i ugodnost lijeka. Što se tiče efektivnosti i sigurnosti lijeka, misli se na to da za svakog bolesnika postoji djelotvoran i podnošljiv lijek, a što se tiče dostupnosti, misli se da je svakom bolesniku takav lijek dostupan, ugodan i da postoji maksimalno povoljan odnos (zdravstveni radnik — pacijent) i dostojanstvo prema pacijentu u dobivanju i upotrebi takvog lijeka.

Kvalitetno istraživanje novih lijekova i svojstava postojećih lijekova je zadaća akademskih institucija (univerziteti, samostalne naučne ustanove, akademije nauka), farmaceutske industrije, ustanove zdravstvene zaštite i brojnih drugih ustanova. Da se poboljša kvalitet istraživanja lijekova, treba: a) što više istraživati; b) popravljati odnos između proizvodnje, marketinga i istraživanja; i c) usavršavati oblike lijekova u interesu biodostuposti, ugodnosti i estetike. Kvalitetna istraživanja lijekova moraju početi sa jasnim ciljem i predanošću.

Za kvalitetno istraživanje lijekova je od izuzetne važnosti prva farmakološka faza, a to je kada se odlučuje da li nastaviti sa istraživanjem neke supstance ili pomenuto istraživanje napustiti. U toj fazi prijeti opasnost lažno-pozitivnih i lažno-negativnih rezultata. Prijeti opasnost da nekoj supstanci pripišemo takva svojstva da je treba dalje ispitivati, a ona u stvari nema djelotvornosti, ili je neinteresantna. Prijeti također opasnost da neku supstancu odbacimo kao nevrijednu, a ona je u stvari supstanca koju vrijedi dalje ispitivati. Ima primjera i za jednu i za drugu mogućnost i propust.

U medicinskoj naučnoj oblasti, pa tako i u nauci o lijekovima važe dva aksioma. Prvi je aksiom da je medicinska nauka kontinum, a drugi aksiom je da mali uvid može dati veliki efekt. To znači da se za kvalitetno istraživanje lijekova treba oslanjati na dosadašnje podatke i literaturu, a sa druge strane, da se pomenuti manji i kraći uvid može ostvariti u svakom laboratoriju. Cilj ovog rada je opisati neke aspekte razvoja lijekova i ukazati na metode rada, kada i kako se mogu ostvariti pomenuti aspekti. Jedna od takvih metoda su početna i odlučujuća istraživanja in vitro na izoliranim organima. Zadatak je opisivati pojedine prve faze razvoja lijekova, ukazati na glavne pravce budućeg razvoja i osnove na kojima postoji takav razvoj.

MATERIJAL I METODE

Da se omogući što uspješnije i kvalitetnije donošenje odluke o tome da li nastaviti ili napustiti istraživanje neke supstance kao potencijalnog lijeka, upotrebljavaju se baterije testova in vitro i in vivo. Izbor testova se usmjerava prema tome šta se očekuje od neke supstance, a očekivanje se može naslutiti na osnovu građe, sličnosti sa drugim lijekom, ili na osnovu primarnog iskustva. Ukoliko se očekuje djelovanje na vegetativnim organima, onda će se baterija testova usmjeravati prema vegetativnim organima prvenstveno iz probavnog, genbitourinarnog ili kardiovaskularnog sistema. Ukoliko se želi ispitivati imunomodulacija, onda će se upotrebljavati baterije testova za određivanje imunomodulatora itd.

Nakon što se prvo odredi samo na jednoj životinji in vivo efekt neke supstancije (obično se radi o većoj dozi i postupku koji spada u »vivisekciju«), prelazi se na rad in vitro. Posebno su interesantni i relevantni postupci na poliorganskim sistemima, što čini prelaz između in vitro i in vivo ispitivanja. Takve preparacije su na primjer perfuzioni eksperimenti srce — pluća, zatim preparacije sa očuvanim pripadajućim motornim i sekretornim nervima i slični eksperimenti. Preparacije sa više organskih sistema, odnosno sa organima iz više organskih sistema mogu biti više ili manje kompleksni. Najmanje kompleksni i zato povoljni su organi sa pripadajućim motornim nervima. Posebna vrsta in vitro eksperimenata je na perfundovanim organima sa očuvanim vegetativnim nervima.

Današnja moderna ispitivanja se najučestalije vrše na subcelularnim strukturama po mogućnosti na polimolekularnom ili molekularnom nivou. Sve su manje strukture koje se ispituju kao potencijalni partneri djelovanja farmaka. Spoznajom struktura receptora spustila su se ispitivanja na molekularni, pa čak submolekularni nivo. Neki istraživači idu dotle da tvrde da nije više potrebna biološka struktura, jer su spoznaje receptora ili dijelova receptora takve da je dovoljno raditi na neživom materijalu i konstruktu receptora (Goodford, 1987).

Analiza rezultata dobivenih na izoliranim strukturama je moguća mada se ne dobije mnogo podataka. Uglavnom se dobiju podaci da neka supstanca povećava ili smanjuje izazvane reakcije. Ima takvih preparacija kada organ spontano funkcioniše, kao na pr., srce ili atrija, pa nije potrebna stimulacija pripadajućeg nerva za osnovno ispitivanje. Većina organa nema spontane vidljive mehaničke funkcije, pa ih treba direktno ili indirektno, stimulisati na funkcije. U tom slučaju se promatra, registruje i analizira promjena efekta stimulacije. Posebno je važno analizirati relativnu ili apsolutnu promjenu visine kontrakcije. Naime, važan je izlazni položaj.

Najproduktivnije je istraživati kvantitativno i u isto vrijeme, kvalitativno u smislu sile ili veličine izazvanog pokreta. Apsolutna visina kontrakcije je ona visina koja je od kontrole bazalne linije, tj. od početne bazalne linije. Relativna visina kontrakcije je ona visina koja polazi od nove bazalne linije koja ima novi izlazni položaj u odnosu na kontrolu.

REZULTATI

Treba razlikovati rezultate dobivene na organima koji pokazuju vidljivu spontanu promjenu, odnosno vidljive mehaničke kontrakcije, kao što je na pr. srce, i rezultate dobivene na organima koji se stimuliraju na kontrakcije, jer nemaju spontanih kontrakcija, kao što je na pr. duktus deferens. U ovom drugom slučaju to može biti hemijska ili električna stimulacija, i prati se promjena efekta stimulacije. Mnogo će se lakše otkriti efekt neke supstance i manje upasti u grešku ako se uz istovremenu električnu stimulaciju apliciraju supstance nego ako se apliciraju same supstance.

Efekt električne stimulacije pripadajućih nerava

Električna stimulacija vanjskih ili unutrašnjih nerava izaziva u najvećem broju slučajeva kontrakcije. Rjeđe je da će efekt električne stimulacije nerava izazvati relaksaciju organa. Ukoliko se radi o miješanim nervima, onda se registruje dvofazna reakcija, kontrakcija nakon koje će uslijediti relaksacija. Poseban je slučaj nekih organa kada će se registrovati relaksacija, a u stvari se radi o kontrakciji i stiskanju mišića. Taj slučaj nastaje zbog mehanike i načina vezivanja organa za transducer, posebno ako je organ spiralno isječen.

Efekt hemijske stimulacije

U nekim eksperimentima se u konstantnim intervalima inicira ju konstantne količine nekog transmitora i dobiju se ravnomjerne reakcije glatkomišićnih organa. Obično su to supstancije koje su inače transmitori neuromišićne transmisije, kao što su acetilholin, noradrenalin i sl. Analiza rezultata se vrši slično kao kod električne stimulacije. U pomenutom slučaju se ispituje modifikatorska djelotvornost ispitivane supstance.

Prethodno pripremljeni organi ex vivo

U nekim slučajevima se životinje senzibiliziraju ili tretiraju na neki drugi način, tako da se dobiju organi ex vivo. Izaziva se odgovarajuća reakcija, na pr. reakcija antigen-antitijelo u prisustvu ispitivane supstance, pa se promatra promjena izazvanih reakcija. Također se ispituju promjene na fetalnim organima, na organima starih životinja, na organima intoksiciranih životinja, a postoje i razne druge mogućnosti.

DISKUSIJA

Kvalitet ispitivanja lijekova je potreban u svakoj fazi, ali je odlučujuća početna faza u ispitivanju neke nove supstance, kada treba odlučiti da li nastaviti istraživanja ili odbaciti neku supstancu kao neinteresantnu. U toj fazi se mogu učiniti pogreške u smislu lažno-pozitivnih ili lažno-negativnih rezultata.

Da se izbjegnu greške prilikom ispitivanja, predloženo je da se vrše ispitivanja djelovanja nekih supstanci ne samo kada organ miruje nego i onda kada se organ stimuliše na kontrakciju. Ta stimulacija može biti učinjena hemijskom ili električnom stimulacijom pripadajućih nerava.

U zadnjih desetak godina sve je manje novih lijekova, misli se novih supstanci, i sve je dulja latencija između pronalaska lijeka i njegove upotrebe (Black, 1986; Cromie, 1986; McEwen, 1986). Isto tako, sve se manje istražuju lijekovi tzv. sirotani, a to su lijekovi čija je prodaja mala ili neisplativa (Snell, 1986; Turner, 1986). Radi se o trendu kojeg treba zaustaviti ili preokrenuti. U godini kvaliteta zdravstvene zaštite potrebno je povesti računa o što kvalitetnijem istraživanju lijekova, budući da su lijekovi vrlo važna komponenta zdravstvene zaštite, a zdravstvena zaštita zapošljava u razvijenim zemljama preko 12% svih zaposlenih. Potrebno je učiti i unapređivati, a ne ograničavati i kažnjavati (Donabedian, 1989).

Sve će biti više potrebno istraživanja u želji da se dobiju kvalitetni lijekovi. Vrijeme je lijekova većih molekula-polimera, pa čak bionike i subcelularnih struktura kao lijekova. Vremenom će biti potrebno sve više naučno-istraživačkog rada da se dođe do novih lijekova. Posebno će mjesto zauzimati biotehnologija, čiji će zadatak biti pretvoriti pronađenu strukturu u novi lijek. Radi se o istraživanju galenskih fenomena i procesa na intramolekularnom nivou. Tablete, supozitorije, masti, solidne i semislodne forme, emulzije i mikrokapsule dobijaju nove strukturne karakteristike, novu tzv. mehaničku aktivaciju. Međutim za sve treba početak, a taj početak treba ostvarivati in vitro, od čega su izolirani inervirani organi važan dio.

Pretvaranje genetsko-bioinženjersko-tehnološkog u galenski preparat će biti sve teže i sofisticiranije. Nije lako pretvoriti biološki aktivan protein u lijek. Mnoge su nepoznanice i teškoće, kao što su denaturacija, inaktivacija, dekompozicija, konformacija i sl. Radi se o sekundarnim, tercijarnim, pa čak i kvartarnim strukturalnim promjenama koje treba stabilizirati i optimizirati. Kao novi lijekovi ne spominju se samo proteini nego i nukleinske kiseline, nukleoproteini, interleukini. Za sve pomenute supstance važi kvalitativno-kvantitativna provjera, primarna provjera na izolovanim strukturama in vitro, kako je to opisano u ovom radu.

THE QUALITY OF DRUG INVESTIGATION

Summary

In the year of the quality of health care quality of drug reslarch was stressed. One of the first steps in the pharmacological evaluataon of substances is in vitro investigation. The isolated organs with extrinsic and intrinsic nerve electrical stimulation could be used to get the results for the first decision about the quality of future drugs. Using the isolated organs with a simultaneous stimulation of their motor nerve, the danger of false-positive or false-negative results could be decreased. It is a danger to accept substance for further

investigation or to abandon the substance which could be a useful futhure drug. The isolated and innervated organs as model-systems could help to make adequate decisions.

LITERATURA

Black, J. (1986): *Basic Drug Research in Universities and Industry.* Br. J. cli. n. Pharmacol., 22, 58—78.

Bulpitt, C. J. and Fletcher, A. E. (1990): *The Measurment of Quality of Life in Hypertnesive Patients: a Practical Approach.* Br. J. clin. Pharmacol. 30, 353—365.

Callender, J. S. (1990): *Assesment of Quality of Life in the Treatment of Hypertension.* Br. J. clim. Pharmacol, 30, 345—351.

Cromie, B. V. (1986): *Drug Research and Development in the Pharmaceutical Industry,* 22, 98—158.

Donabedian, A. (1989): *Institutional and Professional Responsibilities in Quality Assurance.* Qyality assurance inhelath care, 1, 3—11.

Goodford, P. (1987): *Receptor-Based Drug Design.* U Rand, M. J. and Raper, C.: Pharmacology, Excerpta Medica, Congres Series, s. 607—614.

Kerlinger, F. N. (1973): *Foundation of Behavioural Research.* Second Edition, Holt-Saunders International Editions.

McEven, J. (1986): *Contribution of universities to drug evaluation.* Br. J. Clin. Pharmacol. 22, 156—198.

Palmer, A., Flecher, A., Hamilton, G., Muriss, S. and Bulpitt, C. (1990): *A Comparission of Verapamil and Nifedipin on Quality of Life.* Br. J. Clin. Pharmacoll. 30, 365—371.

Snell, E. S. (1986): *Profitability and Improved Patient Care, Industry's Viewpoint.* Br. J. Clin. Pharmacol, 22, 338—418.

Turner, P. (1986): *Profitability and Improved Patient Care, Physician's Viewpoint.* Br. J. Clin. Pharmacol., 22, 418—458.

AUTOBIOESEJ U KONTROLI KVALITETA LIJEKOVA

SEID HUKOVIĆ, NEDŽAD MULABEGOVIĆ, ELVEDINA KAPIĆ, IRIS RAJMAN, BILJANA IVKOVIĆ i NEDIM HUKOVIĆ

Institut za farmakologiju i toksikologiju Medicinksog fakulteta, Sarajevo

UDC 615.017

Apstrakt. Autobioesejom na izoliranim organima se naziva analiza djelovanja egzogeno dodatih lijekova uz istovremenu stimulaciju pripadajućih motornih nerava. Autobioesejom, posebno upotrebom izoliranih inerviranih organa, se mogu dobiti brzi, relevantni i pouzdani rezultati u kontroli kvaliteta lijekova. Pomenuti izolirani i inervirani organi će dati rezultate ako se upotrebljavaju kao instrument, ili ako se upotrebljavaju kao mjesto djelovanja lijeka, u ovom drugom slučaju u smislu da se registruje efekt lijeka. Pod uticajem istovremene stimulacije pripadajućih nerava i pod uticajem dodate supstance registruju se efekti koji se inače ne bi mogli registrovati niti uočiti. Pomoću autobioeseja sa izoliranim tkivima se može izbjeći vivisekcija, posebno ona koja se čini ponavljanjima, da se zadovolje određeni standardi. Isto tako, autobioesej može poslužiti radi ispitivanja neurotransmisija i kotransmisija, a oni su nezaobilazni u tumačenju kvaliteta djelovanja lijekova. Izolirani organi mogu biti modificirani na razne načine tako da budu što vrjedniji. Prethodna modifikacija može biti farmakološka, mehanička, in situ i in vitro. Opisane su takve modifikacije tako da liče ispitivanja in vitro onima in situ i in vivo. Preporučena je upotreba auotbioeseja u kontroli kvaliteta lijekova i njihovog djelovanja.

Ključne riječi: autobioesej, izolirani organi, kontrola kvaliteta.

UVOD

Autobioesej se u farmakološkoj analizi mnogo manje koristi nego što to zaslužuje s obzirom na njegovu vrijednost, relevantnost i efikasnost. Pod pojmom autobioeseja se podrazumijeva biološko ispitivanje lijekova kada se koristi biološko tkivo kao instrument i kao predmet djelovanja lijekova. Uz to se stimulišu vlastiti nervi pomenutog organa a dodaje se i ispitivana supstanca (R a n d and M i t c h e s o n, 1986).

Ukoliko se istovremeno stimulišu vanjski ili unutrašnji nervi i dodaje ispitivana supstanca, onda se radi o uzajamnom djelovanju — a) endogenog transmitora i b) egzogeno dodate ispitivane supstance.

Izradu ovog rada je sufinansirao SIZ nauke BiH iz sredstava DC XIV.

U tom slučaju dolazi do uzajamnog uticaja endogenih i egzogenih aktivnih supstanci. Ako se radi o izoliranim i inerviranim mišićnim organima, oni u tom slučaju postaju osjetljiviji i pogodniji za ispitivanje kvaliteta i kvantiteta djelovanja lijekova. Efekt dodate supstance se pojačava ili otkriva (Huković, 1980).

Opisani način djelovanja i ispitivanja djelovanja kada se istovremeno stimuliraju motorni nervi i izvana dodaju ispitivane supstance Rand i Mitchelson (1986) su nazvali autobioesej. To su tzv. model-sistemi izolirani i inervirani organi (IIO) pogodni za mnoge vrste bioeseja. Razlikuju se dvije vrste model-sistema; prva vrsta su oni organi koji se spontano kontrahiraju (na pr. srce), druga vrsta su oni organi koji ne pokazuju spontane reakcije, pa ih na reakciju nagone električne stimulacije pripadajućih motornih nerava.

Za razumijevanje djelovanja pomenutih bioloških struktura koje služe kao instrument ili kao objekt-predmet djelovanja pojedinih lijekova, treba razumjeti neurotransmisiju i kotransmisiju. Danas se govori o glavnom transmitoru i brojnim kotransmitorima kako u vegetativnim organima tako i organima inerviranim somatskim nervima (Burnstock, 1990). Pomenuti model-sistemi mogu biti pogodan model ne samo za ispitivanje kvantiteta i kvaliteta djelovanja lijekova nego također mogu biti pogodni i za ispitivanje nervne transmisije i kontransmisije.

Cilj ovog rada je opisati postupak za kvalitativno ispitivanje lijekova pomoću autobioeseja, koristeći se izoliranim inerviranim organima. Cilj je također ukazati da ovi organi mogu biti upotrijebljeni za ispitivanje nervne transmisije i kotransmisije.

MATERIJAL I METODE

Izolirani organi sa pripadajućim nervima su uzimani od eksperimentalnih životinja, od domaćih životinja iz klaonice i od ljudi. Od ljudi se uzimaju odbačeni dijelovi organa odbačenih za vrijeme operacija. Najpogodnije eksperimentalne životinje su mlađe životinje, 80% od maksimalne težine; obično su to životinje oba pola, jer se često uzimaju dijelovi organa iz genitourinarnog sistema.

Uzimaju se slijedeći organi sa pripadajućim vanjskim motornim nervima: mokraćni mjehur sa pelvičkim holinergičkim nervom, duktus deferens sa hipogastričkim adrenergičkim nervom, iris sa cilijarnim nervom, ezofagus sa vagusnim ezofagealnim nervom, želudac sa gastričkim vagusnim nervom, kolon sa dva nerva hipogastričkim adrenergičkim i pelvičkim holinergičkim nervom. Ovo su samo neki model-sistemi koji se najčešće upotrebljavaju mada postoje brojni model-sistemi iz raznih organskih sistema.

Ukoliko je pripadajući vanjski nerv nježan i prijeti opasnost da pukne, onda se uzima sa okolnim tkivom, npr. sa adventicijom ili, u slučaju preparacije želuca miša, uzima se gastrični ogranak vagusnog nerva sa ezofagusom, s tim da se mišićni dio ezofagusa presječe.

U tom slučaju se u prstenaste elektrode uvlači presječeni ezeofagus, ali uz intaktne nerve. Postoje organi koji su osjetljivi na manipulaciju i dulju hipoksiju (na pr. srce). Takvi organi se prethodno perfundiraju i ispiru sa otopinom u kojoj će se kasnije suspendirati ili perfundirati.

Nakon preparacije mišićnog organa i njegovog nerva — a detaljna tehnika preparacije je ranije opisana (H u k o v i ć, 1980) — organ se suspendira u posudu za izolirane organe. Posuda sadrži tačno određenu količinu zagrijane i aerirane otopine, obično 20 ml. Nervi se uvlače u elektrodu prije ili poslije suspenzije organa, što ovisi od tehničkih mogućnosti. Organ se priveže za transducere i, ukoliko je organ pokretan (na pr. duktus deferens), onda je bolji izotonički transducer, i obratno, ukoliko organ razvija silu (na pr. krvni sud), onda je bolji izometrijski transducer. Postoje tzv. auksotonički transduceri kojima se mjeri i sila i pokret.

Nakon suspenzije se izolirani organi neko vrijeme adaptiraju u posudi za izolirane organe, a onda počinje električna stimulacija motornog nerva. Stimulacija može ići preko vanjskog nerva ili preko unutrašnjeg nerva tzv. koaksijalna ili transmuralnom stimulacijom. Nekada je stimualcija miješana preko vanjskog i unutrašnjeg nerva ili ganglija. Stimulira se u početku da se ustanovi jednakomjerna kontrolna kontrakcija da bi se imala kontrolna vrijednost. Najbolje je naći kontrolnu visinu koja je Emax/2, tj. polovinu maksimalne kontrakcije, što se postiže mijenjajući jačinu električnog impulsa. Nakon nekoliko kontrolnih jednakomjernih kontrakcija, dodaje se ispitivana supstanca. Odgovor organa može biti povećanje ili smanjenje visine izazvanih kontrakcija, promjena bazalne linije, odnosno kombinacija pomenutih promjena. Posuda se zatim ispire i ponovo registruju kontrolne kontrakcije. Registruje se najmanje šest kontrolnih kontrakcija prije nego se dodaje ispitivana supstanca.

U kontroli kvaliteta i kvantiteta lijekova se obično radi tako da se dodaje ispitivana supstanca i uporedi sa standardom, odnosno sa rezultatom koji je ranije registrovan sa supstancama sličnog djelovanja. Iza toga se supstanca ispire, pa se prati koliko će brzo doći do kontrolnih vrijednosti. Nekada su potrebna višekratna ispiranja. Vrijednost se izražavaju u apsolutnim ili relativnim vrijednostima promjene visine izazvanih kontrakcija, odnosno tonusa. Promjene koje se registruju uzevši u obzir kontrolnu bazalnu liniju se nazivaju apsolutne, a promjene od nove bazalne linije se nazivaju relativne. Na pr., ako se radi o povećanju visine izazvanih kontrakcija i ako se mjeri od kontrolne bazalne linije, onda se govori o apsolutnoj visini kontrakcija. Ako se mjerenje vrši od nove bazalne linije, koja je povećana zbog uticaja ispitivane supstance, onda se visina izazvanih kontrakcija naziva relativna visina.

Supstance koje se ispituju na ovaj način, in vitro, koristeći kao model-sisteme izolirane i inervirane organe, su u pravilu hidrosolubilne. Ukoliko supstanca nije hidrosolubilna, onda se pokušava napraviti suspenzija. Ponekad je potreban poseban vehikulum. Ako se to dogodi, onda je potrebno provjeriti djelovanje vehikuluma. Ako ve-

hikulum ima djelovanje per se, potrebno je to djelovanje u prosuđivanju kvaliteta lijekova uzeti u obzir. Supstance koje se ispituju treba ostaviti neko vrijeme u posudi, ali to vrijeme mora biti toliko da se može vršiti komparativna analiza.

REZULTATI

Efekt električne stimulacije

Električna stimulacija pripadajućih motornih nerava će izazvati kontrakciju, relaksaciju ili, najčešće, kombinaciju. Prvo će uslijediti kontrakcija iza koje slijedi spora relaksacija. Mnogo se lakše registruju promjene koje su čista kontrakcija nego efekt koji je čista relaksacija. Zahtjev je da konstantan električni stimulus izaziva ravnomjerne promjene. Kontrakcije se mogu ponavljati više stotina puta ukoliko interval među kontrakcijama nije prekratak. Intervali mogu biti od 10 do 60 sekundi. Kontrakcije mogu biti izazvane pojedinačnim impulsima ili serijom impulsa, kada nastaju tetaničke kontrakcije. Kod nekih organa je potrebno produžiti interval na 120 sekundi, kao na pr. kod izoliranog želuca.

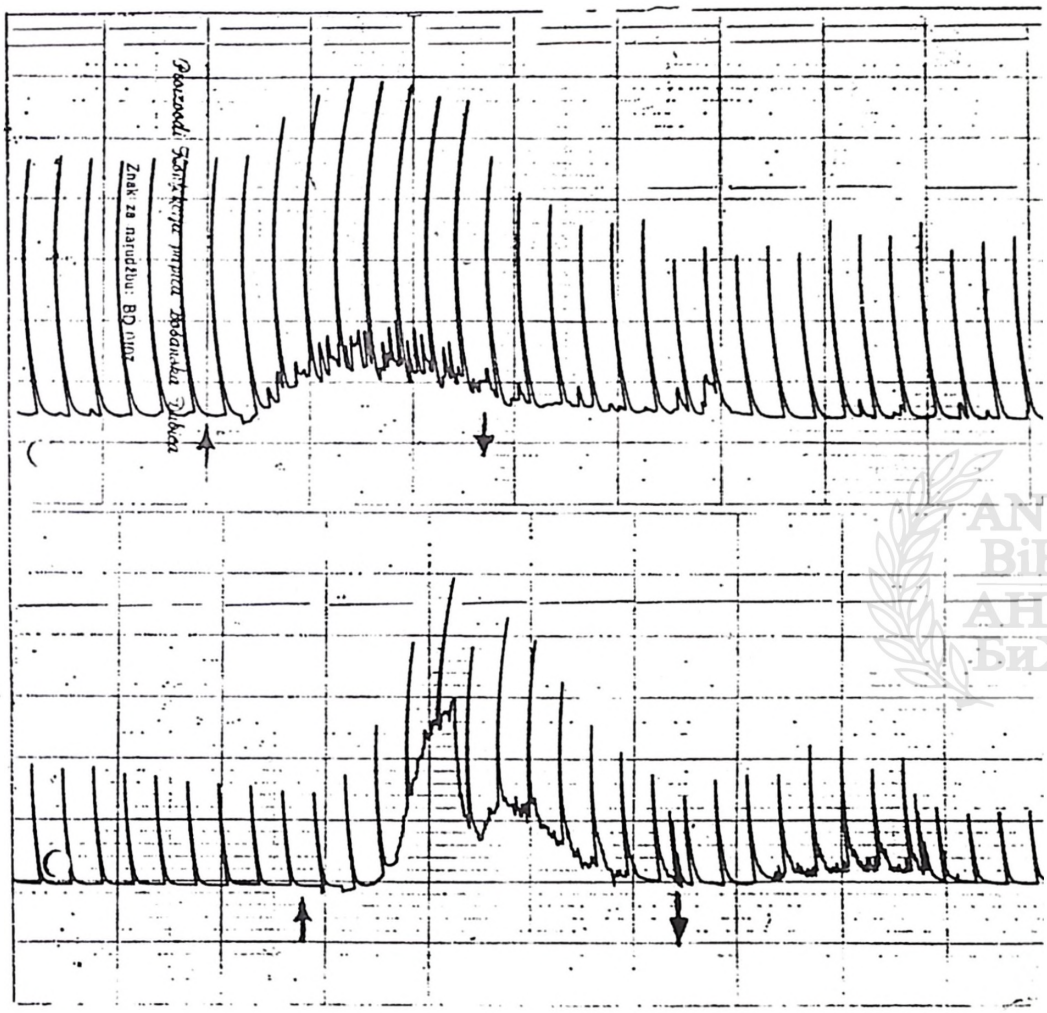
Električni impulsi su pojedinačni ili u seriji. Za organe kao što je ezofagus, m. tenzor timpani, dijafragma, odnosno ako se radi o poprečno-prugastim mišićima, impulsi su pojedinanči. Ako se radi o organima koji imaju glatke mišiće, onda je najpogodnija stimulacija sa električnim impulsima slijedećih karakteristika: 10—20 Hz, duljina impulsa manja od 1mSek, a jačina impulsa 10—20 mA. Trajanje serije impulsa je jedna sekunda, a intervala 60—120 sekundi.

Efekt ispitivane supstance

Efekt ispitivane uspstance može biti povećanje ili smanjenje izazvanih kontrakcija, povećanje ili smanjenje bazalne linije (tonusa). Mnogo je rjeđe da je efekt dodate supstance relaksacija, odnosno promjena pravca efekta stimulacije nerava. Takva inverzija efekta da u kontrolnim uslovima dolazi do kontrakcije, a nakon tretiranja dolazi do relaksacije se može vidjeti ako je životinja prethodno tretirana sa rezerpinom ili nekom drugom supstancom koja mijenja sistem glavnog transmitora. Događa se ometanje oslobađanja, stvaranja ili sličnih modifikacija transmitornog sistema. Rezultat djelovanja neke supstance je modifikacija apsolutne ili relativne visine kontrakcije. Promjena apsolutne visine kontrakcije se računa kao promjena od kontrolne bazalne linije, dok se promjena relativne visine računa od promijenjene bazalne linije (sl. 1).

Kao što se vidi na sl. 1, ispitivana supstanca u konkretnom slučaju latrotoksin, može povećati visinu kontrakcija i tonus. U ovom slučaju se radi o pojačanom oslobađanju transmitora. Transmitori nisu isti u oba primjera. U slučaju mokraćnog mjehura glavni transmitor je acetilholin, a u slučaju duktus deferensa glavni transmitor je noradrenalin. Promijenjen je tonus organa i visina kontrakcija. Vjerovatno

se oslobađa brzo tokom stimulacije transmitor iz nerva i tako izaziva promjene visine kontrakcije, ali se istovremeno oslobađa transmitor iz spremišta u tkivu i to sporije i dijelom bez veze sa stimulacijom. Pomenuti efekti se superponiraju, pa postoji povećanje kako apsolutne tako i relativne visine kontrakcija.



Slika 1. Kontrakcije izazvane stimulacijom vanjskih nerava. Gore mikcione kontrakcije, dole kontrakcije duktus deferensa. Kod znaka ↑ dodat je latrotoksin, a kod znaka ↓ posuda je isprana. Primijetiti povećanje tonusa i visine izazvanih kontrakcija

Efekt prethodno promijenjenog organa

Organi za ispitivanje u smislu autobioeseja mogu se uzimati od kontrolnih i od zdravih životinja, ili od životinja koje su prethodno tretirane, dakle još in situ. Prethodno tretiranje se može izvesti bilo da se kasnije povećavaju ili smanjuju izazvane reakcije. Organi koji

će kasnije služiti kao model-sistemi za ispitivanja mogu biti prethodno in vitro mijenjani farmakološki ili mehanički. Farmakološki se obično tretiraju radi odstranjivanja dijela inervacije, pa se otkriva sekundarna inervacija, odnosno kotransmisija. Mehanički se tretiraju na taj način da se okreću kao prst na rukavici, tako da ispitivana supstanca dolazi prvo na mukozu, iako prvo dolazi na serozu.

Organi in situ uz održani krvtook ili bez krvotoka

Pojedini organi mogu se preparitati tako da se stimuliraju njihovi motorni nervi, a da je očuvan krvotok, dakle i situ i in vivo. Tako se mogu registrovati efekti supstanci apliciranih direktno na organ ili u venoznu krv. Mogu se međutim preparirati organi koji se nalaze in situ, ali na mrtvoj životinji, gdje nema vlastite cirkulacije, pa se mora osigurati suspenzija, ispiranje i oksigenacija. U tom slučaju se od šupljine gdje se nalaze takvi organi napravi mjesto gdje se drži otopina kao u posudi za izolirane organe. Razumljivo da se u tom slučaju nervi uvlače u elektrodu, a oni su potopljeni isto kao i organ koji se kontrahuje.

DISKUSIJA

Autobioesej na izoliranim i inerviranim organima (IIO), kao i na modifikacijama takvih preparacija se relativno rijetko iskorištava u kontroli kvaliteta lijekova. Manje korištenje takvih IIO ima dva uzroka. Takvi organi mogu biti instrument na kome se ispituje, a mogu biti i predmet istraživanja, tj. da se vidi efekt ispitivane supstance. Prvi od uzroka što se IIO manje upotrebljavaju je postojanje elektronskih instrumenata i aparata velike osjetljivosti. Manjak, samo i jedne upotrebe aparata, jeste da se na IIO osim mjere mogu dobiti drugi efekti. Drugi uzrok leži u tome jer se misli da su model-sistemi apstrakcija u odnosu na djelovanje lijekova in vivo. Djelovanja in vivo su sasvim drugačija kvalitativno i kvantitativno.

Autobioesej na opisanim organima može biti alternativna metoda istraživanja viviseksiji (Lembeck, 1988; Holzer, 1988; Huković i Potkonjak, 1991). Danas se ispitivanje lijekova putem vivieskcije, posebno ona koja idu sa testiranjima i njihovim ponavljanjima, smatraju nepotrebnim, skupim i irelevantim. Model-sistemi mogu dobro zamijeniti neke vivisekcijske metode, a da se ne izgubi ništa od spoznaje o kvalitetu lijekova. Autobioesej sa IIO daje također mogućnosti za ispitivanje endogene transmisije i kotransmisije (Burnstock, 1990). Za objašnjenje mehanizma djelovanja u analizi kvaliteta lijeka je važno poznavati neurotransmisiju i neurokotransmisiju.

Autobioesej na IIO kao model-sistemima otvara mogućnost utvrđivanja koji, kada i koliko se neurotransmitora oslobađa nakon stimulacije nerava. Sve je više revijalnih publikacija o kotransmisiji. Neka se spomenu samo novije: Hokfelt i sar. (1986), Campbell (1987), Bartfai i sar. (1988), Furnes i sar. (1989), Kupfer-

mann (1990). Po svemu izgleda da je hipoteza o kotransmisiji prihvaćena i da je danas malo autora koji misle da se nakon stimulacije motornog nerva oslobađa samo jedna supstanca. Piše se o jednom glavnom neurotransmitoru i pomoćnim kotransmitorima. U tumačenju djelovanja lijekova i u njihovom ispitivanju kvaliteta nezaobilazni su neurotransmitori.

Danas su ustanovljeni slijedeći neurotransmitori potrebni za tumačenje djelovanja lijekova. To su: noradrenalin, acetilholin, adenozintrifosfat, serotonin, dopamin, enkefalin-dinorfin, vazoaktivni intestinalni polipeptid (VIP), supstanca P, gastrin (relizing) peptid (GRP), somatostatin, neurotenzin, vazopresinu sličan peptid (VP), holecistokinin-gastrin, neuropeptid Y-pankretaički neuropeptid (NPY), galanin (GAL), angiotenzin, ACTH i kalcitonin (gen-related) peptid (CGRP) (Burnstock, 1990). Svi pomenuti neurotransmitori mogu biti glavni ili kotransmitori. Svi oni mogu biti relevantni za vrednovanje kvaliteta lijeka na IIO. Međutim, model-sistemi opisani u ovom radu mogu biti vrlo koristan i produktivan instrument za proučavanje transmisije i kotransmisije, a ne samo za ispitivanje djelovanja lijekova.

Autobioesej u kontroli kvaliteta i kvantiteta djelovanja lijeka može poslužiti za brzu, efikasnu i jeftinu analizu djelovanja. Da se autobioesej usavrši, potrebno je ponoviti i standardizirati procedure i na taj način unaprijediti metodologiju istraživanja lijekova u dva pravca. Dodati savremenim elektronskim aparatima, koji dobro mjere kvantitativni i kvalitativni aspekt. To će biti moguće ako se uz njih uključe i opisani model-sistemi, naime biće moguće na autobioeseju vidjeti i registrovati i druga kvalitativna, prvenstveno nova djelovanja lijekova.

ZAKLJUČAK

Autobioesej u kontroli kvaliteta lijekova je upotreba biološkog materijala uz istovremenu reakciju izazvanih vlastitih neurotransmitora. U radu je opisan poseban materijal za autobioesej, a to su izolirani i inervirani organi koji kao model-sistemi mogu dobro poslužiti u analizi kvaliteta djelovanja lijekova. Autobioesej je primijenjen zbog toga jer se uz istovremenu električnu stimulaciju nerava dodaju ispitivane supstance, pa se superponiraju dva efekta, efekt endogenih i egzogenih supstanci.

Izolirani organi kojima se in vitro stimuliraju motorni nervi mogu znatno unaprijediti efikasnost, relevanciju i brzinu farmakološke analize kvaliteta i kvantiteta. Oni mogu biti upotrijebljeni i kao instrument i kao mjesto na kojem će se vidjeti djelovanje lijeka, što može biti od koristi za procjenu djelotvornosti nekog lijeka.

Autobioesej, upotrebom IIO će smanjiit teškoće i nemogućnosti vivisekcije, posebno onda kada je potrebna za ponavljanja i tesitranja, a što se radi da se zadovolje standardi. Osim za standardizaciju IIO koji služe za autobioesej, mogu su upotrijebiti za ispitivanje neurotransmisije i kotransmisije, jednog novog polja istraživanja.

Opisani su IIO koji se uzimaju od kontrolnih životinja, od životinja kod kojih se izazvana model-oboljenja. Isto tako su opisane farmakološke i mehaničke modifikacije, zatim upotreba organa in situ, koji su donekle slični upotrebi in vitro. Sve pomenute modifikacije znatno unapređuju farmakološku analizu u ispitivanju kvaliteta lijekova.

AUTOBIOASSAY IN THE QUALITY CONTROL OF DRUGS

Summary

Autobioassay can be used in analyses of drug effects in two ways. It can be used as an instrument or as a place of drug activity. In the first case it can replace a lacking apparatus and in the second case it can show the effect of drugs that could not otherwise be recorded. By autobioassay on isolated organs an analysis of exogeneously added drugs is meant with a simultaneous stimulation of pertaining motor nerves. By applying autobioassay with isolated tissues vivisection can be avoided, especially the one done by repetition, to satisfy certain standards. The described IIO can be used in analyses of neurotransmission and cotransmission. Autobioassay can be used in the quality control of drug effects.

LITERATURA

Bartfai, T., Iverfeldt, K. and Fisone, G.: *Regulation of the Release of Coexisting Neurotransmitters,* Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol, 28, 1988, 285—310.

Burnstock, G.: *Co-Transmission,* The Fifth Heymans Memorial Lecture s. 138—164, Heymans Fondation, Ghent, Belgium, 1990.

Campbell, G.: *Cotransmission,* Ann. rev. pharmacol. toxicol. 27, 1987, 51—70.

Furness, J. B., Morris, J. L., Gibbins, I. L. and Costa, M.: *Chemical Codings of Neuron and Neurochemical Transmission,* Ann. rev. pharmacol. toxicol. 29, 1989, 289—306.

Hokfelt, T., Fuxe, K. and Pernow, B.: *Coexistence of Neronal Messengers: A New Priciple in Chemical Transmission.* Progress in Brain Research. vol. 68, Elsevier, Amsterdam, 1986.

Holzer, P.: *Moeglichkeiten und Graenzen der Methodikisolierte Organe.* Abfalle fuer die Forschung. Organe aus dem Schlachthof. U Lembeck, F. Alternativen zum Tierversuch, 1988, s. 81—87.

Huković, S.: *Prednosti biološkog metoda istraživanja u farmakologiji,* ANUBiH, Posebna izdanja, 51, 1980, 7—11.

Huković, S.: *Izolirani i inervirani organi kao poseban metod u framakologiji,* ANUBiH, Posebna izdanja, 51, 1980, 11—31.

Huković, S. i Potkonjak, D.: *Kvalitet u istraživanju lijekova,* ANUBiH, Radovi, 1991.

Kupfermann, I.: *Functional Studies of Cotransmission,* Physiol. Rev. 1990.

Lembeck, F.: *Alternativen zum Tierversuch,* Thieme, 1988.

Rand, M. J. and Mitchelson, F.: *The Guts of the Matter: Contribution of Studies on Smooth Muscle to Discoveries in Pharmacology,* Discoveries in Pharmacology, 3, 1986, 19—61.

KVANTITATIVNO ODREĐIVANJE TANINA U BILJKAMA SA PODRUČJA BOSNE I HERCEGOVINE

JELA GRUJIĆ-VASIĆ, TAMARA BOSNIĆ, SALKO RAMIĆ, SEJFUDIN TOKIĆ, SULEJMAN REDŽIĆ

Akademija nauka i umjetnosti Bosne i Hercegovine, Sarajevo
Farmaceutski fakultet, Sarajevo

UDC 615.32

Apstrakt. Kvalitet ljekovite biljke koja kao aktivnu komponentu sadrži tanin zavisi od sadržaja tanina.

Određivanje sadržaja tanina vrši se raznim metodama i mnoge od njih navedene su u farmakopejama. U ovom radu je ispitan niz biljnih materijala na sadržaj tanina i to: Uvae ursi folium, Primulae folium, Fragariae folium, Juglandis folium, Chamaenerion angustifolii folium, Rosmarini folium, Rubi idaei folium, Centaurii herba, Hyperici herba, Sambuci flos, Rosae caninae fructus, Fraxini exelsioris cortex, Fraxini orni cortex, Fraxini oxycarpae cortex. Quercus cortex, Tormentilae rhizoma. Sadržaj tanina određivan je različitim metodama: metodom po Ph. Jug. II, Ph. Jug. III, Ph. Jug. IV, metodom sa kazeinom, metodom taloženja sa brucinom kao i metodom određivanja relativne adstringencije (RA). Dobiveni rezultati ukazuju da vrijednost sadržaja tanina zavisi od metode, pa je zato neophodno, uz vrijednosti date za sadržaj tanina, navesti i metodu koja je korištena. I pored brojnih ispitivanja sadržaja tanina u biljnom materijalu koje su ovi autori provodili na biljnim uzorcima, teško je reći koja metoda ima prednost jer se uvijek mora imati na umu da uz tanine u biljnom materijalu dolaze i druge fenolne i nefenolne supstance koje manje ili više mogu uticati na vrijednosti za sadržaj tanina.

Rezultati dobiveni u ovom radu doprinose boljem poznavanju analitike tanina kao i boljem poznavanju biljnog materijala koji kao farmakološki aktivnu komponentu sadrži tanine.

Ključne riječi: tanini, relativna adstringencija, kazein tanin, određivanje tanina, polifenoli, analitika tanina.

UVOD

Tanini su bezazotni biljni produkti molekulske mase 500—3000. Po hemijskom sastavu to su polifenolna jedinjena koja se dobivaju isključivo iz biljnog materijala i kao izolirani produkti predstavljaju čvrstu amorfnu masu. Za dobivanje čvrstog produkta često je potrebno koristiti i proces liofilizacije. Oni imaju opor, adstringirajući okus

Jedan dio ovog rada finansirao je Republički javni fond za nauku.

koji je karakterističan za nedozrelo voće. Tanini se rastvaraju u vodi i drugim rastvaračima i daju niz karakterističnih reakcija sa solima metala (1, 2), pa se te reakcije koriste za dokazivanje vrste tanina, a i za njihovo određivanje. Tanini daju reakciju taloženja bjelančevina, koja je za njih karakteristična i na čemu se zasniva velika primjena tanina kao sredstava za štavljenje kože.

Reakcija taloženja bjelančevina taninima je vrlo kompleksan proces i još do danas nije dovoljno objašnjena (1, 2, 3). Izučavanja ukazuju da više faktora utiče na tok ove reakcije, posebno osobine tanina, npr. veličina molekule, konformacijska pokretljivost, fleksibilnost polifenola, topivost polifenola u vodi i dr. Izražen afinitet prema taninima imaju proteini velike molekulske mase, kao i proteini koji imaju visok sadržaj prolina i drugih hidrofobnih aminokiselina sa slobodnom i otvorenom konfiguracijom (4). Na reakciju tanina i bjelančevina utiče i koncentracija tanina. Treba napomenuti da fenolna jedinjenja male molekulske mase, kao npr. pirogalol također reaguju sa bjelančevinama, pa ukoliko se nalaze u biljnom materijalu, mogu uticati na rezultate koji se dobivaju pri određivanju tanina.

Za određivanje tanina u biljnom materijalu poznato je više metoda pri kojima se koristi reakcija taloženja tanina sa bjelančevinama.

U Ph Jug IV oficinalna je za određivanje tanina metoda sa kožnim prahom, koja se bazira na taloženju bjelančevina taninom (5). Zadnjih godina koristi se metoda koja se bazira na reakciji taloženja hemoglobina (6,7), a dobiveni rezultati predstavljaju relativnu adstringenciju ispitivanog tanina (RA).

Na reakciji taloženja bjelančevina taninom zasniva se i reakcija određivanja tanina kazeinom (8). Pri ovoj analizi dobivaju se podaci o sadržaju kazeintanina i polifenola. Na reakciji taloženja alkaloida taninima zasniva se reakcija određivanja tanina brucinom (9).

U cilju boljeg poznavanja analitike tanina i kvaliteta taninskih droga, kao i boljeg poznavanja biljnih materijala u ovom radu ispitan je sadržaj tanina kod šesnaest odabranih biljnih uzoraka. Pri određivanju sadržaja tanina korištene su razne metode.

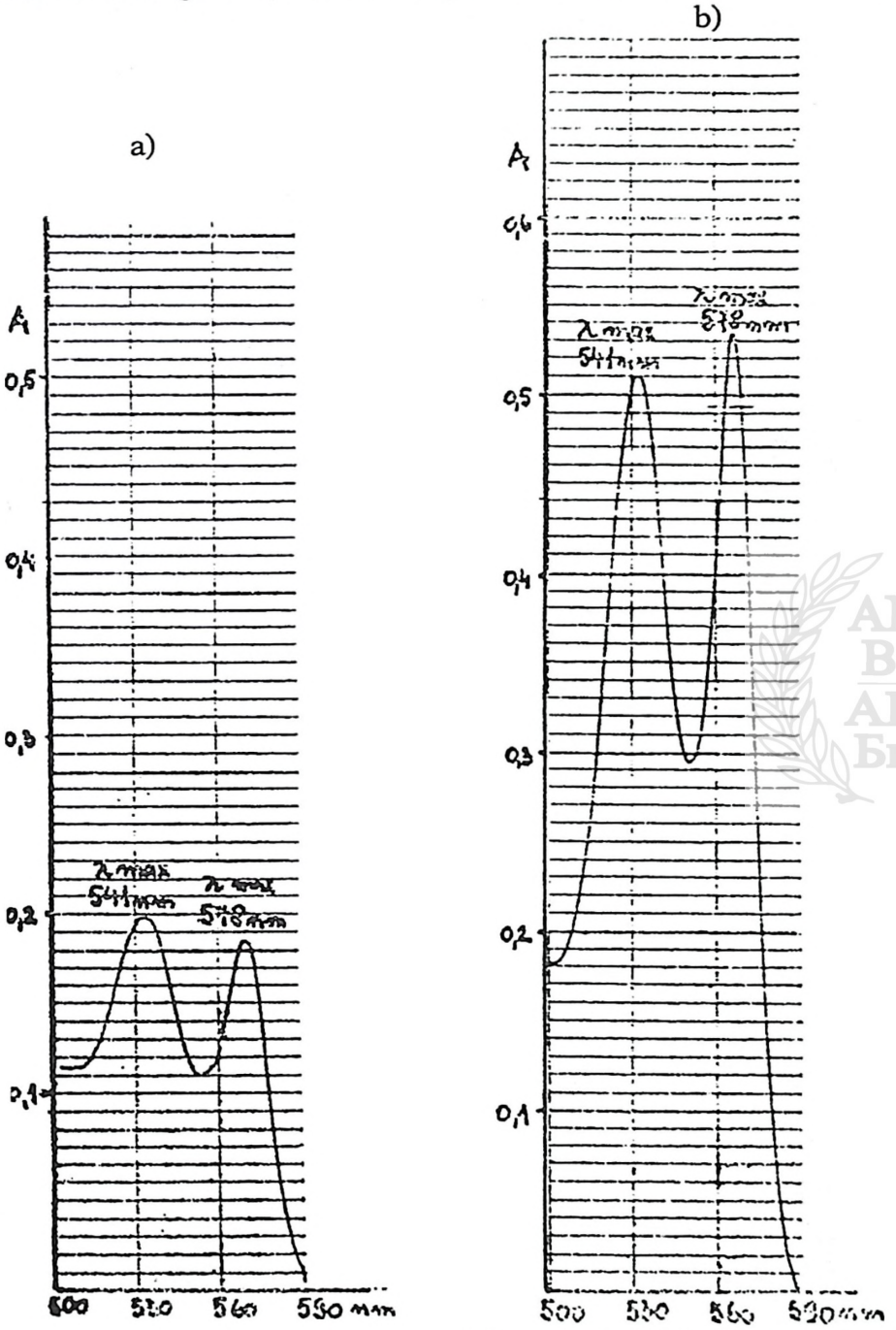
MATERIJAL I METODE

Biljni materijal

Ispitivan je ovaj biljni materijal:

1. Arctostaphylos uva ursi (L.) Sprengel, Ericaceae; 2. Primula veris Huds, Primulaceae; 3. Fragaria vesca L., Rosaceae; 4. Juglans regia L., Juglandaceae; 5. Chamaenerion angustifolium Scop., Oenotheraceae; 6. Rosmarinus officinalis L. Labiatae; 7. Rubus idaeus L., Labiatae; 8. Centarium umbellatum Grilib., Gentianaceae; 9. Hypericum perforatum L., Hypericaceae; 10. Sambucus nigra L., Oleaceae; 13. Fraxinus ornus L. Oleaceae; 14. Fraxinus oxycarpa Wild. var. pannonica, Oleaceae; 15. Potentilla tormentilla L., Rosaceae; 16. Quercus robur L., Fagaceae.

Ispitani dijelovi biljke navedeni u tabeli 1 ubirani su na području Bosne i Hercegovine, osušeni i polvarizirani u mlinu za droge



Slika 1. a) Apsorpcioni spektar hemoglobina nakon reakcije sa ekstraktom droge Juglans regia (folium)
b) Apsorpcioni spektar hemoglobina u hemoliziranoj krvi (1 ml vode i 1 ml hemolizirane krvi)

ANU BiH АНУ БиХ

(kora i podanak). Nadzemni dijelovi biljke (cvijet, list i herba) su ručno usitnjeni.

Metode

Korištene su hemikalije stepena čistoće p.a.

Spektrofotometrijska određivanja vršena su na spektrofotometru Perkin Elmer 123 (Double beam spectrophotometer). Korištena je prokuhana destilovana voda ohlađena do sobne temperature.

Većina biljnog materijala ispitana je metodama koje propisuje Ph. Jug. II i Ph. Jug. III (10, 11).

Određivanje tanina sa brucinom vršeno je po proceduri datoj u literaturi (9).

Određivanje tanina sa kazeinom vršeno je metodom za određivanje sveukupnih polifenola i kazeintanina prema ranije korištenoj proceduri (7,8).

Ispitivanje relativne adstringencije RA (6) vršeno je po navedenoj proceduri:

a. ekstrakt droge: 1 g droge prelije se sa 15 ml vrućeg 50%-tnog metanola i pažljivo zagrijava 5—10 minuta. Ekstrakt se odlije a zaostala droga ponovo prelije sa 10 ml vrućeg 50%-tnog metanola i ponovo zagrijava. Sjedinjeni ekstrakti se procijede kroz pamuk i upare na rotavaporu do suha. Suhi ostatak se rastvori u 5 ml vode. Ovako pripremljeni ekstrakt služi za ispitivanje adstringencije;

b. hemolizirana krv: 0,1 ml krvi iz prsta pomiješa se sa 5 ml vode;

c. određivanje adstringencije: 1 ml hemolizirane krvi pomiješa se sa 0,1 ml ekstrakta droge i odmah brzo promućka a zatim centrifugira na 4000 obrtaja/minut kroz 15 minuta (ili 2000 obrtaja/minut, 30 minuta). U supernatantu se određuje spektrofotometrijski sadržaj neistaloženog hemoglobina.

Hemoglobin ima dva pika na 578 i 541 nm. Prvi pik (578 nm) koristi se pri očitavanju o odnosu na kontrolni uzorak (1 ml hemolizirane krvi i 1 ml vode). Na slici 1 dat je UV spektar hemoglobina i taninske droge (Juglandis folium).

DISKUSIJA I REZULTATI

Na kvalitet taninskih droga, pored vrste tanina, utiče i sadržaj. U farmakopejama se najčešće navode slijedeće taninske droge: Galla, Hamamelidis folium, Juglandis folium, Myrtilli fructus, Quercus cortex, Ratanhiae radix i Tormentillae rhizoma. Pored ovih, brojne ljekovite biljke koje se koriste u narodnoj medicini (ili ulaze u sastav različitih biljnih preparata fitofarmaka) sadrže tanine. Ne može se zanemariti ni upotreba ovih biljnih vrsta u kozmetici. Tanini su molekule sa više fenolnih grupa a njihova najstarija definicija koja se i danas koristi

je da su to jedinjenja biljnog porijekla koja štave kožu (1). Ovaj proces je posljedica reakcije tanina i bjelančevina, koja predstavlja jednu od karakterističnih reakcija tanina.

Pored ove reakcije, karakteristične reakcije tanina su sa solima metala, pri čemu se javljaju boja i talog, a značajna je i reakcija tanina sa alkaloidima, pri čemu također nastaje talog.

Upotreba tanina i taninskih droga zasniva se na njihovom adstringentnom i antimikrobnom djelovanju (1, 2). Oni se koriste kao antidijaroika, djeluju kao antidoti, koriste se kod stomatitisa. Novija istraživanja ukazuju da imaju antiherpetičnu i citotoksičnu aktivnost što se također tumači njihovim reakcijama sa proteinima (12). Određivanje tanina vrši se raznim metodama, a najčešće pominjane metode za određivanje su: volumetrijske (14), spektrofotometrijske (6), gravimetrijske (9), kolorimetrijske (7), metoda određivanja sa kožnim prahom (5), metoda sa kazeinom (8), određivanje sa brucinom (9), određivanje adstringencije (6) i druge.

Tabela 1. SADRŽAJ TANINA*

Red. br.	Biljni materijal	Dio biljke	Ph. Jug. II	Ph. Jug. III	Ph. Jug. IV	Metoda sa kazeinom* I	Metoda sa kazeinom* II	Metoda sa brucinom
1.	Arctostaphylos uva ursi	list	11,4	23,1	12,9			
2.	Primula veris	list	2,8	1,5		1,3	0,5	
3.	Fragaria vesca	list		8,8	8,9	10,1	8,1	8,45
		podanak		10,5	10,5	13,2	8,4	
4.	Juglans regia	list	6,5	5,1	5,2	9,6	5,1	
5.	Chamaenerion angustifolium	list		12,1	13,4	14,6	12,6	11,8
6.	Rosmarinus officinalis	list	3,5	3,4		6,3	6,0	
7.	Rubus ideus	list	4,6	3,0		3,4	2,3	
8.	Centaurium umbellatum	herba	2,7	1,3		1,9	0,5	
9.	Hypericum perforatum	herba	13,5	12,3		11,5	10,1	
10.	Sambucus nigra	cvijet	2,0	1,4		2,3	1,0	
11.	Rosa canina	plod		3,21		6,22	2,7	2,8
12.	Fraxinus excelsior	kora	3,7	1,2			0,2	
13.	Fraxinus oxycarpa var. pannonica	kora	3,2	1,2			0,3	
		kora	3,7	1,2			0,3	
15.	Quercus robur	kora		13,5		15,6		
16.	Potentilla tormentilla	podanak		10,6	9,3	12,6	9,0	

* Vrijednosti su date u % računato na suvi biljni materijal
I ukupni polifenoli; II kazeintanini

ANU BiH АНУ БиХ

U ovom radu određivanje tanina vršeno je metodama navedenim u eksperimentalnom dijelu. Dobiveni rezultati dati su u tabelama 1 i 2.

Tabela 2. RELATIVNA ADSTRINGENCIJA (RA)

Red. br.	Biljni materijal	Dio biljke	RA
1.	Fragaria vesca	list	0,95
		podanak	0,67
2.	Juglans regia	list	0,41
3.	Chamaenerion angustifolium	list	0,028
4.	Hypericum perforatum	herba	0,98
5.	Quercus robur	kora	0,51
6.	Rosa canina	plod	0,56

Kao što se iz datih podataka vidi, različite metode daju i različite vrijednosti za sadržaj tanina, pa je potrebno, uz podatke o sadržaju tanina, uvijek navesti i metodu, što u literaturi nije uvijek slučaj.

Važno je napomenuti da je među ispitivanim materijalima bogat sadržajem tanina list kiprovine. O ovom biljnom materijalu u našoj literaturi su vrlo oskudni podaci, posebno kada se misli na sadržaj tanina. Chamaenerion angustifolium se od davnina koristi kao zamjena za ruski čaj, koji se za doba carske Rusije dobivao industrijski kao »koporski čaj« u Koporu u okolini Petrograda (2). Bogat sadržajem tanina je i podanak šumske jagode (Fragaria vesca), međutim najbogatija sadržajem tanina u nizu ispitivanih biljnih materijala je kora hrasta (Quercus cortex), jedna od vrlo često pominjanih službenih taninskih droga.

Podanak petoprste (Potentilla tormentilla) je oficinalna taninska droga i iz svih priloženih rezultata vidi se da je bogata sadržajem tanina.

Vrijednost za relativnu adstringenciju date su u tabeli 2. One nisu u potpunoj korelaciji sa vrijednostima sadržaja tanina, što se posebno odnosi na Hypericum perforatum, koja ima vrijednosti za jačinu adstringencije (RA) blizu Fragariae folium, koja je znatno siromašnija taninom. Ovo upućuje da na biološku aktivnost tanina — adstrigenciju utiču i drugi faktori, a na samo sadržaj tanina u drogi.

Navedene vrijednosti sadržaja tanina u ispitivanim drogama doprinose boljem poznavanju njihovog kvaliteta, posebno ljekovitog bilja ubiranog na području Bosne i Hercegovine (13).

QUANTITATIVE DETERMINATION OF TANNINS IN PLANTS OF BOSNIA AND HERZEGOVINA

Summary

The quality of medicinal herbs containing tannin as an active component depends on the kind and content of tannin.

Tannin is determined by using various methods which are usually mentioned in pharmacopeias. In our paper we examined the content of tannin in plant material using the following methods: a method according to Ph. Yug. II, Ph. Yug III, Ph. Yug IV, a method with casein, a method of precipitation with brucine, and a method of relative astringency (RA) determination (tbl. 1 and 2).

Our results showed that the obtained values of the content of tannin depended on the method which was used. Therefore, it is necessary to specify the method with the obtained value for the content of tannin.

In spite of numerous examinations of the content of tannin in the plant material which were performed by the authors, it was difficult to determine the best method since, beside tannin, there were other phenolic and also non-phenolic substances in the plant material more or less influencing the content of tannin.

The results obtained in this paper contribute to a better knowledge of the analytics and quality of tannin and the plant material which contains tannin as an active component.

LITERATURA

(1) Wagner, H.: *Pharmazeutische Biologie Drogen und ihre Inhaltsstoffe,* Stuttgart, New York: Gustav Fischer Verlag 3, Auflage 1985.

(2) Gammerman, F., Kadajev, N., Jacenko, H. et al.: *Lekarstvenije rastjenija,* Moskva: Vissaja škola 1983.

(3) Spencer, C., Russel, M., Gafner, H. et al.: *Polyphenol Complexation Some Thoughts and Observations.* Phytochemistry 1988; 27 : 2397—409.

(4) Asquita, T., Butler, L.: *Interaction of Condensed Tannins with Selected Proteins.* Phytochemistry 1986; 25 : 1591—93.

(5) *Farmakopeja SFRJ (Ph. Jug. IV),* Beograd: Savezni zavod za zdravstvenu zaštitu, 1984.

(6) Bate-Smith C.: *Haemanalysis of Tannins: the Concept of Relative Astringency,* Phytochemistry 1973; 12 : 907—12.

(7) Grujić-Vasić, J., Bosnić, T., Jovanović, M.: *Ispitivanje tanina i fenolkarboksilnih kiselina u Hyperici herba i Quercus cortex.* Lek. sir., 1988; 7 : 63—67.

(8) Schneider, G.: *Zur Bestimmung der Gerbstoffe mit Caseine Arch.* Pharm. 1976; 309 : 38—45.

(9) Petričić, J., Poljak-Barišić, N.: *Određivanje tanina taloženjem alkaloidima.* Farmaceutski glasnik, 1961; II : 367—76.

(10) *Farmakopeja FNRJ (Ph. Jug. II),* Beograd: Medicinska knjiga, 1951.

(11) *Farmakopeja SFRJ (Ph. Jug. III),* Beograd: Savezni zavod za zdravstvenu zaštitu, 1972.

(12) Takechi, M., Tanaka, Y., Takahera, M. et al.: *Structure ana Antiherpetic Activity Among the Tannins.* Phytochemistry 1985; 24 : 2245—50.

(13) Redžić, S., Lakušić, R., Grujić-Vasić, J., Tokić, S., Kalinić, D.: *Lekovite biljke u ekosistemima Igmana i Bjelašnice.* Lek. sir., 1989; 8 : 5—15.

(14) Broadhurst, B., Jones, W.: *Analysis of Condensed Tannins Using Acidified Vanillin.* J. Sci. Fd. Agric., 1978; 29 : 788—94.

ANU
BiH
АНУ
БиХ

SPECIFIČNE OSOBINE LEKOVA DOBIVENE REKOMBINANTNOM DNA TEHNOLOGIJOM

ANTON ŠTALC
LEK, Razvoj in raziskave, Ljubljana

UDC 615.01

Apstrakt. Razvoj rekombinantne i hibridne tehnologije uslovljava razvoj lekova i bioloških produkata koje do sada nismo mogli proizvoditi. Pomoću ovih lekova mogu se lečiti bolesti za koje do sada nismo imali odgovarajućih lekova, a neki od njih predstavljaju dopunu. Od 1985. do 1989. godine uvedeni su sledeći lekovi: ljudski insulin, hormon rasta, interferon alfa 2a i 2b, interleukin 2, alteplase, monoklonska protitela CD 3, eritropoetin i hepatitis B vakcina. Oko 90 produkata je u fazi pretkliničkih ili kliničkih ispitivanja.

Za poboljšanje lečenja razvijaju se specifični galenski oblici, koji produžavaju vreme delovanja i poboljšavaju terapiju a istovremeno smanjuju nuspojave. Za uspešno lečenje u mnogim slučajevima se predlažu selektivniji načini primene umesto intravenske aplikacije. Zbog visoke cene ovih lekova, nailazimo na etičke dileme: pod kojim uslovima i za koje bolesnike obezbediti lek. Kod ovakvih dilema može se poslužiti poznatim kriterijumima za upotrebu.

Ključne reči: rekombinantna DNA tehnologija, peptidni lekovi, novi galenski oblici.

UVOD

Razvoj rekombinantne i hibridne tehnologije uslovljava razvoj lekova i bioloških produkata koje do sada nismo mogli proizvoditi. Pomoću tih lekova čak može da dođe do pomaka ravnoteže od »anti« terapije, koja je osobito tipična za 20. vek (antiinfekcijska, antitumorska terapija itd.), ka »pro« terapiji, tj. ka poboljšavanju funkcije tela i njegove veće otpornosti.

Food and Drug Administration do kraja 1988. godine registrovala je ljudski insulin (Humulin), hormon rasta (somatrem — Protropin i somatropin — Humatrope), interferon (IFN) alfa 2a (Roferon 1A), IFN alfta 2b (Intron A), monoklonska protitela CD3 (Orthoclone OKT3), hepatitis B vakcinu (Recombivax HB) i tkivni plazminogeni aktivator (alteplase — Activase) (1).

U Japanu su od 1985. do 1988. godine registrovali rekombinantni ljudski insulin, hormon rasta, IFN alfa 2a i 2b, IFN gama i hepatitis vakcinu (2).

Osim pomenutih derivata, u Evropi su u terapiju uvedeni takođe produkti eritropoetina (Eprex, Erypo) i interleukin (IL) 2 (Proleukin).

Ocenjuje se da je danas ukupno oko 90 produkata u fazi predkliničkih ili kliničkihi ispitivanja. Svi ti produkti su potencijalni lekovi. Peptidi dobijeni rekombinantnom tehnologijom ili niže molekularni peptidi koji se mogu proizvoditi klasičnom sintezom ili izolacijom iz prirodnih materijala donose specifičnosti koje traže posebna rešenja na različitim nivoima, a istovremeno donose nove značajne mogućnosti u lečenju. Od brojnih pitanja i specifičnosti u toj publikaciji obrađena su ona koja bi mogla biti od velikog značaja za terapiju.

PRODUKCIJA ANALOGA

Zbog peptidnog karaktera eliminaciono vreme t 1/2 svih tih supstancija veoma je kratko. Za tumor nekrosis faktor (TNF) on iznosi oko 0,5 h (3), međutim za mnogobrojne supstancije još je kraći. S druge strane, mnoge supstancije pokazuju veoma širok spektar aktivnosti. Za IL 1 kao primer poznato je da utiče na različite ćelije regulišući proliferaciju, maturaciju i funkciju aktivnosti (4). Osim citotoksičnih osobina i mnogih drugih efekata, TNF također pokazuje plejotropične učinke na više ćelija koje su aktivne u inflamaciji, hematopoezi i imunosti (5).

Sa ciljem da se od prirodnih peptida dobiju supstancije koje bi duže vreme bile aktive i imale selektivnije delovanje pripremaju se različiti analozi. Pristupi su veoma različiti; broj karakterističnih primera će ipak moći da približi strategiju tog razvoja:

1. Promena pojedinih aminokiselina u molekuli peptida:

— zamena jedne aminokiseline s ekvifunkcionalnom aminokiselinom: kao primer navodim IFN alfa 2a i 2b, koji se međusobno razlikuju po aminokiselini na mestu 23 (6);
— zamena kisele aminokiseline s baznom ili obrnuto, kao što je primer TNF (Asn), kod kojeg je Arg zamenjen s Asn (7);
— zamena Cys aminokiselinom koja ne može tvoriti S-S veze, npr. promena Cys 69 kod TNF sa Ser (7);
— uvođenje aminokiseline koja se može glikozilirati, npr. uvođenje Thr mesto Arg na mestu 32: TNF (Asn) (7);
— promena aminokiselina na području koje je specifično za vezivanje ili specifične osobine molekula kao što je primer hidrofobni dio molekule.

2. Skraćenje ili produženje lanca:

Kao primer za skraćenje navodimo analoge TNF, kod kojih se bez značajne promene u aktivnosti može otcepiti do 10 aminokiselina na N-kraju molekule, npr. TNF6 (7), dalje desAlaSer 125-IL 2, koji je po delovanju identičan IL 2 (8) i analog IL 3 (7 — 140), koji je skraćen za šest aminokiselina, a po delovanju je identičan IL 3 (9).

Kao primer za produženje lanca navodimo TNF 14 kod kojeg je molekula produžena na C-kraju za 8 aminokiselina, a promena prouzrokuje razliku u hidrofobnosti (10).

3. U mnogim primerima utvrđeno je da je za biološku aktivnost dovoljan samo jedan fragmenat biomakromolekule. Kod timopoetina, koji je polipeptidni hormon timusa i sastoji se od 49 aminokiselina, Goldstein i suradnici (11) pronašli su da je pentapeptid timopentin s područja aminokiselina od 32 do 36 nosilac biološke aktivnosti. Kod gama-globulina poznati su ovakvi fragmenti sa četiri aminokiseline, kao što su tuftsin i rigin (12). Naravno, u takvim primerima se peptidi sintetišu po klasičnom postupku, a ne proizvode biotehnologijom.

4. Značajna modifikacija biomakromolekula je glikozilacija. U tom primeru se sastav aminokiselina ne menja ili se uvodi aminokiselina kao što je Thr, koji omogućava glikozilaciju. Takvi derivati su IL 2-(Thr) i IFN beta Yeda.

5. S aspekta korišćenja peptida u terapiji, značajna su i istraživanja produkcije peptidomimetika. Kao primer navodimo analoge holecistohinina (CCK). U tim slučajevima pokušava se sintetizovati stabilnije supstance pomoću promena pojedinih aminokiselina u lancu peptida, promenom peptidne CONH veze sa nepeptidnom, kao što su: $CONH_2$, CH_2NH, CH_2CH_2, CH=CH, $CHOHCH_2$ ili retroinverzna NHCO (promena redosleda); poznati su i brojni primeri ciklizacije spojeva (13). U tim primerima supstancije se sintetišu klasičnim putem.

Pomenute promene u strukturi peptida ne znače uvek poboljšanje aktivnosti. Kao primer navodimo analoge TNF; specifična aktivnost TNF s primarnom strukturom je 3,2 uU/mg, kod analoga N6 (skraćen za 6 aminokiselina na N-kraju molekule) povećava se na 4,8, međutim kod TNF(Asn) i TNF(Ser) smanjuje se na 0,053 ili 2,0. Osim aktivnosti, menja se i osetljivost pojedinih ćelija na različite analoge TNF. Tako je npr. moguće očekivati da se dobije analog TNF koji bi sačuvao aktivnosti »nekrotizirajućeg faktora« bez kahektinske aktivnosti, koju uslovljava primarna struktura TNF (7).

NAČINI APLIKACIJE

Za uspešno lečenje u mnogim slučajevima je veoma značajan način aplikacije. Zato se umesto i.v. aplikacije, koja nepoželjno razređuje lek, a povećava njegovu toksičnost, predlažu selektivniji načini primene:

— intraarterijski putem hepatičke, hipogastričke, femoralne, lingvalne ili karotidne arterije;
— intratekalno i intraventrikularno;
— intraperitonealno, intrapleuralno i intraartikularno, intra- ili peritumoralno;
— topikalno u rektum ili cerviks, nazalno ili preko oralne sluzokože; kao i
— intrabronhijalno ili bronhoalveolarno (14).

Kao primer od čijeg je značaja odgovarajući način aplikacije navodimo rezultate dobijene TNF. Posle i.v. infuzije TNF koja se daje bolesnicima, dobije se potpuni ili delomični odgovor samo u dva slučaja od ukupno 22, međutim kod intratumoralne, intrapleuralne ili intraperitonealne primene povoljan efekat dobije se u 14 od ukupno 30 bolesnika (15). Uticaj aplikacije još je izrazitiji kod kombinovane terapije IL 2 s klasičnom hemioterapijom. Posle i.v. aplikacije IL 2, preživljavanje se povećava od 10% na 22%, međutim kod intrasplenične aplikacije IL 2 povećava se čak do 60% (16).

U mnogim slučajevima potrebno je obezbediti kontinuiranu aplikaciju izuzetno malih doza, na primer kod rekombinatnog humanog granulocita kolonija stimulirajućeg faktora (rhG-CSF), gde je za puni efekat potrebno obezbediti pikomolarne količine supstancije. U takvim slučajevima upotrebljavaju se osmotske pumpe. Osmotske pumpe se inače danas proučavaju kod primene mnogobrojnih peptida: antihipertenzivnih, imunopeptida, hormona, faktora rasta, neuropeptida itd. (17).

Specifični načini aplikacije mogu također smanjiti značajne nuspojave, koje mogu ograničavati primenu; kao primer navodimo intratumoralnu aplikaciju IL 2. Naravno, intratumoralna aplikacija moguća je samo u izuzetnim slučajevima (18).

POBOLJŠANJE LEČENJA POMOĆU SPECIFIČNIH GALENSKIH OBLIKA

Optimalni terapijski indeks (efekat/toksičnost) kod proteina i peptida dobili smo ukoliko bismo uspeli izazvati biološki odgovor na adekvatnim mestima, a izbeći delovanje na drugim sistemima. Naravno, potrebno je i obezbediti odgovarajuću dužinu delovanja. To uslovljava razvoj galenskih oblika u kojima su aktivne supstancije vezane na specifične materije ili ugrađene u liposome, mikropartikle s biodegradibilnom materijom itd. U nizu konkretnih primera osvetlićemo različite mogućnosti i rešenja.

Kod IFN alfa pripremljene su npr. minipelete s kolagenom. Kolagen je protein veziva, koji je biokompatibilan i biodegradibilan, pa se zato može koristiti za supkutanu aplikaciju. Time se postiže niža Cmax i za nekoliko puta produžava vreme delovanja. Iz matriksa kolagena s vremenom se otpušta INF alfa i tako u toku dužeg vremena održava konstantni nivo u serumu, što omogućava odgovarajuće delovanje. Ovakav oblik može se aplikovati i na mesto gde je bio eliminisan tumor. Ovakav oblik takođe bitno smanjuje broj nuspojava (19).

Na polimere kao što su PEG (metoksipolietilen glikol) i POG (polioksietilisani glicerol) biomakromolekule veže se kovalentnom vezom. Time se dobije npr. PEG-rIL 2, koji se lakše rastvara od samog rIL 2 i ima za nekoliko puta produženo t1/2. Ovakvim kompleksom poboljšava se i terapijski indeks koji je kod ekvitoksične doze oko pet puta bolji od samog rIL 2 primenjenog intravenski. Eksperimenti

pokazuju da je kod doze 12,5 mg/kg izlečenje tumora na modelima 20%, kod rIL 2, a 80%, kod PEG-rIL 2; poboljšanje delovanja uslovljavaju promene u farmakokinetici (20).

Za terapiju nisko molekularnim peptidima postaju značajni i nazalni i dermalni preparati, međutim za visoko molekularne peptide, koji su i produkti rekombinantne tehnologije, značajni su samo nazalni preparati (21, 22). Za poboljšanje resorpcije upotrebljavaju se supstancije koje mogu poboljšati penetraciju (oleinska kiselina, žučne soli, fusidati itd.) na različite načine (22). Proučavanje transporta humanog metionil hormona rasta (m.m. 22 000) s Laureth S, koji verovatno poboljšava prelaz zbog uticaja na lipide u membrani, pokazala su da se prelaz kroz sluzokožu poboljšava od 10% na 60% (23). Druga mogućnost koja bitno povećava bioupotrebljivost visoko molekularnih peptida, npr. insulina, kroz nazalnu membranu je upotreba bioadhezivnih mikrosfera; lek je rasprostranjen po površini nosioca koji se sastoji od skroba i albumina (22).

U traženju selektivnog delovanja lekova danas se razvijaju mnogobrojni oblici lekova koji bi omogućili transport aktivne supstancije na određeno mesto u organizmu (24). Među brojnim mogućnostima liposomi su već onaj oblik koji se koristi za proučavanje rekombinantnih proteina. Liposomi su mehurići koji se sastoje od jednog ili više dvosloja lipida. Prema sastavu dele se na više tipova. Koji tip i kakav sastav liposoma koristimo, zavisi od osobina aktivne supstancije i cilja primene (25).

Kao primer navodimo pokuse sa TNF kod infekcija s Mycobacterium avium. Proučavan je efekat slobodnog TNF i TNF ugrađenog u liposome. U tom slučaju liposomi donose aktivnu supstanciju u makrofage jetre i slezine; zato se postavlja pitanje da li TNF može aktivisati makrofage da unište intracelularne patogene. Rezultati su pokazali da TNF ugrađen u liposome brže i snažnije smanjuje broj kolonija mikrobakterija u makrofagima kao slobodni TNF, samo da s vremenom ta razlika iščezava. Uprkos tome, činjenica da TNF u liposomima zadržava imunomodulatorske osobine, otvara mogućnosti primene ovakvog preparata u lečenju (26).

Ohrabrujući su i pokusi sa rINF gama ugrađenim u liposome. Kod infekcije s Leishmania donovani rINF gama u liposomima pokazuje oko četiri puta veće efekte u uništavanju parazita od slobodnog rIFN gama (27), međutim inkorporiran u liposome zajedno sa muramil dipeptidom pokazuje sinergističko delovanje kod aktivacije citotoksičnog delovanja makrofaga (28).

NOVE MOGUĆNOSTI LEČENJA

Pomoću ovih lekova mogu se lečiti bolesti za koje do sada nismo imali odgovarajućih lekova, a neki od njih predstavljaju dopunu kod do sada insuficijentnog lečenja različitih bolesti. Možemo reći da su lekovi dobijeni rekombinantnom tehnologijom velikog etičnog značaja. Osim lekova s usko definisanim područjem delovanja,

kao što su eritropoetin, insulin, hormon rasta, hepatitis vakcina, alteplase i drugi, poznajemo supstancije i već gotove lekove koji se mogu upotrebljavati u lečenju različitih bolesti: interferoni, monoklonska protitela, IL 2, različiti faktori koji stimulišu kolonije i TNF. Prema sadašnjem saznanju, možemo najaviti izuzetno veliki značaj tih lekova na području lečenja raka (29), kao i imunoloških i infektivnih oboljenja (30, 31).

Veoma značajna osobina rekombinatnih lekova, koja može bitno uticati na njihovu upotrebu, je visoka cena. Drugim rečima, kod primene ovih lekova nailazimo na etičke dileme: pod kojim uslovima i za koje bolesnike je potrebno obezbediti lek. Kao primer navodimo rekombinantni humani eritropoetin koji se upotrebljava za lečenje anemije kod hroničnog bubrežnog oboljenja. Cena jednogodišnje terapije je 4000 do 6000 GBP. Zato u SAD National Kidney Foundation kao kriterijum za upotrebu predlaže hematokrit <0.3. Međutim u Velikoj Britaniji u analognoj preporuci predlaže se: koncentracija hemoglobina <70 g/l, stanja kada je život bolesnika ugrožen zbog anemije, kada anemija pogoršava anginu pektoris i u primerima kada bi transfuzija mogla postati opasna (32).

Peptidi dobijeni rekombinantnom DNA tehnologijom kao i peptidi — fragmenti biomakromolekula ili peptidomimetiki — dobijeni klasičnom sintezom znače unapređenje u lečenju mnogih bolesti. Razlike između njih i klasične terapije su obično, zbog selektivnijeg delovanja, veće nego što su one između dosadašnjih grupa lekova.

SPECIFIC PROPERTIES OF THE DRUGS PRODUCED BY DNA RECOMBINANT BIOTECHNOLOGY

Summary

Products produced by DNA recombinant biotechnology processes may be considered a new possibility in the field of therapy. In the period from 1985 to 1989 the following recombinant DNA drugs were approved: human insulin, human growth hormones, interferon alpha 2a and 2b, interleukin 2, alteplase, muromanab CD 3, erythropoietin and hepatitis B vaccine. Many new products are being developed. Since a number of peptides and proteins are rapidly destroyed in the body, new formulations and systems have been developed in order to increase the steady drug concentration in blood circulation or locally at the site of application, further, to increase the efficacy of drugs and to minimize the incidence and severity of adverse side effects. The proteins and peptides are unable to reach secluded organs or sites where the therapeutic effect is desirable, therefore more selective routes of administration than the venous one are beeing introduced. The cost of some biological drugs may result in their limited use, thus guidelines for a proper administration have been issued.

LITERATURA

(1) Esber, E. C.: *United States Perspectivies on the Evaluation of Therapeutic Biological Products.* V: Therapeutic Peptides and Proteins (Marshak, D. i Liu, D. eds.). Cold Spring Harbor Laboratory, New York 1989, pp. 201—206.

(2) Hayakawa, T.: *Current Regulaltory Situation in Japan with Respect to the Quality of Therapeutic Peptides and Proteins.* V: Therapeutic peptides and proteins (Marshak, D. i Liu, D. eds.). Cold Spring Harbor Laboratory, New York 1989, pp. 195—200.

(3) Taguchi, T.: *Phase I Study of Recombinat Human Tumor Necrosis Factor (rhTNF: PT-050).* Cancer Det Prev 12, 561—572, 1988.

(4) Van Brunt, J.: *Lymphokine Receptors as Therapeutics,* Biotechnology, 668—669, 1989.

(5) Wong, G. H. W. i Goeddel, D. V.: *Biological Activities and Production of TNF Alfa.* V: Monokine and other non-lymphocytic cytokines (MC Pawanda et al.). Alan R. Liss Inc., New York 1988, pp. 251—260.

(6) Reynolds, J. E. F.: *Interferons.* V: Martindale the Extra Pharmacopoja, 29. Edition. The Pharmaceutical Press, London 1989, pp. 696—699.

(7) Tsujimoto, M., Tanaka, S., Sakuragawa, Y. et al.: *Comparative Studies of the Biological Activities of Human Tumor Necrosis Factor and its Derivatives.* J. Biochem 101, 919—925, 1987.

(8) Doyle, M. V., DeGroat, S., Lowitz, R. et al.: *In Vivo Activation of Cytolitic Cell Activity During Recombinant IL 2—125 Clinical Trials in Cancer Patients.* V: Immune regulation by characterized polypeptides (Goldstein, G., Bach, J. F. i Wigzell, H. eds.), Alan R. Liss Inc., New York 1987, pp. 353—362.

(9) Clark-Lewis, I., Aebersold, R., Ziltener, H. et al.: *Structure-Function Studies of Interleukin 3 Using an Automated Peptide Synthesis Approach.* V: Immune regulation by characterized polypeptides (Goldstein, G., Bach, J. F. i Wiozell, H. eds.). Alan R. Liss Inc., New York, 1987, pp. 323—334.

(10) Sreekrishna, S., Potenz, R. H. B., Cruze, J. A. et al.: *High Level Expression of Heterologous Proteins in Methlotrophic Yeast Pichia Pastoris.* J Basic Microbiol 28, 265—278, 1988.

(11) Goldstein, G. M. P., Scheid, E. A., Boyse, M. P., Schlesinger, D. H. i Waurve, Van J.: *A Synthetic Bentapeptide with Biological Activity Characteristic of the Thymic Hormone Thymopoetin.* Science 204, 1309—1310, 1979.

(12) Chipens, G.: *New Biologically Active Fragments of Immunoglobulins.* Adv. Drug Delivery Rev 2, 167—206, 1988.

(13) Evans, B. E.: *Recent Development in Cholecystokinin Antagonist Research.* Drugs of the Future 14, 971—979, 1989.

(14) Bocci, V.: *Catabolism of Therapeutic Proteins and Peptides with implications for Drug Delivery.* Adv Drug Rev 4, 149—169, 1990.

(15) Taguchi, T. Kimoto, Y. i Tanji, Y.: *Clinical Studies of Recombinant human Tumor Mecrosis Factor.* V: Tumor Necrosis factor/Cachectin and Related Cytokines (B. Bonavida, G. E. Gifford, H. Kirchner, L. J. Old eds.). Karger, Basel 1988, pp. 196—204.

(16) Naito, K., Pellis, N. R. i Kahan, B. D.: *Effect of Continuous Administration of Inerleukin 2 on Active Specific Chemoimmunotherapy with Extracted Tumor-Specific Transplantation Antigen and Cyclophospamide.* Cancer Res 48, 101—108, 1988.

(17) Amkraut, A., Eckenhoff, J. B. i Nichols, K.: *Osmotic Delivary of Peptides and Macromolecules.* Adv Drug Rev 4, 255—276, 1990.

(18) Bubenik, J.: *Local Immunotherapy of Cancer with Interleukin 2.* Immunol Lett 21, 267—276, 1989.

(19) Takenaka, H., Fujioka, K. i Takada, Y.: *New Formulations of interferon.* V: Therapeutic peptides and protein (D. Marshak i D. Liu eds.). Cold Spring Harbor Laboratory, New York 1989, pp. 37—40.

(20) Katre, N. V., Young, S. D. i Zimmerman, R.: *Chemical Modification of Interleukin 2 with Polymers: a Potent Drug Delivery System.* V: Therapeutic Peptides and Proteins (D. Marshak i D. Liu eds.). Cold Spring Harbor Laboratory, New York 1989, pp. 173—177.

(21) Muranishi, S. i Takada, K.: *Biopharmaceutical Aspects on Enhanced Transmembrane Delivery of Peptides and Proteins.* V: Therapeutic peptides and proteins (D. Marshak i D. Liu eds.). Cold Spring Harbor Laboratory, New York 1989, pp 47—50.

(22) Illum, L.: *Nasal Delivery of peptide and Protein Drugs.* V: Therapeutic Peptides and Proteins (D. Marshak i D. Liu eds.). Cold Spring Harbor Laboratory, New York 1989, pp. 51—57.

(23) Daugherty, A. L., Liggitt, D., McCabe, J. C., Moor, J. A. i Paton, J. S.: *Absorption of Recombinant Methionyl-Human Growth Hormone (Meth-GH) From Rat Nesal Mucosa.* Int J Pharm 45, 197—202, 1988.

(24) Štalc, A.: *Razvoj novih oblik zdravil.* Proteus 50, 184—187, 1988.

(25) Štalc, A.: *Liposomi — nova potencialna oblika zdravil.* Farm vestnik 31, 197—202, 1980.

(26) Duezguenes, N., Perumal, V. K., Brunett, E. N., Gangadhuram, P. R. J. i Debs, R. J.: *Treatment of Mycobacterium Avium Complex Infections by free and Liposome-Encapsulated Tumor Necrosis Factor Alpha (cachectin): Studies on Peritoneal Macrophages and the Beige Mouse Model.* V: Liposomes in the therapy of infectious diseases and cancer (G. Lopez-Bernstein, I. J. Fidler eds.). Alan R. Liss Inc., New York 1989, pp. 287—294.

(27) Reed, S. G.: *Liposome-Encapsulated Lymphokine for the Treatment of Experimental Visceral Lishmaniasis.* V: Liposomes as drug carriers (G. Gregoriadis ed.). John Wiley & Sons, Chichester 1988, pp. 337—344.

(28) Sajki, I. i Fidler, L. J.: *Synergistic Activation by Recombinant Mouse Interferon Gama and Muramyl Dipeptide of Tumoricidal Properties in Mouse Macrophages.* J Immunol 135, 684—688, 1985.

(29) Orr, D. W., Lewis, M. i Oldham, R. K.: *Cancer Biotherapy: 1987 Disease-Related Activity.* V: Principies of cancer biotherapy (R. K. Oldham ed.). Raven Press, New York 1987, pp. 469—487.

(30) Chien, Y. W. i Wearley, L. L.: *Aids and Chemotherapy.* Drugs of Today 25, 19—25, 1989.

(31) Anon: *Interleukin Futures.* Biotechnology 7, 661—667, 1989.

(32) Anon.: *Erythropoetin Reaches the Pharmacy.* Lancet 2, 1252—1254, 1989.

DOBRA LABORATORIJSKA PRAKSA KAO PROCES ZA OBEZBEĐENJE POUZDANIH PODATAKA KOD ISPITIVANJA HEMIKALIJA

MILAN ŠKRLJ

Savezni sekretarijat za rad, zdravstvo, boračka pitanja i socijalnu politiku, Beograd

UDC 615.01

Apstrakt. Dobra laboratorijska praksa je izraz potrebe ujedinjavanja kvaliteta rada u laboratorijskim službama radi obezbjeđenja kvaliteta proizvoda. Sistem laboratorijskog rada mora neizostavno da bude praćen i odgovarajućim inspekcijskim nadzorom i nadzorom nad stručnim radom. Principi dobre laboratorijske prakse kod ispitivanja hemikalija, usvojeni od Saveta OECD-a 1981. godine, predstavljaju osnov međunarodnog sistema za razmenu informacija o toksikološkim i drugim podacima. Principima su definisani odgovornost rukovodstva, način obezbeđenja kvaliteta rada, prostorije, čuvanje i vođenje dokumentacije, plan ispitivanja, ciljevi, rokovi, oprema, kadar itd. Nadzor nad sprovođenjem Principa dobre laboratorijske prakse treba da sprovodi nadležni organ uprave (vlada).

Ključne riječi: laboratorijska praksa obezbeđuje poduhvate i ispitivanje hemikalija.

Pitanje ujednačenosti kod ispitivanja farmaceutskih preparata u međunarodnim okvirima pokrenula je još 1966. godine EFTA (Evropska organizacija za slobodnu trgovinu). Savet te organizacije je 1970. godine usvojio međunarodnu konvenciju o osnovnim principima politike u oblasti proizvodnje i kontrole lekova. Tu konvenciju je potpisalo do sada 13 zemalja Zapada i dve zemlje Istočnog bloka (Mađarska i Rumunija).

Konvencijom je predviđeno da zemlje potpisnice razmenjuju, na bazi izvršene inspekcije, sve informacije koje su potrebne organima zdravstva radi uveravanja da su uvezeni farmaceutski preparati proizvedeni u skladu sa standardima i propisima primenjivanih u zemlji.

Države uključene u NATO pakt su 1977. godine postigle sporazum o uzajamnom prihvatanju garancije kvaliteta, koju izdaju vlade zemalja potpisnica. Primena tog sporazuma traži i uspostavljanje organizovanog postupka, odgovornosti i metoda za kontrolu nivoa kvaliteta.

1969. godine je Komitet eksperata Svetske zdravstvene organizacije u vezi sa specifikacijom farmaceutskih preparata utvrdio *Dobru praksu u proizvodnji i kontroli lekova*, što se obično zove *Dobra proizvodna praksa*. Taj dokumenat je usvojen od Generalne skupštine Svetske organizacije.

Ove aktivnosti imale su za cilj da obezbede pouzdanost kvaliteta farmaceutskih proizvoda u međunarodnom prometu. Pravila ponašanja u proizvodnji i kontroli lekova se sada sa uspehom primenjuje u gotovo celom svetu u većem ili manjem obimu.

Tokom sedamdesetih došlo je do značajnih promena u politici regulisanja prometa hemijskih supstanci, a najznačajnije je što se uvidela potreba ujednačavanja zakonske regulative, obezbeđivanja pouzdanosti ispitivanja hemijskih supstanci, bilo laboratorijskih, terenskih ili kliničkih, omogućavanje razmene informacija i podataka, omogućavanje procjenjivanja rezultata ispitivanja radi obezbeđivanja mera zaštite za zdravlje ljudi i za očuvanje čovekove okoline, s jedne strane, a sa druge strane, omogućavanje međunarodnog prometa kroz otklanjanje tzv. netarifnih barijera u međunarodnoj trgovini.

Tim pristupom želelo se realizovati tri osnovna principa:

1. smanjenje ekonomskih i trgovinskih prepreka proizašlih iz regulative;

2. unapređenje efikasnijeg korišćenja naučnih i administrativnih resursa;

3. poboljšanje zaštite čoveka i okoline uz istovremeno omogućavanje normalnog rada industrije.

Takvim koncipiranjem novih zakonskih propisa proizašlo je nekoliko oblasti koje je trebalo definisati i urediti da bi zakon mogao da valjano funkcioniše. Te oblasti su sledeće:

1. ispitivanje hemikalija: utvrđivanje najpogodnijih postupaka (metoda) za ispitivanje radi procenjivanja potenecijalnih opasnosti koju pojedina hemikalija predstavlja;

2. dobra laboratorijska praksa: razvijanje međunarodnih smernica radi obezbeđivanja visoko kvalitetnih laboratorijskih postupaka za ispitivanje i obezbeđivanje da se pojedine laboratorije pridržavaju tih postupaka;

3. razmena informacija: obezbeđivanje potrebnih informacija o administrativnim merama između pojedinih zemalja i utvrđivanje obima informacija koje su potrebne zemljama u koje se hemikalije uvoze;

4. rečnik ključnih izraza: usklađivanje pojmova za pojedine izraze koji se koriste u oblasti prometa hemikalija radi izbegavanja nesporazuma u prometu i trgovini;

5. poverljivost podataka: odrediti koje informacije se mogu smatrati otvorenim radi donošenja mera zaštite, kao i da se utvrdi način za zaštitu poverljivih informacija, odn. tzv. industrijske svojine;

6. ekonomski i trgovinski efekti: utvrđivanje metodologije za određivanje efekata na ekonomiju i trgovinu pni donošenju zakonskih i sličnih propisa i odluka.

Kako sve te promene utiču na obim i dužinu laboratorijskih ispitivanja, vidi se po tome što je od 60-ih godina naovamo prosečno vreme od sinteze do komercijalizacije nekog hemijskog proizvoda poraslo sa 2,5 na 7,5 godina.

Taj proces svakako prati i smanjenje broja inovacija, uz istovremeno poboljšanje kvaliteta proizvoda, a menja se i društveni i zakonski odnos prema hemiji i hemijskoj sintezi uopšte, a pogotovo prema lekovima, sredstvima za zaštitu bilja, pesticidima i aditivima za životne namirnice.

Hemijska sinteza igra vodeću ulogu u našem svakodnevnom životu jer daje veliki broj proizvoda bez kojih bi opstanak čovječanstva bio nezamisliv.

Prema nekim podacima, do sada je sintetizovano ili izolovano iz prirodnog materijala preko 5 miliona hemijskih jedinjenja. Od toga je preko 40.000 njih na tržištu. Za većinu njih se jako malo zna, naročito o njihovim potencijalno dugotrajnim efektima. Pored toga, svake godine stavi se na tržište između 200 i 1.000 novih jedinjenja, u količini većoj od 1 tone.

Do kraja 60-ih godina je među nekoliko hiljada supstanci briga za zaštitu čovekove okoline bila usmerena samo na nekoliko njih. Uvidelo se, međutim, da nije dovoljno voditi računa samo u direktnoj otrovnosti hemijskih supstanci, tzv. LD-50. Daleko značajniju pažnju je neophodno posvetiti efektima koji su posledica nagomilavanja u organizmu, efektima koji dovode do štetnih pojava na sledećim generacijama, odnosno kada lečenje posledica ne dolazi u obzir, a pogotovu nemaju smisla materijalna obeštećenja.

Veoma brzo je uočeno da ovi proizvodi, i pored očigledne koristi, mogu dovesti u opasnost zdravlje čoveka i štetno delovati na čovekovu okolinu. To je primoralo neke zemlje, a posebno one koje su najveći proizvođači hemijskih proizvoda da zakonskim putem regulišu ispitivanje hemikalija pre nego što se donese odluka o njihovom stavljanju u promet za bilo koje svrhe.

Tragedije koje su se desile usled nedovoljno ili nepotpuno ispitanih raznih sintetskih proizvoda su posebno uticale na to da vlade pojedinih zemalja preduzmu odlučne mere radi sprečavanja nepovoljnih posledica primene proizvoda kao što su farmaceutski preparati, pesticidi, sredstva za primenu u javnoj higijeni itd. Posebno su na to uticali poznati slučajevi kao što su talidomidska tragedija, oštećenja sluha usled nekontrolisane primene streptomicina, sulfonamidi i bubrežna oboljenja, učestale pojave kanceroznih oboljenja kod radnika koji rade u industriji gume, plastike ili radnika koji rade sa nekim vrsatma herbicida bez dovoljne zaštite itd.

Na toj osnovi koncipirani zakoni su doneti najpre u Švajcarskoj 1969. godine, u Japanu 1974. godine, u SAD 1976. godine, a u okviru EEZ je 1979. godine doneta tzv. direktiva br. 6, koju su članice te zajednice morale da uvedu u svoje zakone. Jugoslavija je donela savremeni zakon o otrovima 1977. godine.

Osnovne karakteristike tih zakona su sledeće:

1. nove hemijske supstancije moraju pre stavljanja u promet da se eksperimentalno ispitaju na moguće štetne efekte;

2. ovlašćuje se vlada da od industrije zatraži potrebne informacije na osnovu kojih će se izvršiti procena opasnosti, odnosno potvrditi da su izvršena sva potrebna ispitivanja;

3. vlada ima zakonsko pravo da preduzme potrebne korake za preduzimanje mera za bilo koju hemijsku supstancu, radi zaštite zdravlja ljudi i zaštite čovekove okoline od potencijalnih štetnih dejstava;

4. uveravanja da su pri procenjivanju uzeti u obzir efekti na čoveka i efekti na čovekovu okoolinu.

Pri donošenju i primeni zakona iz te oblasti, otvorena su još i neka druga pitanja:

— ispitivanje: koje osobine za svaku hemijsku supstancu treba utvrditi, kojim metodama, kada i zašto;

— izloženost: da li je moguće utvrditi i stepen i intenzitet efekta, koje biološke mehanizme primeniti kod tog utvrđivanja, koji su rezultati dugotrajnog delovanja pri raznoraznim preturbacijama u prirodi, da li je moguće istražiti funkcionalnu međuzavisnost dejstava;

— cena: kakva je cena ili korist za društvo stavljanja u promet neke hemijske supstance, odnosno strogog regulisanja njenog prometa i kako to može da se utvrdi.

Ako se poznaje stanje i troškovi inovacija, uočljivo je da se za investicije u oblasti hemijske sinteze i ispitivanja radi njihovog plasmana na tržište izdvajaju ogromna sredstva.

U proteklih 30 godina je stavljen na tržište ogroman broj novih, visoko aktivnih hemijskih supstanci, pre svega u oblasti farmaceutike, u vidu aditiva za životne namirnice, pesticida i za razne druge industrijske namene, kao na primer, premazna sredstva, maziva, goriva itd.

U tom periodu je sazrelo shvatanje da pouzdanost ili verodostojnost podataka dobijenih pri ispitivanju treba da bude preduslov za donošenje odluka nadležnih vlasti (o prometu, o merama zaštite...).

Američka agencija za hranu i lekove je svojevremeno utvrdila da izvestan broj toksikoloških dokumentacija pripremljenih radi daljeg kliničkog ispitivanja ne zadovoljavaju uslove koji bi garantovali bezbednu kliničku fazu ispitivanja.

Bez obzira na to što većina laboratorija savesno obavlja svoje zadatke, utvrđeno je da su neki eksperimenti loše smišljeni i loše izvedeni, da stručni personal ne poklanja dovoljno pažnje urednom vođenju evidencije u toku ispitivanja, da postupak rada često onemogućuje kritički uvid u dobijene podatke, a nije moguć ni pogodan nadzor nad radom stručnjaka, da se ispitivanja ne vrše striktno prema opisu postupka, što onemogućuje evaluaciju dobijenih rezultata, da često ne mogu da se procene stručne i naučne kvalifikacije, a ni obučenost stručnog kadra uključenog u ispitivanje, da naručioci ispitivanja

nisu u mogućnosti da prate na pogodan način, u celini ili u pojedinim delovima, ispitivanja koja su ugovorili i da ne postoji prava verifikacija tačnosti i kompletnosti naučnih podataka u konačnom izveštaju.

Vlade pojedinih zemalja i neke međunarodne organizacije su zbog toga počele da razvijaju strategiju za stvaranje neophodnog administrativnog okvira putem kojeg bi se mogli obezbediti pouzdani podaci za procenu podobnosti i primenjivosti novih hemikalija.

Jedna od osnovnih normi za obezbeđivanje pouzdanosti podataka su svakako laboratorijski uslovi u kojima se ta ispitivanja obavljaju. Ti uslovi su realizovani kroz projekat o dobroj laboratorijskoj praksi.

Prvi propis formulisan u tom smislu donela je vlada Novog Zelanda 1972. godine. Nakon toga je sličan propis donela Danska, pa USA 1976. godine. Zemlje OECD-a su donele zajednički dokument pod nazivom *Principi dobre laboratorijske prakse* 1981. godine i istovremeno je odlučeno da se međusobno razmenjuju podaci o hemikalijama ako su ispunjeni sledeći uslovi:

— da su pri ispitivanju poštovani principi dobre laboratorijske prakse;

— da je sprovedena inspekcija i stručni nadzor nad laboratorijama;

— da je izdat certifikat nadležnih vlasti da su pri ispitivanju sprovedeni principi dobre laboratorijske prakse;

— da pri vladi postoji organ koji prati primenu i funkcionisanje dobre laboratorijske prakse.

Principi dobre laboratorijske prakse ili, kako se kod nas zovu, *Kodeks dobre laboratorijske prakse*, doneti su da se omogući uporedivost pojedinih studija i programa u ispitivanju hemikalija i da se na taj način ojača, odnosno obezbedi uzajamno prihvatanje rezultata ispitivanja.

Dobra laboratorijska praksa je tako postala baza za obezbeđenje kvaliteta podataka dobijenih radi procene uticaja hemikalija na ljudsko zdravlje i na čovekovu okolinu čiji je osnovni cilj:

— zajednička akcija zaštite čoveka i njegove okoline;

— smanjenje troškova kod ispitivanja;

— unapređenje opšteg nivoa kvaliteta ispitivanja i na osnovu toga omogućavanje donošenja odgovarajućih mera za zaštitu zdravlja ljudi i čovekove okoline;

— obezbeđenje opšte prihvatljiviosti rezultata ispitivanja u okviru pojedinih zemalja i u međunarodnom opsegu, radi olakšanja prometa hemijskih proizvoda na međunarodnom tržištu;

— laboratorije koje se u svom radu pridržavaju tih principa stiču ugled zbog svog stručnog i naučnog rada.

Principi su tako formulisani da se mogu primeniti pri svim nekliničkim ispitivanjima hemijskih supstanci za dobijanje podataka koji se traže zakonskim propisima radi stavljanja na tržište ili radi daljeg kliničkog ili biološkog ispitivanja, i to u laboratorijskim uslovima ili na terenu.

Na taj način je učinjen značajan korak u rešavanju pitanja verodostojnosti podataka, naročito u međunarodnim razmerama. Podaci dobijeni u jednoj zemlji mogu se preuzeti u drugoj da bi se zadovoljili zahtevi utvrđeni zakonom tih zemalja.Izbegnuta je potreba ponovnog ispitivanja ili proveravanja, što ima za posledicu uštedu u ceni, vremenu, broju laboratorijskih životinja. Sa trgovinske tačke gledišta to je i doprinos uklanjanju tzv. netarifnih prepreka u međunarodnoj trgovini.

Naša zemlja, koja u organizaciji OECD-a ima posmatrački status, usvojila je te principe ubrzo nakon usvajanja od strane Saveta OECD-a, 1983. godine. Nazvani su *Kodeksom dobre laboratorijske prakse.*

Dokument je podeljen u dva osnovna dela:

— Principi, tj. osnovne norme koje treba da se poštuju u toku ispitivanja;

— Uputstvo za vršenje inspekcije i nadzora nad stručnim radom.

U prvom delu je definisana odgovornost rukovodstva, funkcija obezbeđivanja kvaliteta rada, adekvatnost prostorija i vođenje dokumentacije.

Pošto je svrha tih principa u suštini zadovoljenje zahteva zakona, oni se ne odnose na čisto naučno-istraživačka ispitivanja, ali se preporučuje da se i ta vrsta ispitivanja vrši na način blizak tim principima.

Centralno pitanje na koje se odnose principi jeste plan ispitivanja, kojim treba da budu utvrđeni ciljevi, sredstva, oprema, angažovanost stručnog kadra, prostorije, vreme pojedinih operacija, a svakako i vreme početka i završetka pojedinih faza i čitave studije.

Pitanje prostorija ili mesta gde će se vršiti ispitivanje treba rešiti tako da jedna vrsta ispitivanja ne utiče na drugu ukoliko se više programa izvodi istovremeno.

Plan ispitivanja treba da pripremi rukovodilac projekta u konsultaciji sa nosiocem ili mentorom, a i sa nadležnim organima. Rukovodilac projekta je i odgovoran za redovno izvođenje ispitivanja u rokovima predviđenim planom.

U nekim slučajevima nije moguće unapred utvrditi definitivan plan ispitivanja. U takvim slučajevima treba da se sva odstupanja i modifikacije tretiraju sa istom pažnjom kao osnovni dokument. Te promene i neslaganja treba navesti u dokumentaciji.

Programi za obezbeđivanje kvaliteta treba da se sprovode pod neposrednim rukovodstvom ustanove. Stručnjaci koji su uključeni u obezbeđenje kvaliteta ne mogu istovremeno da budu angažovani na pojedinim fazama ispitivanja. Taj program treba da obezbedi potpunu autentičnost i pouzdanost dobijenih rezultata.

Jedan od najvažnijih elemenata u okviru tih principa jeste dokumentacija koja mora biti tako priređena da odslikava način organizacije i sistem laboratorijskog rada, funkciju čitave laboratorije i pojedina ispitivanja. Pored dokumentacije o radu, traži se i dokumentacija o stručnom kadru, o njihovim kvalifikacijama, usavršavanjima, iskustvima sa opisom dosadašnjeg rada, i to za svakog stručnjaka posebno.

Razumljivo je da su personalni podaci poverljive prirode i da o njima treba da vodi računa personalna služba ustanove. U toku ispitivanja treba da se beleže svi rezultati, jer su oni za konačni izveštaj od najvećeg značaja.

Konačni izveštaj o izvršenim ispitivanjima treba da bude logično sastavljen, potpun i sažet i treba da da odgovor na postavljeni cilj studije.

Po redosledu na kraju jeste arhiviranje svega što je vezano za studiju. O arhiviranom materijalu treba da se vodi evidencija kao i svega što ulazi i izlazi iz arhive. Plan ispitivanja, konačni izveštaj i sav materijal koji se odnosi na ispitivanje treba da se nakon završenog ispitivanja prenese u arhivu.

Do sada je malo istraživačkih laboratorija imalo uređene arhive gde se čuvaju zapisnici, izveštaji, uzorci ili primerci. Primenom ovih novina u organizovanom ispitivanju, a pogotovu usled međunarodnog priznavanja rezultata ispitivanja, arhive će morati da postoje u okviru laboratorija ili kod naručioca ispitivanja kao posebne jedinice.

Praćenje i nadziranje primene dobre laboratorijske prakse treba da se sprovodi po određenom mehanizmu u određenim vremenskim razmacima, što treba da bude integralni deo ovog programa. Zato se, uz ovaj osnovni dokumenat, pripremaju i smernice za inspekciju i stručni nadzor, koji treba da sprovode nadležni organi uprave u skladu sa zakonskim ovlašćenjima za vršenje ove delatnosti.

GOOD LABORATORY PRACTICE A PROCESS TO ASSURE RELIABLE DATA IN THE TESTING OF CHEMICALS

Summary

Good laboratory practice is an expression of a need for harmonization of the work in laboratory services to ensure adequate product quality. The system of laboratory work should be ascompanied by an inspection and study audit. The document *Principles of Good Laboratory Practice* in chemicals investigation, adopted by the OECD Council in 1981, represents a basis for international exchange of information of toxicological and other data. The GLP includes responsibilities in management, quality of work, facilities, documentation, study plan, objectives of the study, equipment, personnel etc. The inspection and study audit on GLP performance should be realized through relevant authority (government).

LITERATURA

(1) *Good Laboratory Practice in the Testing of Chemicals*, OECD, Paris, 1982.

(2) *Application of GMP Rules in the Control Laboratory*, Zbornik radova izloženih na Seminaru u Budimpešti od 10—12. juna 1981. godine.

(3) *Good Laboratory Practice — a Process to Assure the Quality of Test Data in the Testing of Chemicals*, ENV/CHEM/MC/82.5, OECD, Pariz, 1982.

(4) *Certification Scheme on the Quality of Pharmaceutical Products Moving in International Commerce*, PHARM/82.4, WHO, Ženeva.

ANU
BiH
АНУ
БиХ

OBEZBJEĐENJE KVALITETA LIJEKOVA — STANJE U FARMACEUTSKOJ INDUSTRIJI JUGOSLAVIJE U ODNOSU NA ZAHTJEVE SVJETSKE ZDRAVSTVENE ORGANIZACIJE

SLAVKO MARKOVIĆ i DŽENANA TATAREVIĆ
DP »Bosnalijek«, Sarajevo

UDC 615(497)1

Apstrakt. Analiza stanja u jugoslovenskoj farmaceutskoj industriji opisana je sa aspekta uvođenja sistema osiguranja kvaliteta. Dat je kritički osvrt zakonske regulative iz područja proizvodnje lijekova u odnosu na zahtjeve EEC, FDA i WHO, prikazan je sistem osiguranja kvaliteta i zahtjevi WHO za certifikaciju proizjvođača. Podržava se pravac aktivnosti kojim su krenule i ostale Evropske zemlje koje se brižljivo pripremaju na izazov zahtjeva koji se odnose na EVROPU 92 uz podršku harmonizovanih standarda i pravila.

Ključne riječi: obezbjeđenje kvaliteta, proizvodnja lijekova, certifikacija, preporuka WHO.

UVOD

U industrijskim zemljama u proizvodnji lijekova primjenjuje se sistem osiguranja kvaliteta (Quality Assurence, QA). Britanski GMP (Good Manufakturing Practice) iz 1977. godine (1) definiše taj nivo kvalitete kao skup svih organizovanih akcija kako bi se osigurao proizvod odgovarajuće kvalitete po namjeni upotrebe. GMP iz 1983. godine (2) ne mijenja definiciju QA, nego potencira princip kvalitete i odnosa između QA, GMP i kontrole kvalitete (Quality Control, QC), što se odnosi i na GMP Evropske ekonomske zajednice (3).

Promjene koje najavljuje EEC, odnosno EVROPA 92 uticale su takođe i na farmaceutsku industriju u Jugoslaviji da sagleda i usaglasi nivo kvalitete u odnosu na preporuke EEC, FDA (Food Drugs Administration) i WHO kako bi obezbijedila svoje prisustvo na evropskom tržištu.

U ovom radu prikazano je stanje u farmaceutskoj industriji, dat je kritički osvrt zakonske regulative, prikazani su osnovni elementi QA i zahtjevi WHO za certifikaciju proizvođača lijekova, što su i osnovni uslovi za postizanje odgovarajućeg nivoa kvalitete lijeka.

STANJE OSIGURANJA KVALITETA U FARMACEUTSKOJ INDUSTRIJI

Jugoslovenski proizvođači povezani su sa brojnim ino-partnerima i već godinama se susreću sa zahtjevima da u proizvodnji lijekova primjenjuju GMP propise, bilo nacionalne propise razvijenih zemalja, bilo interne smjernice velikih farmaceutskih kompanija izrađene na bazi važećih savremenih GMP propisa. Međutim, analizirajući naše iskustvo došli smo do zaključka da je pristup ino-partnera po pitanju naših obaveza primjene GMP propisa veoma različit i zavisi od:

— značaja proizvoda;

— značaja jugoslovenskog proizvođača s aspekta interesa;

— mogućnosti izvoza na tržište trećih zemalja.

Ova zapažanja su osnov za našu pretpostavku da sama saradnja sa inopartnerima nije uvijek garant ili siguran dokaz primjene GMP propisa, kao i za procjenu da trenutna situacija široko varira, što proizvođače dovodi u neravnopravan položaj i ograničava prisustvo na tržištu lijekova.

Činjenica je da postojeće organizacije kontrole kvaliteta ne mogu ispuniti sve pravne, tehničke i tehnološke uslove za sprovođenje sistema QA u onim organizacijama gdje sada postoji samo služba QC. Sistem za QA u malom broju proizvodnih organizacija postoji u prihvatljivom obliku. Najviše se koristi onaj dio koji obuhvata klasičnu QC.

ZAKONSKA REGULATIVA

Zakonska regulativa (7, 8, 9) koja se odnosi na reegistraciju, proizvodnju i promet lijekova je u svoje vrijeme pratila zahtjeve WHO. Takav nivo pokušao se održati parcijalnim i vrlo čestim revizijama što je narušilo njegovu konzistentnost, a razvojem farmaceutske industrije ti nedostatci su još više došli do izražaja (10, 11, 12).

Poznato je da je farmaceutska proizvodnja u našoj zemlji većinom licencnog karaktera i da se po tom osnovu prepliću različiti zahtjevi ino-partnera a takođe i zahtjevi ino-tržišta, što se u svakom slučaju odražava na proizvodnju.

Uzimajući u obzir primjedbe koje se odnose na zakonsku regulativu, zahtjeve ino-partnera a takođe i zahtjeve ino-tržišta potrebno je započeti sa:

— prihvaćanje standardnih postupaka u proizvodnji i prometu lijekova (verifikacija GMP, GLP, GCP i ostalih preporuka i smjernica EEC, EFTA, FDA, WHO);

— promjenom i prilagođavanjem našeg zakona o stavljanju lijekova u promet i pratećih pravilnika i propisa sa direktivama EEC;

— striktnom primjenom direktiva EEC u postupku predkliničkih i kliničkih ispitivanja; registracijskog postupka;

— pristupiti konvenciji za inspekciju proizvodnje lijekova (Pharmaceutical Inspection Convention, PIC))

— pristupiti konvenciji za izdavanje evropske farmakopeje; i

— primjena sheme certifikacije proizvođača lijekova WHO.

OSIGURNJE KVALITETA

Sistem QA zacrtan je GMP propisima (1, 2, 3), gdje su dati osnoni principi i metodologija rada u sistemu QA, uzimajući u obzir sve faze životnog ciklusa jednog lijeka i procesa.

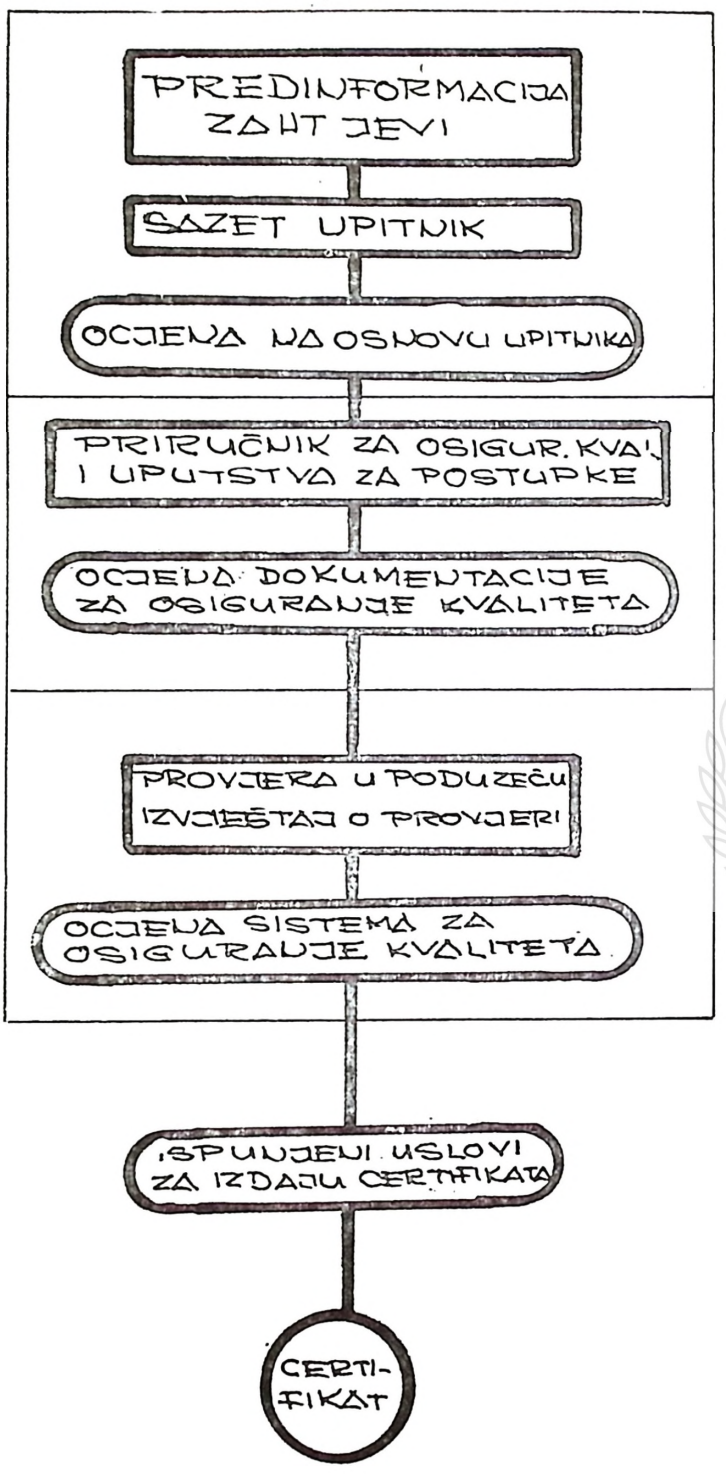
Kvalitet lijeka uslovljen je kvalitetom rada u cijelom radnom procesu i zavisi od planiranja i razvoja nove formulacije i procesa, od kvaliteta odlučivanja i poslovanja, od organizacije rada i međusobne saradnje između pojedinih funkcija poslovanja. Sistem QA čine sljedeći elementi (4, 5): odgovornost rukovodstva, sistem kvalitete, ugovorno regulisanje, provjera projekta, provjera dokumentacije, odnos sa dobavljačima i kupcima, mogućnost praćenja istorije, kontrola kvalitete, kontrolisanje i ispitivanje, korektivne akcije, rukovanje, pakovanje, skladištenje i isporuka, statističke metode, provjera kvalitete, servisiranje i edukacija.

Postupci klasične QC nisu tolikog obima i često se svode na rutinski pregled nekih svojstava kvalitete lijeka na osnovu čega se ne može dovoljno pouzdano ocijeniti i procijeniti nivo kvalitete serije lijeka, što je moguće primjenom QA. U tabeli 1. je pokazan dio poslova klasične QC i QA.

Tabela 1. PREGLED POSLOVA QA i QC

OSIGURANJE KVALITETA	KONTROLA KVALITETA
— planovi i programi QA	— ulazna kontrola
— nadzor sistema QA u preduzeću	— procesna kontrola
— nadzor nad provedbom programa QA za proizvode	— završna kontrola
— provjera dobavljača	
— praćenje analiza i korektivne akcije za loše materijale i proizvode	
— informacijski sistem QA	
— kvalifikacija proizvodnih procesa	
— veza sa vanjskim institucijama	
— evidencija, distribucija i arhiva	

Da bi se ostvario optimalan kvalitet lijeka kroz uključivanje svih funkcija poslovanja, potreban je program koji definiše sistem QA u svim fazama prema JUS A. K. 1.010—014 (6). Taj program je potrebno detaljno obraditi u *Priručniku za QA*. Primjenom sistema QA potvrđujemo optimalni kvalitet lijeka, u kom slučaju se može govoriti o njegovoj podobnosti za upotrebu odnosno djelotvornosti.



Slika 1. Postupak certifikacije

ANU BiH АНУ БиХ

CERTIFIKACIJA PROIZVOĐAČA

U proizvodnji lijekova procjena podobnosti proizvođača uključuje brojne aspekte poslovanja, počevši od organizacije, osoblja, prostora, opreme i sl., sve do plasiranja lijekova na tržište. Prema zakonskim (7, 8) i podzakonskim propisima (13) formalno je obezbijeđena potpunija procjena podobnosti proizvođača. Jugoslaviji, kao potpisniku WHO-WHA 28.65, proističe obaveza obezbjeđenja primjene i redovnog nadzora u primjeni GMP propisa kao i primjeni sheme certifikacije farmaceutskih proizvoda i proizvođača.

Uzimajući u obzir preporuke WHO, zatim EEC i FDA, da bi se izvršila certifikacija proizvođača lijekova u prethodnom postupku, moraju se ispuniti sljedeći uslovi:

— da su i od strane ovlašćenih institucija potvrđeni odgovarajući standardi;

— da su izrađeni i od strane ovlašćenih institucija priznati postupci za dokazivanje saobraznosti;

— da postoji međunarodno izdata saglasnost institucije koja izvodi provjeravanje kao uslov za dodjelu cartifikata;

— da su proizvođači, laboratorije za ispitivanje i distributeri sposobni da ponude svoje *Pravilnike* QA na provjeru;

— da proizvođači, laboratorije za ispitivanje i distributeri posjeduju opremu i kadrove;

— da su proizvodni postupci i usluge na takvom stepenu da mogu ispuniti, odnosno proći sva unaprijed predviđena ispitivanja.

Postupak certifikacije prikazan je na slici 1.

Da bi jugoslovenski proizvođači lijekova bili u ravnopravnom položaju na ino-tržištu sa stranim proizvođačima lijekova i da bi se ravnopravno mogli uključiti u EVROPU 92, odgovarajući savezni organi uprave moraju obezbijediti sljedeće:

— potrebno je na saveznom nivou obezbijediti verifikaciju ovlašćenih organizacija za nadzor;

— mora se postići međunarodno priznavanje putem identičnih pravila i postupaka;

— formiranje neutralnih stručnih organizacija koje bi ispunjavale uslove verifikacije;

— formirati i ovlastiti laboratorije u skladu sa međunarodnim uslovima i izvoditi verifikaciju;

— formirati stručno tijelo za provjeravanje ovlašćivanja.

Na ovaj način bi se obezbijedili svi potrebni uslovi za certifikaciju proizvođača lijekova prema preporukama WHO.

QUALITY ASSURANCE FOR DRUGS — YUGOSLAV PHARMACEUTICAL INDUSTRY SITUATION IN RELATION TO WHO REQUIREMENTS

Summary

Analysis of situation in Yugoslav pharmaceutical industry is described from the point of view of quality assurance introducing. A critical review to legal regulations in the area of drug manufacturing in relation to EEC, FDA and WHO

requirements is given and quality assurence system and WHO requirements for manufacture certification are presented. A support is given to the trend of activities taken by other European countries, which are preparing themselves carefully to resist the challenge of requirements regarding EUROPA 92 supported by harmonized standards and rules.

LITERATURA

(1) *Guide to Good Pharmaceutical Manufacturing Practice,* H. M. S. O., London 1977.

(2) *Guide to Good Pharmaceutical Manufacturing Practice,* H. M. S. O., London 1983.

(5) M. Macek; *Funkcija organiziranja sistema osiguranja kvalitete,* Kval. Pouzd., 50 (1988) 210.

(4) M. Minić; *Praktičan pristup ugradnji kvaliteta u proizvode za izvoz,* Kval. Pouzd., 65 (1989) 69.

(5) M. Macek; *Funkcija organiziranja sistema osiguranja kvalitete,* Kval. Pouzd., 63 (1989) 32.

(6) *JUS A. K. 1.010—014;* Savezni zavod za standardizaciju, Beograd, 1987.

(7) *Zakon o stavljanju lijekova u promet,* Sl. list SFRJ, br. 43/86.

(8) *Pravilnik o bližim uslovima koji moraju ispunjavati organizacije udruženog rada koje stavljaju lijekove u promet ili obavljaju ispitivanje i kontrolu lijekova koji se upotrebljavaju u medicini,* Sl. list SFRJ, br. 55/88.

(9) *Uputstvo o metodu za laboratorijsko ispitivanje lijekova radi njihovog stavljanja u promet,* Sl. list SFRJ, br. 34/89.

(10) V. Jakić; *Akcije za osiguranje kvalitete lijekova u proizvodnji i prometu,* Kval. Pouzd., 64 (1989) 11.

(11) B. V. Vrhovac; *Kritički prikaz područja lijekova u našoj zemlji u razdoblju 1985—1988,* Pharmaca, 26 (1988) 95.

(12) L. Stefanini-Orešić, M. Perić-Barbarić; *Laboratorijsko ispitivanje lijekova,* Kval. Pouzd., 64 (1989) 23.

(13) *Dobra proizvodna praksa 85;* Savezni zavod za rad, zdravstvo i socijalnu zaštitu, Beograd, 1986.

ADITIVI U LIJEKOVIMA I KVALITET LIJEKOVA

BILJANA IVKOVIĆ
Institut za farmakologiju i toksikologiju Farmaceutskog fakulteta, Sarajevo

UDC 615.01

Apstrakt. Farmaceutski pripravci,a naročito oni koji sadrže vodu, podložni su uticaju različitih faktora sredine kao što su kiseonik, svjetlost, vlaga, povišena temperatura, razvoj mikroorganizama i sl.

Da bi se spriječio razvoj i rast mikroorganizama te razgradnja farmaceutskog preparata, dodaju se odgovarajući konzervansi i antioksidansi čije su osobine i eventualna neželjena dejstva prikazni u ovom radu.

Treću grupu aditiva opisanu u radu predstavljaju supstance za bojenje ljekovitih preparata Data je njihova podjela i osvrt na funkciju i potencijalne toksične efekte.

Ključne riječi: konzervansi, antioksidansi, boje za lijekove.

Pri oblikovanju lijekova dodaje se niz neaktivnih tvari kojima se postiže odgovarajući oblik ili utiče na osobine pripravka. Supstance koje se upotrebljavaju kao pomoćne tvari (aditivi) uz tačno definisane fizičke i hemijske osobine, te uticaj na oslobađanje i resorpciju lijeka, moraju ispunjavati opšte uslove, kao što su terapijska indiferentnost i dobra podnošljivost.

Poznavanje osobina pomoćnih materija i uloge koju imaju u ljekovitim oblicima od velikog je značaja za procjenu biološke raspoloživosti, tj. terapijske efikasnosti preparata.

1. KONZERVANSI

Konzervansi su antimikrobni agensi koji se dodaju farmaceutskim pripravcima da bi se spriječio rast ili razvoj mokroorganizama ili izazvalo njihovo trajno oštećenje. Trebalo bi da konzervansi pri niskim koncentracijama imaju brz efekat protiv širokog spektra patogenih mikroorganizama.

Izbor odgovarajućeg konzervansa zavisi od pH-vrijednosti, kompatibilnosti sa ostalim sastojcima, doze i frekvencije davanja lijeka itd. Najbolje je primjeniti odgovarajuće kombinacije konzervansā, ali pri tome treba voditi računa o međusobnim inkompatibilnostima koje najčešće daju kvarterni amonijski spojevi.

Općenito vrijedi da se u neutralnom i kiselom području primjenjuju konzervansi protiv bakterija i gljivica, a u alkalnom uglavnom oni protiv bakterija.

Pri izboru konzervansa mora se računati sa gubicima usljed fizičkih i hemijskih reakcija s drugim pomoćnim tvarima. Zato ih često treba predozirati. Mnoge anorganske i organske pomoćne materije adsorbuju na svoju površinu veliki broj konzervansa. I dok neorganske materije vežu uglavnom fenilživa spojeve, organske imaju afinitet za skoro sve konzervanse.

Tabela 1. KONZERVANSI

Grupa	Konzervans	Uobičajene konc. (%)	Optimalno pH-područje
Fenoli i derivati fenola	Fenol	0,3—0,5	3—9
	Krezol	0,2—0,4	3—8
	Hlorkrezol	0.05—0,1	
	Metilparaben	0,1—0,2	
	Propilparaben	0,03—0,08	
Alifatski i aromatski alkoholi	Hlorbutanol	0,3—0,5	3—4,5
	Benzilalkohol	1—2	3—4
	Hlorbenzilalkohol	0,1—0,3	
	Dihlorbenzilalkohol	0,01—0,1	
	Feniletilalkohol	0,7—1,5	3—4,5
	Fenilpropilalkohol	0,1—0,3	
Karboksilne kiseline	Benzojeva kiselina i natrij-benzoat	0,1—0,2	4
	Sorbinska kiselina i njene soli	0,1—0,15	5
Organski spojevi žive	Fenilživa (II) — acetat	0,002—0,02	
	— borat		
	— nitrat		7—10
	Tiomersal	0,001—0,015	3—8
Kvarterni amonijski spojevi	Benzalkonij — hlorid		4,5—10
	Centrimonij — bromid		
	Alkonij — bromid		

1.1. Fenoli i derivati fenola

Učinak ove grupe konzervansa temelji se na prisustvu slobodne fenolske grupe. Alkiliranjem i halogeniranjem fenola povećava se učinak, a smanjuje toksičnost.

U visokim koncentracijama fenoli djeluju kao plazmatski otrovi. Zbog intenzivnog mirisa i okusa mogu se primjenjivati samo ograničeno, tj. samo za parenteralne pripravke, serume i vakcine. Pri tome treba voditi računa o različitim inkompatibilnostima (kamfor, mentol, pirogalol, rezorcinol, salol, timol).

Estri para-hidroksi benzojeve kiseline se smatraju gotovo univerzalnim konzervansima. Oni međutim nisu pouzdani u uobičajenim koncentracijama, a pri dužoj primjeni mogu izazvati kontaktne ekce-

me i senzibilizirajuće učinke, pa se mogu primjenjivati za konzerviranje očnih pripravaka.

Inkompatibilni su uglavnom sa alkalijama, solima željeza, neionogenim tenzidima i sl.

1.2. Alifatski i aromatski alkoholi

Djelovanje ove grupe konzervansa je uslovljeno prisustvom hidroksilne grupe. Primjenjuju se dosta široke: peroralno, kutano, oftalmološki i parenteralno.

U koncentracijama većim od dozvoljenih nadražuju sluzokožu, što treba imati u vidu pri konzerviranju očnih preparata. Inkompatibilni su sa alkalno i kiselo reagujućim supstancama i tenzidima.

1.3. Karboksilne kiseline

Spektar djelovanja karboksilnih kiselina je ograničen uglavnom na gljivice i plijesni, ali imaju prednost što su bez mirisa i okusa i fiziološki dobro podnošljive. Najčešće se koriste za konzerviranje preparata za peroralnu i kutanu primjenu.

1.4. Organski spojevi žive

Ovu grupu čine konzervansi visoke aktivnosti koji djeluju već u malim koncentracijama. Primjenjuju se za konzerviranje različitih pripravaka osim preparata za peroralnu primjenu.

Inkompatibilni su sa preparatima koji sadrže sumpor, sa bromi-dima, jodidima i neionogenim tenzidima.

Ovi spojevi mogu imati iritirajuće efekte i dovesti do eritema i osipa 6—12 sati nakon upotrebe. Ponekad može doći do keratopatije i stvaranja jetrogenih depozita žive u staklastom tijelu oka nakon dugogodišnje primene kapi za oči koje sadrže ove spojeve.

Tiomersal može izazivati hiperreaktivnost i alergijski konjunktivititis. Smatra se ototoksičnim.

1.5. Kvarterni amonijski spojevi

Aktivnost ovih spojeva zasnovana je na prisustvu hidrofilnog kationa koji posjeduje jednu ili više alkilnih grupa.

Upotrebljavaju se za parenteralne pripravke, te preparate koji se apliciraju na kožu i sluznicu. Imaju širok spektar djelovanja. Iako ne iritiraju kožu, ponekad se javlja hipersenzitivnost i kontaktni dermatitis (3, 7, 8).

2. ANTIOKSIDANSI

Antioksidansi se dodaju kao oksidacijska zaštita ljekovitih pripravaka jer sprečavaju ili odgađaju oksidativni raspad ljekovite supstance.

Djelovanje antioksidanasa nije potpuno razjašnjeno mada je uslovljeno nižim redoks potencijalom tih supstanci od onog koji posjeduje supstanca koju treba zaštititi. Selekcija se može napraviti teoretski na bazi razlike redoks potencijala između ljekovite supstance i antioksidansa (4).

Dijele se na antioksidanse za vodene i nevodene sisteme. Prva grupa spojeva u kiseloj sredini prelazi u sumporastu kiselinu koja predstavlja aktivnu komponentu. Zbog neprijatnog mirisa i okusa nepogodni su za stabilizaciju peroralnih i kutanih ljekovitih oblika. Najčešće se upotrebljava askorbinska kiselina koja ima veoma dobru fiziološku podnošljivost i ugodan miris, pa je pogodna za stabilizaciju peroralnih preparata. U kombinaciji sa spojevima koji imaju primarnu amino grupu može formirati obojene Šifove baze, pa o tome treba voditi računa (7). Antioksidansi za nevodene sisteme su prije svega različiti prirodni spojevi. Najvažniji je tokoferol koji je fiziološki bez zamjerki. Alkilgalati mogu izazvati alergijsku kožnu reakciju (3, 7, 8).

Tabela 2. ANTIOKSIDANSI

Grupa	Antioksidans	Uobičajena konc. (%)	Rastvorljivost
za vodene sisteme	Natrij-sulfit	0,05—0,2	dobra u glicerolu
	Kalij-sulfit	0,05—0,2	slaba u etanolu
	Natrij-hidrogensulfit	0,01—0,2	dobra u glicerolu
	Kalij-hidrogensulfit	0,01—0,2	slaba u etanolu
	Natrij-pirosulfit	0,01—0,2	
	Kalij-pirosulfit	0,03—0,2	dobra u vodi i etanolu
	Cistein	0,01—0,1	dobra u vodi i etanolu
	Askorbinska kiselina	0,01—0,1	dobra u vodi, slaba u etanolu i glicerolu
za nevodene sisteme	Tokoferol	0,01—0,3	dobra u masnoćama netopiv u vodi
	Askorbilpelmitat	0,01—0,2	dobra u etanolu slaba u vodi i ulju
	Propilgalat	0,001—0,02	dobra u etanolu i propilenglikolu slaba u vodi i ulju
	Butilhidroksianizol	0,001—0,02	dobra u etanolu, propilenglikolu i uljima netopiv u vodi
	Butilhidroksi toluol	0,001—0,02	dobra u etanolu, tečnom parafinu i uljim netopiv u vodi i glicerolu

ANU BiH АНУ БиХ

3. BOJE ZA LJEKOVITE PREPARATE

Često se postavlja pitanje zašto se boje lijekovi i da li je korist koja se dobije bojenjem lijeka veća od rizika. Boja lijeka ne štiti samo pacijenta od zamjene preparata već i od zamjene preparata različitog doziranja. Za farmaceuta u proizvodnji lijekova važno je da prilikom industrijskog punjenja i pakovanja preparata boja štiti od zamjenjivanja.

Tabela 3. PRIRODNE BOJE

Naziv boje	Kolor indeks	ADI — vrijednost (mg/kg tjel. tež.)
Karotini	75 130	0—5
Ksantofili	—	n
Hlorofil	75 810	n
Antocijani	—	0,2,5
Riboflavin	—	n
Karamel	—	0—100
Košenila (Karmin)	75 470	0—5
Biljni ugalj	77 266	n
Kurkumin	75 300	n
Betanin	—	n
Neorganski pigmenti:		
Titan dioksid	77 891	n
Kalcijum karbonat	77 220	—
Željezni oksid i hidroksid	77 489	n
Aluminijum sulfat	—	—
Zlato i srebro	—	—

Tabela 4. VJEŠTAČKE BOJE

Naziv boje	Kolor indeks	ADI — vrijednost
AZO BOJE		
Tartrazin	19 140	0—7,5
Amaranth	16 185	0—0,8
Gelborang S	15 985	0—2,5
Azorubin	14 720	0—4
Brilliantschvarz BN	28 440	0—5
BRIFENILMETANSKE BOJE		
Patentblau V	42 501	0—15
Brilliant Green	42 040	—
INDIGO BOJE		
Indigotin	7 315	n
KSANTENSKE BOJE		
Erytrozin	45 430	0—1,25

ANU BiH АНУ БиХ

Opšte prihvaćen stav o količini boje prisutne u farmaceutskom preparatu je da koncentracija bude dovoljno visoka da se postigne željena nijansu boje, kao i tako mala da spriječi pojavu toksične reakcije. U praksi se spominje podatak da se količina dozvoljene boje kreće od 5—50 g/kg materijala koji se boji (1). Boje koje se mogu koristiti propisane su odredbama i pravilnicima pojedinih zemalja. Međutim, uniformnost u pogledu prihvatanja ili neprihvatanja boja u svijetu je mala.

U našoj zemlji ocjenjivanjem sigurnosti, odnosno odobravanjem boja koje se mogu koristiti za bojenje lijekova bavi se Savezni zavod za standardizaciju u saradnji sa Saveznim komitetom za rad zdravstvo i socijalnu zaštitu.

Ph. Jug. IV (6) ne daje monografije boja, međutim, u opštem dijelu napominje se da se za bojenje farmaceutskih preparata mogu ko- Ovaj pravilnik ne pruža dovoljno informacija o pojedinim bojama koje ristiti boje dozvoljene Pravilnikom za bojenje životnih namirnica (9). je vrlo važno znati kod primjene boja u farmaceutskoj praksi. Zato se u pogledu regulativa koriste strane farmakopeje i pravilnici (liste) koje daju odgovarajuće institucije i stručne komisije u svijetu (»Codex Alimentarius Committee« Svjetske zdravstvene organizacije, »Joint Expert Committee for Food Additives« Evropske zajednice i »Food and Drug Administration« u SAD).

Činjenica da boje mogu uticati na osobine i kvalitet lijekova i da mogu imati toksične efekte ima za posljedicu zahtjeve za strogo regulisanje bojenja lijekova. Opšti toksikološki zahtjevi za boje uključuju nalaze akutne, subhronične i hronične toksičnosti, ispitivanje mutagenosti, kancerogenosti, teratogenosti, embriotoksičnosti i sl. Za mnoge boje na osnovu toksikoloških nalaza određene su količine koje se smiju dnevno uzeti, tzv. ADI-vrijednosti. Ona izražava količinu boje u mg/kg tjelesne težine koja se maksimalno smije uzeti u jednom danu. Kod nekih boja ADI-vrijednost nije limitirana jer se na osnovu dugogodišnjih iskustava pokazalo da ne predstavlja rizik za pacijenta (1).

3.1. Prirodne boje

Prirodne boje se dobivaju iz mineralnih, biljnih i životinjskih izvora. Nestabilne su, pa su zato tehnološki manje značajne. Nakon dugogodišnjih iskustava može se reći da su boje iz ove grupe netoksične, ne posjeduju koncerogene, mutagene i teratogene osobine (3, 1, 5).

3.2. Vještačke boje

Vještačke boje se češće upotrebljavaju od prirodnih jer su stabilnije i toksikološki najbolje ispitane supstance. Mnogobrojne dugotrajne toksikološke studije, završene 1983. god. pod pokroviteljstvom Svjetske zdravstvene organizacije, potvrđuju da boje koje se najčešće upotrebljavaju nisu opasne po čovjekovo zdravlje kada se koriste u navedenim granicama (2).

ADDITIVES IN DRUGS AND DRUG QUALITY

Summary

Deterioration of pharmaceutical products, especially those containing water, may result from chemical changes, oxygen, light, moisture and microoganism contamination.

Those changes can be prevented or minimised by addition of a suitable antioxydant or an antimicrobial preservative. Their properties, potential side effects and interactions are discussed in this paper.

Many pharmaceutical products ought to be coloured for psychological and practical reasons, which is very important both for the patient and industrial pharmacist.

Colouring agents, used as colours for pharmaceutical preparations have been reviewed in this paper.

LITERATURA

(1) Bertram, B. (1987): *Farbstoffe: Wie gefahrlich sind sie,* Dtch. Apoth. Ztg., 127, 99—509.

(2) *Casarett and Doull's Toxicology: The Basic Science of Poisons,* 3rd edition, Klassen, C. D., Amdur, M. O. and Doull, J. (eds.), Macmillan Publishing Co., New York, Toronto, London, 1986, 115—116; 788.

(3) E. P. M. (1982): *The Extra Pharmacopoeia Martindale,* 28th edition, The Pharmaceutical Press, London, 1281—1293.

(4) Lachman, L., Lieberman, H. A. and Kanig, J. L. (1986): *The Theory and Practice of Industrial Pharmacy,* 3rd edition, Lea and Febiger, Philadelphia, 809.

(5) Milić-Aškrabić, J. i Marković, S. (1988): *Pregled supstancija za bojenje lijekova,* Bilten, Časopis farmaceutskog društva Srbije, 7—8—9, 5—23.

(6) *Pharmacopoea Iugoslavica,* editio quarta, Savezni zavod za zdravstvenu zaštitu, Beograd 1984, Svezak I, 265.

(7) *Remington's Pharmaceutical Sciences* (1985): *Mack Publishing Co.,* 16th edition, 1278—1320.

(8) Senjković, R. (1988): *Zaštita ljekovitih oblika od mikroorganizama i oksidativnih procesa,* Farm. Glas., 44, 7—8/1988, 247—254.

(9) *Pravilnik o kvalitetu kafe i surogata kafe, čaja, začina, koncentrata za supu, pekarskog kvasca, praška za pecivo, pudinga, dijatetskih proizvoda i aditiva,* Službeni list SFRJ, br. 22/63.

ANU
BiH
АНУ
БиХ

UTICAJ FARMACEUTSKOG OBLIKA NA KVALITET TERAPIJE

SABIRA HADŽOVIĆ, JELA MILIĆ-AŠKRABIĆ, AIDA MEHMEDAGIĆ, LJILJANA SAVKOVIĆ
Katedra za farmaceutsku tehnologiju Farmaceutskog fakulteta, Sarajevo

UDC 615.01

Apstrakt. U radu je dat prikaz nekih biofarmaceutskih faktora vezanih za vrstu farmaceutskog oblika lijeka za peroralnu primjenu koji mogu uticati na brzinu i količinu resorpcije, a time i na brzinu nastupanja, intenzitet i dužinu trajanja farmakodinamskog efekta.

Ključne riječi: vrsta farmaceutskog oblika, biofarmaceutski faktori, resorpcija, biološka raspoloživost.

UVOD

Racionalna farmakoterapija podrazumijeva primjenu optimalnog lijeka u adekvatnoj dozi kroz dovoljno dug vremenski period.

Uslovi za postizanje optimalne terapije su višestruki, a među najznačajnijim svrstavaju se oni vezani za bolesnika, za samu bolest, za lijek i za ljekara (1).

Za postizanje optimalnog farmakološkog efekta neophodno je odabrati adekvatan put davanja lijeka, odgovarajući farmceutski oblik i režim doziranja.

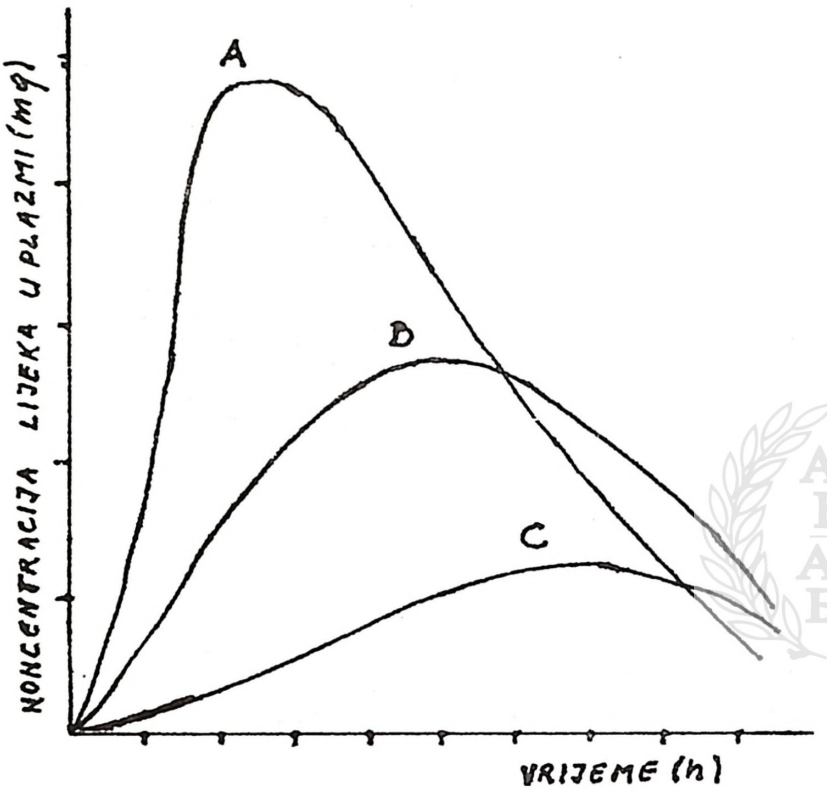
Poznavanje osnovnih svojstava lijeka (djelatne komponente) u pogledu terapeutske djelatvornosti, neželjenih djelovanja i farmaceutskog oblika lijeka, adekvatne doze i optimalnog trajanja liječenja veoma je značajno za efikasnost terapije.

Terapijski efekat lijeka ne zavisi isključivo od farmakološke aktivnosti, aktivne komponente njene čistoće ili tačnosti doziranja nego i od samog ljekovitog oblika, odnosno formulacije.

Lijek primljen u raznim farmaceutsko-tehnološkim oblicima ili različitim putevima davanja resorbovaće se u različitim količinama i različitim brzinama, što ima za posljedicu razlike u brzini nastupanja, intenzitetu i dužini trajanja farmakodinamskog ili klinčkog efekta. Za ilustraciju može poslužiti prikaz na slici 1.

Uzrok tome može biti jedan ili više od slijedećih faktora:

— fizičko-hemijska svojstva ljekovite supstance;
— upotrebljene pomoćne materije;
— tehnološki postupak;
— vrsta farmaceutskog preparata;
— način čuvanja, odnosno stabilnost.



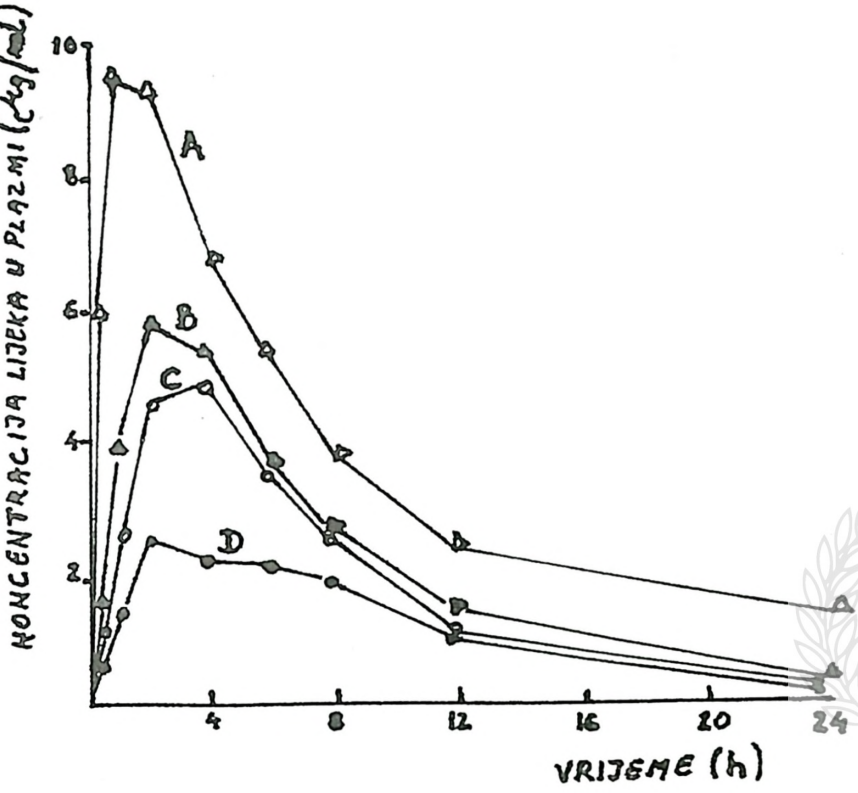
Slika 1. Promjena koncentracije istog lijeka prema vremenu, primjenjenog u istoj dozi u tri različita farmaceutska oblika
A — rastvor (p. o.), B — tableta, C — draže ja

Razlike u terapeutskom efektu odnosno djelotvornosti lijekova javljaju se i kod istovrsnih lijekova, tj. kod paralela s istom aktivnom supstancom u istom obliku (2). Kao ilustracija može poslužiti prikaz na slici 2.

Razlike se mogu pripisati biofarmaceutskim faktorima lijekova i biološkim faktorima bolesnika koji lijek primaju.

Ova saznanja promijenila su svrhu farmaceutskog oblikovanja lijekova tako da ono nije više prilagođeno samo načinu uzimanja i estetskom izgledu već brzini nastajanja, jačini i dužini trajanja farmakološkog djelovanja. Ova saznanja su pokazala da hemijsko standardizovanje lijekova nije više dovoljno za kontrolu kvaliteta lijeka, već je

potrebno lijek podvrgnuti biološkoj standardizaciji, odnosno biofarmaceutskim ispitivanjima, od kojih je za proizvođača najvažnije određivanje biološke raspoloživosti.



Slika 2. Promjena koncentracije istog lijeka (kloramfenikol) prema vremenu, primijenjenog u istoj dozi u istom farmaceutskom obliku (kapsule) od različitih proizvođača (A, B, C, D)

Biološka raspoloživost je isto tako važna za djelovanje lijeka kao i njegova farmakološka aktivnost, jer tek oboje su pretpostavka za puni terapeutski uspjeh.

Za procjenu djelotvornosti lijekova primjenjuju se različiti postupci za ispitivanje oslobađanja i apsorpcije. Ovi postupci mogu se svrstati u dvije grupe, in vitro testovi i in vivo testovi.

METODE IN VITRO ISPITIVANJA ZA ČVRSTE OBLIKE

In vitro ispitivanja kinetike oslobađanja služe, s jedne strane, za izbor najbolje formulacije za in vivo ispitivanja, a s druge strane, kao mogućnost za provjeru kvaliteta u toku proizvodnje ili ispitivanja stabilnosti u toku čuvanja.

Najčešće metode za in vitro ispitivanja za čvrste ljekovite oblike su:

ispitivanje brzine raspadanja;
ispitivanje rastvaranja;
ispitivanja apsorpcije.

METODE ISPITIVANJA IN VIVO

Određivanje biološke raspoloživosti

Kod određivanja biološke raspoloživosti koriste se dvije metode:

1. mjerenje koncentracije djelujuće supstance u krvi ili urinu nakon jednokratne ili višekratne primjene kod ljudi;
2. mjerenje farmakodinamskog ili biohemijskog efekta djelujuće supstance ili njenog aktivnog metabolita.

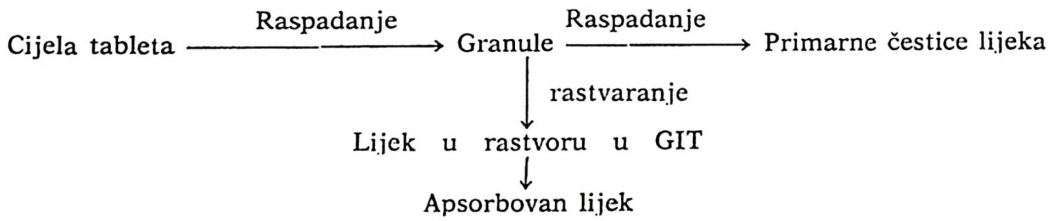
Faktori koji utiču na oslobađanje i apsorpciju lijeka iz čvrstih ljekovitih preparata

Za svaku ljekovitu supstancu mora se posebno odabrati farmaceutski oblik i način unošenja da bi djelovanje lijeka nastupilo odgovarajućom brzinom i trajalo dovoljno dugo.

Gruba procjena kod peroralnih preparata je pokazala da razlike mogu biti dva do pet puta, pa i veće u biološkoj raspoloživosti ili efikasnosti gastrointestinalne resorpcije u zavisnosti od primijenjenog ljekovitog oblika.

Poznato je da se resorpcija iz čvrstih ljekovitih preparata odvija znatno sporije nego iz tečnih preparata, što se smatra nedostatkom čvrstih oblika. Ovakvo ponašanje čvrstih ljekovitih preparata je posljedica različite brzine oslobađanja lijeka iz ljekovitog oblika i njegovog prelaza u biološke tečnosti.

Procesi oslobađanja (dezintegracija i rastvaranje) koji prethode procesu apsorpcije ljekovite supstance iz tablete mogu biti složeni, a shematski se mogu prikazati na sljedeći načinsl. 3.



Slika 3. Shematski prikaz oslobađanja lijeka iz tablete

Veliki problem kod primjene lijeka u obliku tablete predstavlja prevođenje lijeka u rastvor u gastrointestinalne tečnosti, jer proces granulacije i komprimovanja dovodi do velikog smanjenja efektivne površine aktivne supstance. Pravilan izbor i procjena pomoćnih materija

od posebnog su značaja s biofarmaceutskog aspekta, odnosno brzine oslobađanja lijeka, kao i s aspekta stabilnosti preparata. Tako npr. sredstva za dopunjavanje, sredstva za vezivanje, sredstva za raspadanje, sredstva za klizanje, antiadheziju, lubrikansi i dr., ako nisu dobro odabrani, odnosno ako nije prethodno provjerena njihova kompatibilnost s aktivnim supstancama i drugim komponentama koje ulaze u sastav tablete, mogu znatno uticati na brzinu oslobađanja, a time i terapeutski efekat.

Poznata je nepodnošljivost aminskih lijekova sa laktozom ili adsorpcija i kompleksiranje tetraciklinskih antibiotikia na aluminijum hidroksid, magnezijum oksid, magnezijum trisilikat i dr.

Tehnološki procesi izrade, više nego kod drugih oblika, mogu uticati na oslobađanje lijeka iz tableta.

Među značajne faktore koji utiču na oslobađanje lijeka, a vezani su za sam proces izrade tableta spadaju: vrsta i količina upotrebljenog sredstva za granuliranje, veličina granula, različiti postupci izrade granulata, izbor pritiska za komprimovanje, tip mašine za tabletiranje i dr.

Preparati sa produženim djelovanjem (preparati sa zadržanim oslobađanjem) predstavljaju savremenije oblike lijekova.

Većina standardnih (konvencionalnih) proizvoda lijekova je formulisana tako da se odmah oslobodi aktivna supstanca (lijek) da bi se postigla brza i potpuna apsorpcija lijeka.

Poslednjih godina razvijeni su različiti modifikovani preparati lijekova koji oslobađaju lijek usporeno (zadržano), a poželjno je da to bude oslobađanje čija se brzina može kontrolisati (3).

Preparatima s produženim djelovanjem mogu se u odnosu na konvencionalne oblike postići poželjne terapijske prednosti:

— smanjena učestalost doziranja, a time poboljšano prihvatanje od strane pacijenta;

— smanjenje oscilacije nivoa lijeka u krvi koje se javljaju kod višestrukog doziranja klasičnih oblika;

— mogućnost smanjenja ukupne količine datog lijeka;

— mogućnost bolje kontrole apsorpcije lijeka, odnosno izbjegavanje visokih nivoa lijeka koji se uočavaju nakon davanja konvencionalnih oblika visoke raspoloživosti;

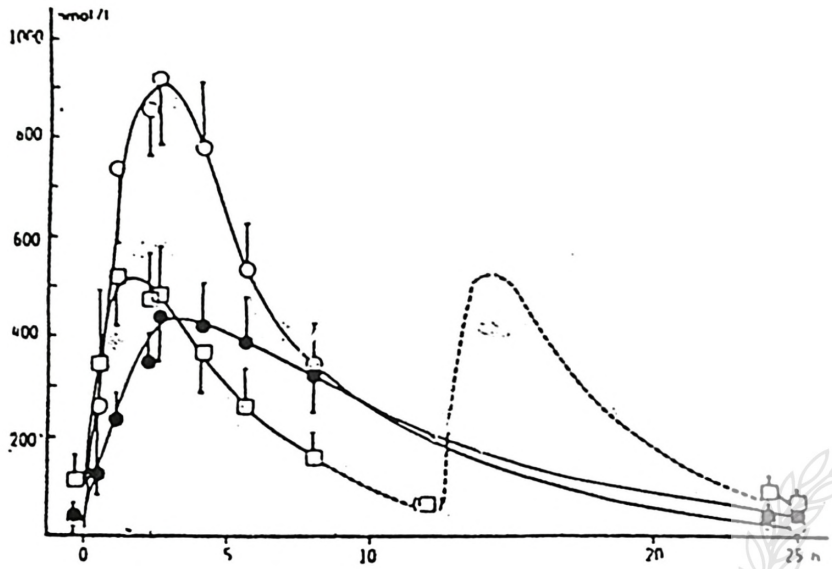
— povećanje granice sigurnosti kod lijekova s jakim djelovanjem;

— smanjenje učestalosti kako lokalnih tako i sistemskih sporednih djelovanja (4).

Kao ilustracija nekih od ovih prednosti, može poslužiti grafički prikaz nivoa lijeka u krvi posle davanja istog lijeka u obliku uobičajnih tableta i matriks tableta sa zadržanim oslobađanjem (sl. 4).

Razumljivo je da se moraju imati u vidu i nedostaci ove grupe preparata kao što su nemogućnost brzog prekida terapije kad je to potrebno, zatim manja fleksibilnost u formiranju režima doziranja koji skoro isključivo ovisi o upotrebljenoj formulaciji koja je oblikovana za normalnu populaciju.

Pri formulaciji preparata s produženim djelovanjem pred formulatora se postavlja niz problema kao što su količina (doza) lijeka, izbor odgovarajuće tehnike, odnosno postupka izrade koje je potrebno riješiti da bi lijek iz preparata bio resorbovan odnosno da bi se postigao terapeutski efekat.



Slika 4. Plazma koncentracija lijeka u ravnotežnom stanju poslije ponovljenog doziranja tablete lijeka sa zadržanim oslobađanjem (0,2g) jednom na dan (●), dvije konvencionalne tablete (0,1 g) jednom na dan (0), jedne konvencionalne tablete (0,1 g) svakih 12 h (□).

ANU BiH AHY

INFLUENCE OF PHARMACEUTICAL DOSAGE FORM ON QUALITY OF THERAPY

Summary

Some biopharmaceutical factors related to drug dosage form were presented. These factors might influence the rate and extent of absorpion, changing thus time of onset, intensity and duration of pharmacodynamic effect.

LITERATURA

(1) Vrhovac, E.: *Problemi racionalne farmakoterapije,* I Jugoslovenski simpozij o nuspojavama, Zbornik radova, Portorož, 1985.

(2) *Guidelines for Biopharmaceutical Studies in Man,* Washington D. C. Am. Pharm. Ass., Academy of Pharm. Sci. 1972.

(3) Glazko, A. J., Kinkel, A. W., Alegani, W. C., Holmes, E. L.: Clinical Pharmacontical Therapy, 9; 472, 1968.

(4) Kozjek, F., Mrhar, A., Karba, R.: Pharmaca 18; 63, 1980.

(5) Danilović, M., Stupar, M.: Arhiv za farm., XXVII; 347, 1977.

(6) Gibaldi, M.: *Biopharmaceutics and Clinical Pharmacokinetics,* 2nd edn., Lea and Fabiger, Philadelphia; 121, 1977.

(7) Lord, N. G.: *Sustained Release Dosage Forms,* u: Lachman, L.. Liberman H. A., Kanig, J. L. edts.: *The theory and practice of industrial pharmacy;* 430, 1986.

(8) Cunningham, Sloman, G., Nyberg, Nyberg, G.: Med. J. Aust., 1; 370, 1977.

(9) Forssell, G.: Eur. J. Clin. Pharmacol., 17; 209, 1980

(10) Kalowski, S., Radford, N., Kincaid-Smith, P.: N. Engl. J. Med, 240; 385, 1974.

(11) Borg, K. O., Jeppsson, J., Sjorgen, J.: Acta Pharm. Suec., 11; 133, 1974.

ANU BiH АНУ БиХ

ANU
BiH
АНУ
БиХ

ISPITIVANJE STRUKTURE METABOLITA ALPRENOLOLA METODOM GASNA HROMATOGRAFIJA — SPEKTROMETRIJA MASA

MELIHA LEKIĆ, LJILJANA KUDRA, MIROSLAV ŠOBER, BRANKO NIKOLIN
Institut za hemiju Medicinskog fakulteta, Sarajevo
Farmaceutski fakultet, Sarajevo

UDC 615.014

Apstrakt. Alprenolol, kao i većina beta-adrenergičnih blokatora, podliježe brzoj metaboličkoj transformaciji u humanom organizmu. Kao rezultat metaboličkih promjena alprenolola, do sada su u urinu identifikovani slijedeći metaboliti: 4-hidroksi-alprenolol, N-dezizopropil-alprenolol i odgovarajući glukuronidi (1).

U radu je prikazana identifikacija novog metabolita alprenolola, metoksi-hidroksi-alprenolola, koja je provedena priređivanjem derivata i ispitivanjem njihove strukture sa vezanim sistemom gasna hromatografija — spektrometrija masa.

Ključne riječi: alprenolol, metaboliti, gasna hromatografija — spektrometrija masa, identifikacija.

UVOD

Ispitivanje sudbine beta-adrenergičnih blokatora u humanom organizmu, praćenje njihovog metabolizma i njihovo određivanje u tjelesnim tečnostima neophodno je za pravilno doziranu terapijsku primjenu, ali i za kontrolu eventualne zloupotrebe. Većina beta-adrenergičnih blokatora se ekstenzivno metabolizira po tipu »prvog prolaza kroz jetru« (2), pri čemu nastaju neki farmakološki aktivni metaboliti (3). Značajno je da pri ovom tipu metabolizma znatno varira sadržaj beta-adrenergičnih blokatora i njihovih metabolita u tjelesnim tečnostima kod pojedinih osoba nakon uzimanja iste doze.

Za identifikaciju i određivanje beta-adrenergičnih blokatora najčešće se upotrebljavaju gasna hromatografija i hromatografija pod povišenim pritiskom, a za ispitivanje strukture metabolita gasna hromatografija — spektrometrija masa.

Tankoslojnom hromatografijom može se određivati pindolol u plazmi i urinu (4). Hromatografija pod visokim pritiskom uz upotrebu

Rad je finansiran sredstvima SIZ-a nauke BiH.

ultraljubičastog ili fluorescentnog detektora koristi se za određivanje propranolola (5), labetalola (6), metoprolola (7), sotalola (8) i njihovih metabolita.

Pri identifikaciji i određivanju pojedinih beta-adrenergičnih blokatora u biološkim uzorcima gasnom hromatografijom upotrebljavane su punjene i kapilarne kolone sa različitim stacionarnim fazama (9), uz upotrebu plameno-jonizacionog i elektron-apsorbujućeg detektora (10). Radi poboljšanja hromatografskih osobina, beta-adrenergični blokatori i njihovi metaboliti određivani su u urinu u obliku trifluoracetil- (11), heptafluorbutiril- i trimetilsilil-derivata (12).

Metabolizam beta-adrenergičnih blokatora vrlo intenzivno se proučava zahvaljujući razvoju spektrometrije masa i njenim povezivanjem sa gasnom hromatografijom uz primjenu brzih i moćnih računarskih sistema. Upotrebom ovakvog sistema provedeno je razdvajanje i određivanje strukture metabolita oksprenolola (9), metoprolola (13), timolola (12), alprenolola (1) i nadolola (14).

U ovom radu ispitani su ekstrakti urina zdravih osoba sakupljeni u vremenskim intervalima od 3, 6, 9 i 12 sati nakon jednokratne oralne doze od 50 mg alprenolol hidrohlorida (»Aptin«, SBS »Bosnalijek«) radi identifikacije prisutnih metabolita.

Radi dobivanja što boljih hromatografskih karakteristika, povećanja masa ispitivanih supstanci i dobivanja karakterističnih fragmenata na osnovu kojih je moguća brza i pouzdana identifikacija, provedena je selektivna derivatizacija ispitivanih supstanci. Dobiveni N-trifluoracetil, O-trimetilsilil derivati identificirani su na temelju analize karakterističnih fragmentnih jona dobivenih vezanim sistemom gasna hromatografija — spektrometrija masa na visoko selektivnoj kapilarnoj koloni.

MATERIJAL I METODE

Ekstrakcija

5 ml urina podvrgne se kiselinskoj hidrolizi sa HCl, 6 mol/dm^3 (»Kemika«) uz dodatak 50 mg cisteina (»Merck«) na 100°C u trajanju od 30 minuta. Nakon hlađenja na sobnoj temperaturi hidrolizatu se doda 5 ml etera (»Merck«) i dobro promućka. Eterski sloj se odbaci, a zaostala vodena faza neutralizira se sa KOH, koncentracije 12 mol/dm^3 (»Merck«). Podešavanje pH-vrijednosti na 9,6 postiže se dodatkom krutog pufera $NaHCO_3/Na_2CO_3$ u omjeru 2:1.

Ekstrakcija alprenolola i njegovih metabolita vrši se dodatkom 5 ml svježe destiliranog etera i ekstrahuje 10 minuta. Nakon centrifugiranja na 3000 obr/min. u trajanju od 5 minuta, eterski sloj se odvoji i upari u struji nitrogena na 45°C, a ostatak se suši u vakuum-eksikatoru sa P_2O_5 i KOH.

Derivatizacija

1. Priređivanje N, O-trifluoracetil derivata (N,O-TFA-derivati)

Na suhi eterski ekstrakt doda se 20 µl anhidrida trifluoracetatne kiseline (»Merck«) i grije 2 minute na 60°C. Smjesa se upari do suha, a ostatak se otopi u 100 µl etilacetata (»Merck«) i podvrgne analizi metodom gasna hromatografija — spektrometrija masa (GC-MS analizi).

2. Priređivanje N-trifluoracetil, O-trimetilsilil derivata (N-TFA,O-TMS — derivati)

Suhi eterski ekstrakt tretira se sa 10 µl MSTFA* (»Merck«) 2 minuta na 60°C, a zatim se doda 10 µl MBTFA** (»Merck«) i zagrijava 5 minuta na 80°C.

Dobiveni N-TFA,O-TMS — derivati ispitani su GC-MS metodom.

Identifikacija

Za određivanje strukture metabolita alprenolola korišten je vezani sistem gasni hromatograf DANI 3800 HR — dvostrukofokusirajući spektrometar masa VG 7070 E (VG ANALYTICAL) uz upotrebu računara DIGITAL PDP 8-a i PDP 11/23 (Digital Equipment Corporation).

Separacija metabolita provedena je na kapilarnoj koloni DB-1 dimenzija 25 m x 0,32 mm (John and Wihayl Scientific) uz protok helijuma kao gasa nosača od 2 ml/min. i temperaturu injektora od 260°C. Korišten je temperaturni program pećnice:

160°C/1 min. — (16°C/min.) — 290°C/8 min.

Injicirano je po 1 µl uzorka splitless-tehnikom. Jonizacija uzoraka provedena je udarom elektrona energije 70 eV na temperaturi od 200°C.

REZULTATI I DISKUSIJA

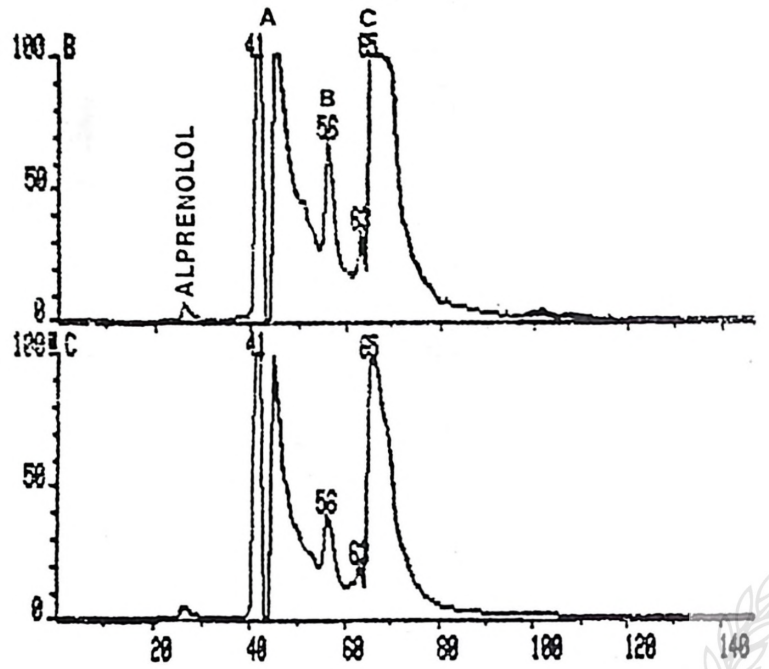
Ispitivanjem je utvrđeno da se alprenolol izlučuje putem urina uglavnom u formi metabolita i da je količina nemetaboliziranog alprenolola veoma mala i može da se identifikuje u urinu samo u prva tri sata nakon uzimanja jednokratne doze preparata (1). Pored već poznatih metabolita alprenolola: hidroksi-alprenolola i epihidroksi-alprenolola, u sakupljenim uzorcima urina identifikovali smo i novi metabolit alprenolola.

Na slici 1 prikazani su hromatogrami jonske struje fragmentnih jona m/z 266 i m/z 308, jona koji su signifikantni za N,O-TFA derivate beta adrenergičnih blokatora sa bočnim lancem koji sadrži izopropilnu grupu (15). Značajni hromatografski signali označeni su slovima A, B i C. Signali A i C odgovaraju N,O-TFA derivatima metabolita alprenolola poznate strukture hidroksi-alprenololu i epihidroksi-alprenololu.

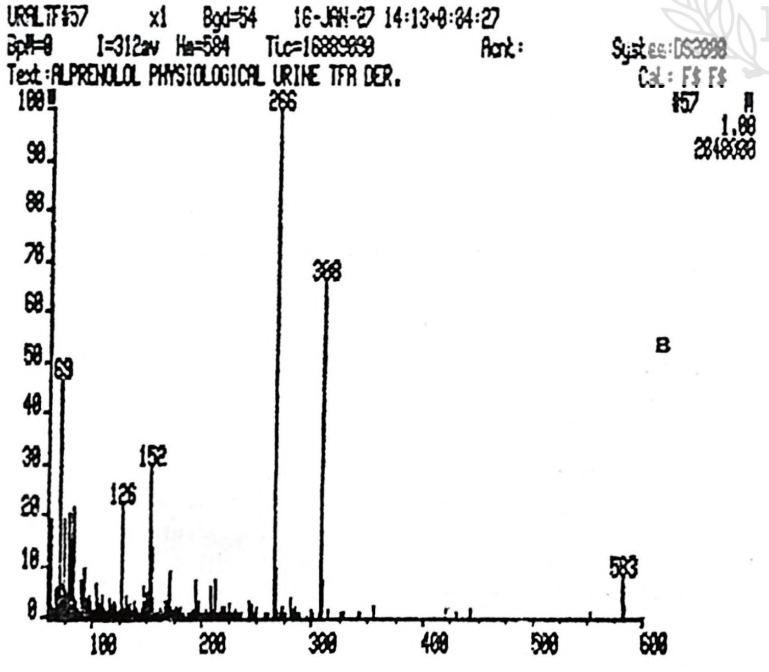
---

* MSTFA = N-metil-N-trimetilsilil-trifluoracetamid.

** MBTFA = N-metil-bis-trifluoracetamid.



Slika 1. Hromatogram jonskih struja jona m/z 266 i m/z 308



Slika 2. Spektogram masa N, O-TFA derivata koji odgovara hromatografskom signalu B

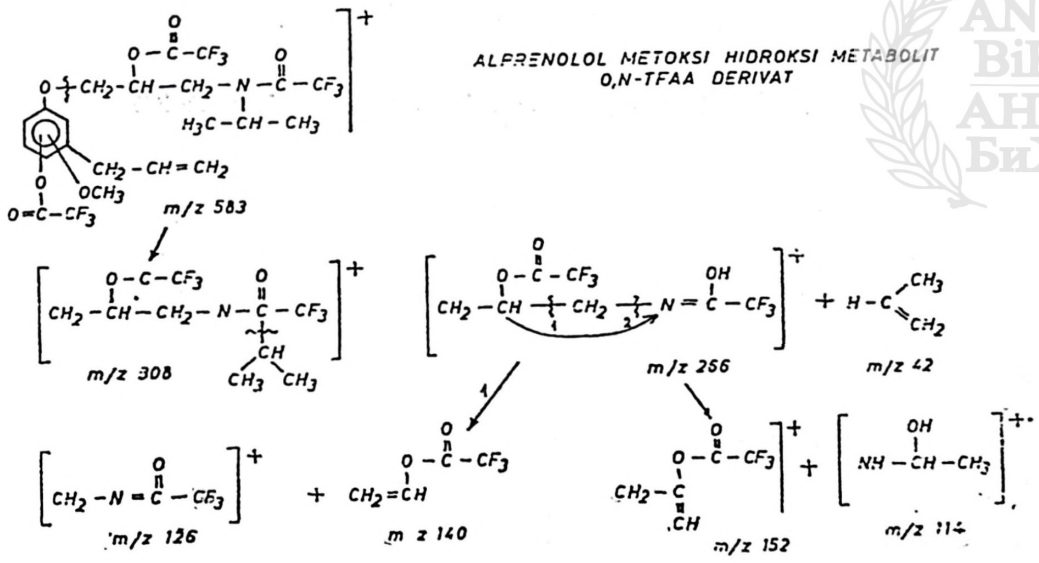
Cilj naših istraživanja bio je hromatografski signal B, za koji smo pretpostavili da pripada metabolitu alprenolola nepoznate strukture. Detaljnom analizom spektograma masa prikazanog na slici 2 i na osnovu do sada poznatih principa fragmentacije N,O-TFA-derivata ovog tipa beta-adrenergičnih blokatora pokušali smo riješiti strukturu ovog metabolita alprenolola.

Na spektrogramu masa jasno se uočavaju signali koji potiču od karakterističnih jona m/z 308 i m/z 266. Jon mase 308 nastaje odcjepljenjem bočnog lanca od molekulskog jona. Kao najintenzivniji javlja se signal na m/z 266 koji nastaje daljom fragmentacijom jona m/z 308 uz izdvajanje fragmenta m/z 42. Jon mase 266 podliježe daljem procesu cijepanja koji teče u dva pravca i kao rezultat toga nastaju fragmentni joni m/z 152 i m/z 126.

Kao važan signal u rješavanju strukture nepoznatog metabolita poslužio nam je signal koji se nalazi na kraju spektograma masa a potiče od molekulskog jona m/z 583.

Na osnovu ovih informacija pretpostavili smo da se radi o metoksi-hidroksi alprenololu.

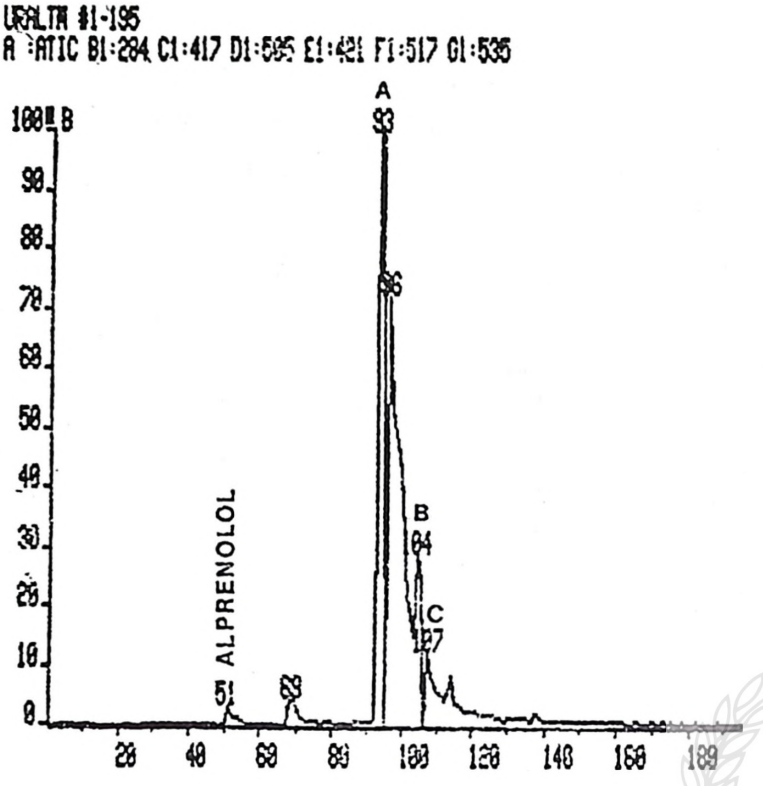
Na shemi 1. prikazana je fragmentacija N,O-TFA-derivata metabolita alprenolola pretpostavljene strukture.



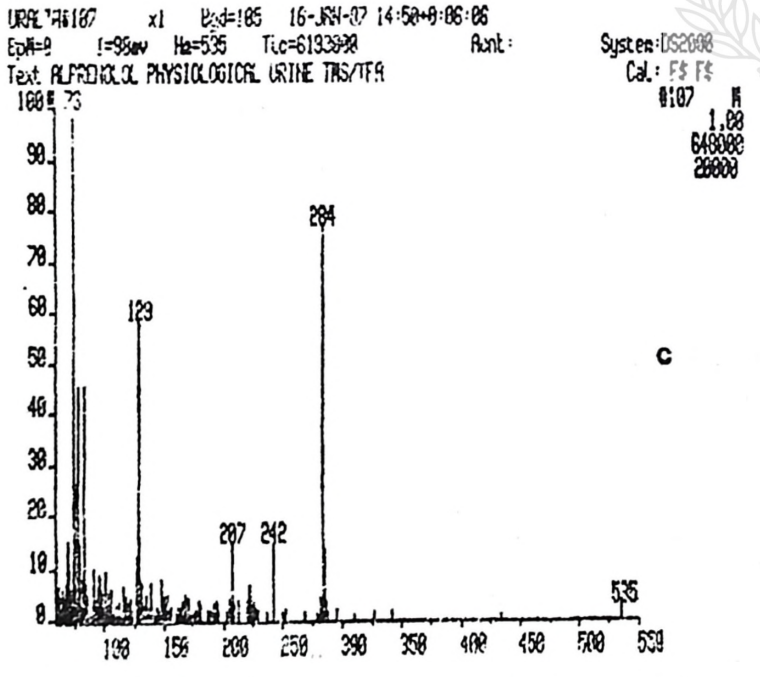
Shema 1. Fragmentacija N,O-TFA-derivata metabolita alprenolola pretpostavljene strukture

Da bi se pouzdano mogla riješiti struktura nepoznatog metabolita pristupilo se selektivnoj derivatizaciji ekstrakta urina sakupljenih u različitim vremenskim intervalima nakon uzimanja alprenolola. Detaljnom GC-MS analizom priređenih N-TFA,O-TMS-derivata došli smo do sljedećih zaključaka.

ANU BiH АНУ БиХ



Slika 3. Hromatogram jonske struje fragmentnog jonam/z 284

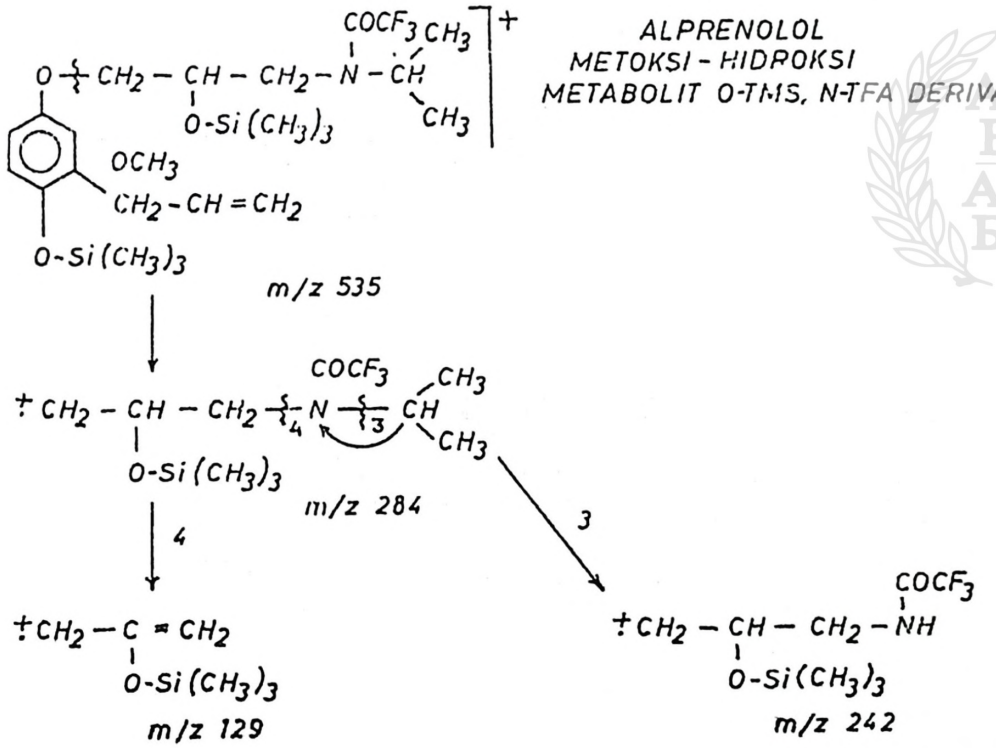


Slika 4. Spektogram masa hromatografskog signala C

Na slici 3. prikazan je hromatogram jonske struje fragmentnog jona m/z 284, koji je karakterističan za fragmentaciju N-TFA,O-TMS--derivata ovog tipa beta-andrenergičnih blokatora (16).

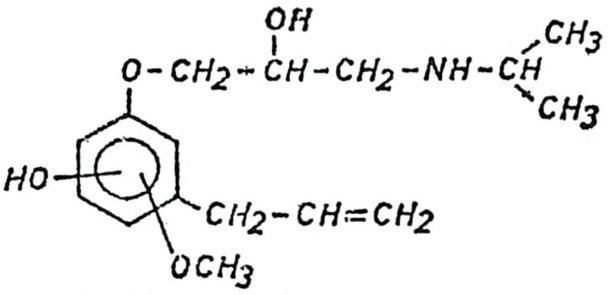
Na hromatogramu se jasno uočavaju signali koji potiču od nemetaboliziranog alprenolola i njegovih metabolita hidroksi-alprenolola i epihidroksi-alprenolola (signali A i B) i signal označen sa C, koji najvjerovatnije potiče od do sada neidentifikovanog metabolita alprenolola.

Na spektogramu masa hromatografskog signala C (slika 4) uočava se signal koji potiče od jona mase 284 a predstavlja ocjepljeni bočni lanac od molekulskog jona. Fragmentacija jona m/z 284 odvija se dalje u dva pravca i kao rezultat takvog cijepanja nastaju joni m/z 242 i m/z 129 koji se nalaze u spektrogramu masa hromatografskog signala C. Kao bazni signal prisutan je jon m/z 73, koji nastaje kao rezultat odcjepljenja trimetilsilil grupe. Na kraju spektograma masa jasno se uočava signal koji potiče od molekulskog jona m/z 535.



Shema 2. Fragmentacija N-TFA,O-TMS-derivata metabolita alprenolola pretpostavljene strukture

Analizom dobivenog spektograma masa i proučavanjem procesa fragmentacije N-trifluoracetil, O-trimetilsilil derivata ovog metabolita, prikazanog na shemi 2,potvrdili smo pretpostavku da se radi o metoksi-hidroksi alprenololu sljedeće strukture:



Slika 5. Metoksi-hidroksi alprenolol

ALPRENOLOL METABOLITES STRUCTURE STUDY BY USING THE METHOD OF GASS CHROMATOGRAPHY — MASS SPECTROMETRY

Summary

Alprenolole is subject to a fast metalobic transformation like other beta-blocking agents. Until now 4-hidroxy alprenolol and N-desizopropyl alprenolol are identified as products of such metabolic transformations.

In the paper identification of methoxy-hidroxy alprenolol, a new metabolite of alprenolol, perfomed by selective derivatization and GC-MS structure examination, is described.

LITERATURA

(1) Bodin, N. O.: *Identification of the Major Urinary Metabolite of Alprenolol in Man, Dog and Rat,* Life Sci., 1974, 14, 685—692.

(2) Grundin, R., Moldeus, P., Orrenius, S., Borg, K. O., Skanberg, I. and Bahr, C.: *The Possible Role of Cytohrom P-450 in the Liver »First-Pass Elimination« of a Beta-Receptor Blocking Drug,* Acta Pharmacol. Toxicol., 1974, 35, 242—260.

(3) Carlson, E.: *Cited by Regardh C. G. Pharmacokinetics and Biopharmaceutics of Some Adrenergic Beta-Receptor Antogonists, With Special Emphasis on Alprenolol and Metoprolol,* Acta Pharmac. Toxicol., 1975, 37 (1), 1—39.

(4) Spahn, H., Prinoth, M. and Mutschler, E.: *Determination of Pindolol in Plasma and Urine by Thin-Layer Chromatography,* J. Chromatog. (Biomed. Applic.), 1985, 342, 458—464.

(5) Koshakji, R. P. and Wood, A. J. J.: *Improved High-Performance Liquid Chromatographic Method for the Simultaneous Determination of Propranolol and 4-Hydroxypropranolol in Plasma with Fluorescence Detection,* J. Chromatog. (Biomed. Applic), 1987, 422, 294—300.

(6) Wang, J., Bonakdar, M. and Deshmukh, B. K.: *Measurment of Labetalol by High-Performance Liguid Chromatography with Electrochemical Detection,* J. Chromatog. (Biomed. Applic.), 1985, 344, 412—415.

(7) Pflugmann, G., Spahn, H. and Mutschler, E.: *Rapid Determination of the Enantiomers of Metoprolol, Oxprenolol and Propranolol in Urine*, J. Chromatog. (Biomed. Applic.), 1987, 416, 331—339.

(8) Bartek, M. J., Vekshteyn, M., Boarman, M. P. and Gallo, D. G.: *Liquid Chromatographic Determination of Sotalol in Plasma and Urine Employing Solid-Phase Extraction and Fluorescence Detection*, J. Chromatog. (Biomed. Applic.), 1987, 421, 309—318.

(9) Ervik, M., Kylberg-Hanssen, K. and Johansson, L.: *Determination of Metoprolol in Plasma and Urine Using High-Resolution Gas Chromatography and Electron-Capture Detection*, J. Chromatog. (Biomed. Applic.), 1986, 381, 168—174.

(10) Himber, J., Anderman, G., Bouzoubua, M. and Leclerc, G.: *Determination of Falintolol, a New Aliphatic Beta-Adrenergic Antagonist in Whole Blood by Gas Chromatography with Electron Capture Detection*, J. Chromatog. Sci., 1987, 25 (1), 33—37.

(11) Gyllenhaal, O., Konig, W. and Vessman, J.: *Enantiomer Separation of Metoprolol and its Analogues and Metabolites by Capillary Column Gas Chromatography After Derivatization with Phosgene*, J. Chromatog., 1985, 350, 328—331.

(12) Fourtillan, J. B., Lefebire, M. A., Girault, J. and Courtois, Ph.: *Mas Fragmentographic Determation of Timolol in Human Plasma and Urine*, J. Pharm. Sci., 1981, 70, 573—575.

(13) Hoffmann, K. J., Gyllenhaal, O. and Vessman, J.: *Analysis of α — Hydroxy Metabolites of Metoprolol in Human Urine after Phosgene Trimethylsilyl Derivatization*, Biomed. Mass. Spectrom., 1987, 14, 543—543.

(14) Ribick, M., Ivashkiv, E., Jemal, M. and Cohen, A. J.: *Use of an Inexpensive Mass-Selective Detector for the High-Sensitivity Gas Chromatographic Determination of Nadolol in Plasma*, J. Chromatog. (Biomed. Applic.), 1986, 381, 419—423.

(15) Walle, T.: *GLC Determination of Propranolol, Other β — Blocking Drugs, and Metabolites in Biological Fluids and Tissues*, J. Pharm. Sci., 1974, 63 (12), 1886—1891.

(16) Šober, M., Lekić, M., Nikolin, B.: *Ispitivanje lekovitih supstanci i njihovih metabolita u biološkom materijalu metodom gasna hromatografija-spektrometrija masa*, Pharmacia, 1988, 9 (1—2), 37—53.

ANU
BiH
АНУ
БиХ

SUBPOPULACIJA B- i T-LIMFOCITA i NK-STANICA (NKC-NATURAL KILLER CELLS; LGL-LARGE GRANULAR LYMPHOCYTES) U BOLESNIKA S INFEKCIOZNOM MONONUKLEOZOM

NIJAZ SOFTIĆ i TATJANA JEREN

Zavod za hematologiju Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta, Zagreb
Klinika za infektivne bolesti »Dr Fran Mihaljević«, Zagreb

UDC 616.988.51/.55

Apstrakt. Kod skupine od 54 bolesnika sa verificiranom dijagnozom infekciozne mononukleoze, u perifernoj krvi su utvrđivane vrijednosti leukocita, limfocita i atipičnih mononuklearnih stanica (AMNS) i vršeno je identificiranje i određivanje broja B-limfocita, T11, T4, T8 limfocita te velikih granuliranih limfocita (VGL; LGL-large granular lymphocytes), odnosno NK-stanica (natural killer cells) odgovarajućim imunološkim testovima.

Maksimalne vrijednosti leukocita periferne krvi ne prelaze cifru od 14 x 10^9/L, a bilježe se u prva tri tjedna bolesti. Limfociti i AMNS čine većinu stanica u diferencijalnoj leukocitnoj formuli. Njihove ukupne maksimalne vrijednosti kreću se do 88%, a najveće su u prva tri tjedna bolesti. Vrijednosti antitijela na VCA (viral capsid antigen) i antitijela na EBNA (Epstein-Barr nuclear antigen) u skladu su sa znanim podacima iz literature.

Testom direktne imunofluorescencije (polivalentna i monovalentna antiimunoglobulinska antitijela) utvrđeno je povećanje vrijednosti B-limfocita, koje je najizraženije u prvom tjednu bolesti. Najčešće su uvećane vrijednosti B-limfocita koji na svojoj membrani nose IgG+IgM+IgA, odnosno IgG+IgM. Uvećanje vrijednosti B-limfocita najvjerojatnije je odraz djelovanja EB virusa kao poliklonskog aktivatora B-stanica, što rezultira njihovom proliferacijom i diferenciranjem.

Testom indirektne imunofluorescencije upotrebom anti-T11, anti-T4 i anti-T8 monoklonskih antitijela, utvrđeno je povećanje vrijednosti T11 limfocita i izrazito uvećanje vrijednosti supresorskih/citotoksičnih T-limfocita (T8) kroz cijelo vrijeme trajanja bolesti. Uočava se i lagana tendencija uvećanja vrijednosti pomoćničkih T-limfocita (T4). Inficiranje B-limfocita EB virusom udruženo je sa intenzivnom imunostimulacijom te aktiviranjem i povećanjem vrijednosti T-limfocita, a prvenstveno onih sa citotoksičnom i supresorskom funkcijom (T8), koji su izgleda i primarno aktivirani. Tendencija laganog uvećanja vrijednosti pomoćničkih T-limfocita (T4) mogla bi biti odraz aktiviranja i te podvrste T-limfocita u akutnoj infekcioznoj mononukleozi.

U preparatima razmaza pune krvi i u preparatima razmaza izdvojenih limfocita te upotrebom monoklonskih NKH$_1$ antitijela utvrđeno je povećanje vrijednosti velikih granuliranih limfocita (VGL; LGL), odnosno NK-stanica, što je u skladu sa rezultatima i drugih istraživača. Povećanje srednjih vrijednosti NK-stanica najizraženije je između petnaestog i tridesetog dana bolesti. Intaktna funkcija NK-stanica preduvjet je za nor-

malnu zaštitu protiv herpes simplex virusa, pa bi se te stanice na sličan način mogle ponašati i protiv Epstein-Barr (EB) virusa. NK-stanice bi mogle djelovati same na EB virusom inficirane B-stanice ulazeći tako odmah u procese obrane, a zajedno sa aktiviranim citotoksičnim T-stanicama, djelovale bi na plazma stanice, čije je pojavljivanje rezultat virusom inducirane transformacije B-limfocita, i eliminirale ih. Supresorski T-limfociti bi ograničavali rast EB virusom inficiranih B-stanica djelujući antiproliferativno.

Ključne riječi: infektivna mononukleoza, subpopulacija B- i T-limfocita, NK-stanice.

UVOD

Infekciozna mononukleoza je uglavnom akutna i obično po toku i trajanju sama po sebi ograničena limfoproliferativna bolest, uzrokovana Epstein-Barr (EB) virusom.

Do nedavna se smatralo da u bolesnika s infekcioznom mononukleozom EB virus inficira primarno B-limfocite, koji za razliku od drugih stanica krvi izražavaju površinski receptor za taj virus. Ovaj receptor je identificiran kao komplement receptor tip 2 (CR2) za cijepanje C3d treće komponente komplementa (1, 2, 3). Međutim, nedavna istraživanja utvrdila su u bolesnika sa infekcioznom mononukleozom prisutnost EB virusa u epitelnim stanicama orofarinksa. Utvrđeno je također da epitelne stanice, osobito one manje diferencirane, izražavaju površinske receptore za C3d (4). Ove receptor molekule su također poznate u funkciji kao EB virus receptori (2). Orofarinks je, izgleda, uobičajeno mjesto početnog inficiranja EB virusom. Primarna ciljna stanica za infekt ne bi bio B-limfocit, nego epitelne stanice (5, 6) koje mogu vezati i brzo internalizirati EB virus (7). U epitelnim stanicama odvija se i replikacija virusa. Fizička blizina, koja postoji između epitelnih i limfoidnih stanica u farinksu, osigurava da B-limfociti budu na tom mjestu inficirani EB virusom. Migriranje virusom inficiranih B-limfocita u druge limfoidne organe rezultira generaliziranjem infekcije. Istraživanjima Sixbeya, Lemona i Paganoa (8) utvrđeno je da EB virus može biti izlučen iz uterinog cerviksa, što ukazuje na mogućnost infekcije veneričkim putem. EB virus se ponaša kao poliklonski aktivator B-stanica, što rezultira njihovom proliferacijom, diferenciranjem i secerniranjem imunoglobulina. Za kontrolu proliferacije B-stanica odgovoran je stanični imunitetni odgovor, čiji su nosioci T-limfociti. Stanoviti noviji istraživački podaci sugeriraju da bi NK-stanice (natutal killer cells) bile primarno odgovorne za kontrolu infekcije EB virusom (9).

S obzirom da u nastajanju i razvoju infekcije EB virusom sudjeluje kompleksni mehanizam, ispitivanja vršena u ovom radu odnosila su se na izučavanje subpopulacija B- i T-limfocita, podvrsta T-limfocita i populacije NK-stanica identificiranjem i praćenjem vrijednosti ovih stanica kod skupine bolesnika sa infekcioznom mononukleozom.

MATERIJAL — ISPITANICI

Ispitivanja su vršena kod skupine od 54 bolesnika s verificiranom dijagnozom infekciozne mononukleoze (tablica 1). Radilo se o 29 muških i 25 ženskih osoba u životnoj dobi od 5 do 42 godine. Kontrolnu skupinu sačinjavale su 23 odrasle zdrave osobe.

Tablica 1. ISPITIVANI BOLESNICI S INFEKCIOZNOM MONONUKLEOZOM

Ispitanici (n)	Spol		Životna dob — godine	Trajanje bolesti — dani						
	M	Ž		1—6	7—14	15—21	22—30	31—60	61—90	>90
Bolesnici										
54	29	25	5—42	12	10	8	5	10	3	6
Zdrave osobe										
23	10	13	20—23							

METODE

Vršena ispitivanja uključila su pretrage navedene u tablici 2. Kod svih ispitivanih bolesnika načinjene su osnovne kvanitativne i kvalitativne hematološke pretrage te dijagonostički i diferencijalno dijagnostički serološki testovi. Identificiranje i određivanje broja B-limfocita vršeno je testom direktne imunofluorescencije po metodi Grya, Holma, Blotha i Jolanda (10) upotrebom polivalentnih (anti-IgA+IgG+IgM) i monovalentnih (anti,IgA, anti-IgG, anti-IgM) antitijela. Identificiranje i određivanje broja ukupnih T-limfocita (T11), T-helper (T4 i T-suppressor/cytotoxic (T8) limfocita vršeno je testom indirektne imunofluorescencije upotrebom monoklonskih anti-T11, Anti-T4 i anti-T8 antitijela (Boehringer), a po metodi propisanoj od proizvođača. Identificiranje i određivanje vrijednosti velikih granuliranih limfocita (LGL — large granular lymphocytes) odnosno NK-stanica (natural killer cells) vršeno je u preparatima razmaza pune krvi i u preparatima izdvojenih limfocita metodom Kordić, Lukač, Silobrčić, Dekaris i Spaventi (11) te upotrebom 3B8 NKH_1 antitijela metodom Instituta Gustav-Roussy, Villejuif (Francuska).

Tablica 2. PRETRAGE VRŠENE KOD ISPITIVANIH BOLESNIKA I KONTROLNIH ZDRAVIH OSOBA

Pretrage	Vrsta pretrage
Kvantitativne i kvalitativne hematološke pretrage	Veliki hemogram uključujući diferencijalnu leukocitnu formulu na 200 staničnih elemenata u preparatima obojenim Pappenheimovom metodom
Serološki testovi na NBV	RVK, IFT: VCA (viral capsid antigen: IgM i IgG, EA (early antigen), EBNA (Epstein-Barr nuclear antigen), Monostikon test, RVK na EB virus, IF na EB virus

Diferencijalno-dijagnostički serološki testovi	1. CMV-RVK, Elise: IgM i IgG 2. Listerioza-aglutinacija 3. Tularemija-aglutinacija 4. Adenovirusne infekcije — RVK 5. Toksoplazma: Dye test, RVK, IFT — IgM i IgG, Elise test
Identificiranej i određivanje broja B limfocita	Test direktne imunofluorescencije sa polivalentnim (IgA + IgG + IgM) i sa monovalentnim (anti-IgA anti-IgG anti-IgM) antitijelima, Imunološki zavod, Zagreb
Identificiranje i određivanje broja T-limfocita (T11) i podvrsta T-limfocita (T4 i T8)	Identificiranje funkcionalnih podvrsta T-limfocita testom indirektne fluorescencije sa anti-T11, anti-T4 i anti-T8 monoklonskim antitijelima (Boehringer)
Identificiranje i određivanje broja VGL — velikih granularnih limfocita (LGL — large granular lymphocytes), odnosno NK-stanica (natural killer cells)	Identificiranje LGL — large granular lymphocytes a) u preparatima razmaza periferne krvi b) u preparatima načinjenim nakon izdvajanja limfocita na lymphoprepu. Identificiranje i određivanje broja NK-stanica pomoću NKH_1 (C3B) monoklonskih antitijela

REZULTATI

Vrijednosti leukocita ($x10^9/L$), vrijednosti limfocita (%) i atipičnih mononuklearnih stanica — AMNS (%) dobivene u ispitivanih bolesnika sa infekcioznom mononukleozom navedene su u tablici 3.

Maksimalne vrijednosti leukocita ne prelaze cifru od $14x10^9/L$. Najveće maksimalne vrijednosti leukocita bilježe se u prva tri tjedna bolesti. Limfociti i AMNS čine u prva tri tjedna bolesti 49,1% do 55,6% svih stanica s jezgrom u diferencijalnoj leukocitnoj formuli. Maksimalne vrijednosti ova dva tipa stanica u preparatima razmaza periferne krvi znatno su veće.

Dijagnoza je potvrđena imunofluorescentnim testom (IFT) na virus kapsidni antigen (VCA) Epstein-Barr virusa. Kod svih ispitivanih bolesnika IgG antitijela na VCA su povišena već u samom početku bolesti i tokom bolesti se mogu još povećati, a zatim se smanjuju i u niskom titru zadržavaju tokom cijelog života. IgM antitijela na VCA javljaju se već krajem prvog tjedna bolesti i zadržavaju se četvrtog do osmog tjedna bolesti. U nekih bolesnika ova se antitijela javljaju kasnije (»odgođeni« imunološki odgovor), ili u nekih ostaju negativna, vjerojatno zbog teškoća i velike osjetljivosti u izvođenju testa.

U 20 bolesnika uz antitijela na virus kapsidni antigen rađena su i antitijela na nuklearni antigen — EBNA (Epstein-Barr nuclear antigen), koja postaju pozitivna tek nakon tri tjedna bolesti i kasnije, a mogu ostati pozitivna doživotna. Kod naših ispitivanih bolesnika antitijela na EBNA javljala su se dosta kasno, češće nakon pet do šest tjedana.

Tablica 3. VRIJEDNOSTI LEUKOCITA, LIMFOCITA I ATIPIČNIH MONONUKLEARNIH STANICA U ISPITIVANIH BOLESNIKA

Bolesnici (n)	Trajanje bolesti (dani)	Vrijednosti leukocita x 10^9/L			Vrijednosti limfocita (Li) %			Vrijednosti atipičnih mononuklearnih stanica (AMNS) %			Li + AMNS %
		raspon	$\bar{x}$	s	raspon	$\bar{x}$	s	raspon	$\bar{x}$	s	
8	1— 6	5,3—12,4	7,9	2,7	19—55	30,9	14,4	11—36	20,7	8,9	51,6
11	7—14	4,1—10,5	7,3	2,2	26—59	37,0	9,5	12—29	18,6	5,8	55,6
8	15—21	6,4—14,0	10,4	2,9	20—40	27,5	8,1	16—27	21,6	4,3	49,1
4	22—30	5,9— 9,9	7,7	2,0	22—39	29,7	7,4	15—21	18,2	2,7	47,9
8	31—60	5,2—10,0	6,8	1,9	28—40	35,1	3,6	11—27	16,6	6,3	51,7
1	61—90		6,5			40,0			20,0		40,0
5	>90	6,0— 7,5	6,8	5,0	25—37	29,8	4,4	9—18	13,2	4,1	43,0
Ukupno 45*)											

*) Za devet bolesnika nepotpuni podaci.

Maksimalne vrijednosti limfocita i AMNS do 88%

Vrijednost B-limfocita u ispitivanih bolesnika prema danu trajanja bolesti prikazane su u tablici 4. Rezultati t-testa i Fisher-testa pokazuju da su u bolesnika, bez obzira na dužinu trajanja bolesti, vrijednosti B-limfocita značajno različite ($p = 0,05$) u odnosu na vrijednosti kod kontrolnih zdravih osoba. Kod 34 od ukupno 39 ispitivanih bolesnika, pojedinačne vrijednosti B-limfocita bile su veće od vrijednosti kod kontrolnih zdravih osoba. Kod skupine bolesnika sa trajanjem bolesti od jedan do šest dana srednje vrijednosti B-limfocita bile su veće od srednjih vrijednosti tih stanica u ostalih bolesnika s dužim intervalima trajanja bolesti. Na osnovi vrijednosti B-limfocita prema tipu imunoglobulina koje nose na svojoj membrani, uočljivo je da su najčešće uvećane vrijednosti B-limfocita koji nose IgG + + IgM + IgA, odnosno IgG + IgM.

Tablica 4. VRIJEDNOSTI B-LIMFOCITA U KONTROLNIH ZDRAVIH OSOBA I ISPITIVANIH BOLESNIKA PREMA TRAJANJU BOLESTI

Ispitanici (n)	Trajanje bolesti (dani)	Vrijednosti B-limfocita u %			Imunoglobulini na membrani B-limfocita	Broj bolesnika
		raspon	$\bar{x}$	s		
Bolesnici:						
8	1— 6	17—45	29,88*	9,42	IgG + IgM + IgA ↗	4
					IgG + IgM ↗	1
					IgG ↗	3
4	7—14	14—34	22,75*	8,38	IgG + IgM + IgA ↗	2
					IgG + IgM ↗	1
					IgG ↗	1
6	15—21	17—36	24,67*	6,62	IgG + IgM + IgA ↗	3
					IgG + IgM ↗	2
					IgG ↗	1
5	22—30	20—27	23,80*	2,59	IgG + IgM + IgA ↗	3
					IgG + IgM ↗	2
8	31—60	18—36	26,00*	6,16	IgG + IgM + IgA ↗	4
					IgG + IgM ↗	3
8	>60	18—38	26,63*	6,26	IgG + IgM + IgA ↗	2
					IgG + IgM ↗	2
					IgG ↗	3
Zdrave osobe:						
23	—	12—22	17,48	2,84	IgG $\bar{x}$ = 13,1%	
					IgM $\bar{x}$ = 12,6%	
					IgA $\bar{x}$ = 6,0%	

* — značajno ($p = 0,05$) u odnosu na kontrolne zdrave osobe

U tablici 5 navedene su vrijednosti T11, pomoćničkih (T-helper, T4) i supresorskih/citotoksičnih (T-suppressor/cytotoxic, T8) T-limfocita. U svih ispitivanih bolesnika utvrđena je značajna razlika ($p = 0,05$) vrijednosti T11 limfocita u odnosu na vrijednosti kod kontrolnih zdravih osoba. Vrijednosti pomoćničkih (TA) T-limfocita nisu značajno različite u odnosu na vrijednosti istih stanica u kontrolnih zdravih osoba, dok je razlika vrijednosti supresorskih/citotoksičnih (T8) T-limfocita značajna ($p = 0,05$) u odnosu na vrijednosti kod kontrolnih zdravih osoba.

Tablica 5. VRIJEDNOSTI T11, T4 i T8 STANICA U KONTROLNIH ZDRAVIH OSOBA I ISPITIVANIH BOLESNIKA

Ispitanici (n)		Vrijednosti T-stanica u % raspon	$\bar{x}$	s
Bolesnici 14	T11	54 — 82	72,50*	8,60
Zdrave osobe 10		50 — 74	64,80	7,15
Bolesnici 14	T4	38 — 52	45,14	4,45
Zdrave osobe 10		39 — 50	42,40	3,37
Bolesnici 14	T8	28 — 55	35,93*	8,65
Zdrave osobe 10		18 — 24	20,80	2,35

* — značajno ($p = 0,05$ u odnosu na kontrolne zdrave osobe.

Vrijednost NK-stanica (monoklonska antitijela NKH_1) i vrijednosti VGL (LGL) (preparat razmaza pune krvi, preparat razmaza i izdvojenih limfocita) navedene su u tablici 6. Rezultati analize varijance pokazuju da je razlika između vrijednosti NK-stanica u bolesnika i kontrolnih zdravih osoba značajna ($p = 0,05$) barem za jedan par podataka. Utvrđena je također značajna razlika ($p = 0,05$) vrijednosti velikih granuliranih limfocita (preparat razmaza izdvojenih limfocita) u bolesnika, u odnosu na kontrolne zdrave osobe. Vrijednosti VGL dobivene iz preparata razmaza pune krvi bitno se ne razlikuju od vrijednosti koje su dobivene iz razmaza izdvojenih limfocita.

Tablica 6. VRIJEDNOSTI NK-STANICA (NATURAL KILLER CELLS) U KONTROLNIH ZDRAVIH OSOBA I ISPITIVANIH BOLESNIKA

Ispitanici (n)	Metoda	Vrijednosti NK-stanica u % raspon	$\bar{x}$	s
Bolesnici 24	Test imunofluorescencije — 3B8 NKH_1 monoklonska antitijela	10 — 28	15,58*	5,50
Zdrave osobe 10	„	5 — 9	7,40	1,07
		Vrijednost VGL — velikih granuliranih limfocita (LGL — large granular lymphocytes) u %		
		raspon	$\bar{x}$	s
Bolesnici 15	Preparat razmaza nakon odvajanja limfocita na lymphoprepu	15 — 29	20,67*	5,29
Zdrave osobe 15	„	5 — 16	9,00	3,33

* — značajno ($p = 0,05$) u odnosu na kontrolne zdrave osobe.

U tablici 7 navedene su vrijednosti NK-stanica kod ispitivanih bolesnika svrstanih u tri skupine prema danu trajanja bolesti. Izvršeno je testiranje vrijednosti NK-stanica t-testom i F-testom za po dvije skupine od kojih jedna predstavlja zdrave kontrolne osobe a druga ispitivane bolesnike prema danu trajanja bolesti. Vrijednosti NK-stanica su kod bolesnika u sve tri skupine prema danima trajanja bolesti značajno različite ($p = 0,05$) u odnosu na vrijednosti kod kontrolnih zdravih osoba. Nakon provedenog testiranja za po dvije skupine ispitivanih bolesnika od kojih svaku karakterizira različito vrijeme trajanja bolesti, dobiveni podaci pokazuju da su vrijednosti NK-stanica u bolesnika kod kojih je bolest trajala od 15 do 30 dana značajno različite ($p = 0,05$) u odnosu na vrijednosti kod bolesnika sa trajanjem bolesti od 1 do 14 dana. U drugim slučajevima razlike nisu značajne.

Tablica 7. VRIJEDNOSTI NK-STANICA (NATURAL KILLER CELLS) U KONTROLNIH ZDRAVIH OSOBA I ISPITIVANIH BOLESNIKA PREMA TRAJANJU BOLESTI

Ispitanici (n)	Trajanje bolesti (dani)	Vrijednosti NK-stanica u %*)		
		raspon	$\bar{x}$	s
Bolesnici				
9	1 — 14	9 — 18	12,56*	3,09
4	15 — 30	14 — 30	20,25*	7,14
11	>30	10 — 28	16,36*	5,39
Zdrave osobe				
10	—	5 — 9	7,40	1,07

*) Test imunofluorescencije — monoklonska antitijela NKH
* — značajno ($p = 0,05$) u odnosu na kontrolne zdrave osobe.

DISKUSIJA

U bolesnika sa infekcioznom mononukleozom vrijednosti leukocita mogu biti normalne ili su umjereno povećane. U diferencijalnoj leukocitnoj formuli glavninu stanica čine limfociti i atipične mononuklearne stanice. Najizraženije uvećanje vrijednosit limfocita i atipičnih mononuklearnih stanica bilježi se u toku prva tri tjedna trajanja bolesti, ali te vrijednosti ostaju visoke sve do šezdesetog dana bolesti. Nalazi vrijednosti IgG i IgM antitijela na VCA odgovaraju znanim podacima iz literature što se odnosi i na vrijednosti antitijela na EBNA, s razlikom da ta antitijela kod nekih ispitivanih bolesnika češće postaju pozitivna nakon pet do šest tjedana trajanja bolesti.

Uvećanje vrijednosti B-limfocita bilježi se kod bolesnika bez obzira na dužinu trajanja bolesti, ali je ono najizraženije u prvom tjednu bolesti. I drugi su autori (12, 13, 14) utvrdili uvećanje vrijednosti B-limfocita u bolesnika sa infekcioznom mononukleozom, odnosno da se u ranim danima primarne EB virus infekcije povećavaju vrijednosti stanica koje secerniraju antitijela (15). Najčešće su uvećane vrijednosti B-limfocita koji na svojoj površini nose IgG + IgM + IgA odnosno

IgG + IgM. Novim ispitivanjima (16) utvrđeno je u bolesnika sa infekcioznom mononukleozom značajno uvećanje vrijednosti $CD5^+$ B-limfocita ($CD5^+$ B-stanica je ljudski homolog mišijim $Ly—1^+$ B-stanicama), koji su u uskoj vezi sa stvaranjem autoantitijela. Povećanje vrijednosti B-limfocita u bolesnika sa infekcioznom mononukleozom odraz je djelovanja EB virusa koji se ponaša kao poliklonski aktivator B-stanica, što općenito rezultira njihovom proliferacijom, diferenciranjem i sekrecijom imunoglobulina. Približno oko 48 sati nakon infekcije B-limfociti počinju proliferirati, a tri ili četiri dana kasnije može se utvrditi secerniranje imunoglobulna. Transformiranje B-stanica inficiranih EB virusom rezultira pojavljivanjem na površini stanice virusom determiniranih neoantigena, a samo inficiranje B-stanica EB virusom udruženo je sa intenzivnom imunostimulacijom. Iako se radi o jako izraženom humoralnom odgovoru, koji se manifestira stvaranjem brojnih za EB virus specifičnih antitijela (direktno protiv virus kapsidnog antigena, ranog antigena i EB nuklearnog antigena) (17), smatra se da je imunitetni stanični odgovor primarno odgovoran za kontrolu infekcije EB virusom (18).

Povećanje vrijednosti ukupnih T-limfocita (T11) i izrazito uvećanje vrijednosti supresorskih/citotoksičnih (T8) T-limfocita bilježi se kroz cijelo vrijeme bez obzira na dužinu trajanja bolesti. Uočava se i tendencija laganog uvećanja pomoćničkih (T4) T-limfocita, ali razlika u odnosu na vrijednosti ovih stanica kod kontrolnih zdravih osoba nije statistički značajna. Izrazito uvećanje vrijednosti supresorskih/citotoksičnih (T8) T-limfocita odraz je, izgleda, prvenstveno njihovog primarnog aktiviranja. Inficiranje B-stanica EB virusom udruženo je sa intenzivnom imunostimulacijom, a obilježje te stimulacije je aktiviranje i povećanje vrijednosti T-limfocita, a prvenstveno T-limfocita sa supresorskom i citotoksičnom funkcijom (17). Razvija se profileracija T-stanica koje su podvrgnute blastičnoj transformaciji, replikaciji i funkcionalnom diferenciranju u odgovoru na specifični EB virusom determinirani neoantigen. Efektorske T-stanice su specifične za B-limfocite inficirane EB virusom. Citotoksična aktivnost T-stanica najizraženija je u akutnoj fazi bolesti i postupno iščezava kod bolesnika u rekonvalescenciji (19). Efektorske T-stanice su specifične za B-limfocite inficirane EB virusom i sprečavaju njihovu proliferaciju.

Uočena tendencija laganog uvećanja vrijednosti pomoćničkih T-limfocita (što je potvrđeno višekratnim ponavljanim određivanjem vrijednosti) u odnosu na vrijednosti tih stanica kod kontrolnih zdravih osoba moglo bi se objasniti činjenicom da nije još potpuno razjašnjeno da li su pomoćnička i citotoksična aktivnost izražene od jedne podvrste aktiviranih pomoćničkih T-stanica, a supresorska i citotoksična aktivnost od jedne podvrste aktiviranih supresorskih T-stanica (13). Ispitivanja M i y a w a k i a i suradnika (20) pokazala su da su obje podvrste T-stanica, T4 i T8-stanice, stimulirane u bolesnika sa infekcioz-

nom mononukleozom. Pojavljivanje ovih dviju podvrsta T-stanica, od kojih obje izražavaju CD45RO (UHL1) antigen (CD45 je član obitelji zajedničkog leukocitnog antigena) u akutnoj fazi infekciozne mononukleoze podrazumijeva njihovu regulatorsku ulogu u kontroli EB virusom inficiranih stanica.

Supresorski i citotoksični T-limfociti djeluju, izgleda, u infekcioznoj mononukleozi u dva smjera ovisno o njihovoj funkciji: reagiraju sa inficiranim B-limfocitima potaknutim virusom na transformaciju i reagiraju sa transformiranim B-limfocitima, odnosno sa iz njih nastalim plazma stanicama. Aktiviranje efektorskih elemenata staničnog imuniteta odnosilo bi se prvenstveno na suppopulaciju supresorskih/citotoksičnih (T11) T-limfocita na populaciju NK-stanica, a, izgleda, i na subpopulaciju pomoćničkih (T4) T-limfocita.

Utvrđeno povećanje velikih granuliranih limfocita (VGL; LGL), odnosno NK-stanica u krvi ispitivanih bolesnika u skladu je sa zapažanjima i drugih autora (17, 21, 22). Povećane srednje vrijednosti NK-stanica u ispitivanih bolesnika u odnosu na vrijednosti kod kontrolnih zdravih osoba bilježe se u različitim intervalima trajanja bolesti, ali je povećanje vrijednosti tih stanica najizraženije između petnaestog i tridesetog dana bolesti. S obzirom da je intaktna funkcija NK-stanica preduvjet za normalnu zaštitu protiv herpes simplex virusa (23), razumljivo je da se one mogu ponašati na sličan način i protiv EB virusa. Izgleda da bi NK-stanice mogle same djelovati direktno na virusom inficirane B-stanice (ulazeći neposredno odmah u procese obrane od infekta), a zajedno sa citotoksičnim T-stanicama na plazma stanice koje nastaju procesom virusom inducirane transformacije B-limfocita.

Citotoksična funkcija T-stanica sposobna je da utječe na tok infekcije EB virusom in vivo (24). NK-stanice bi sudjelovale u pravcu eliminiranja virusom inficiranih B-stanica, a zajedno sa citotoksičnim T-limfocitima, djelovale bi na transformirane B-stanice (plazma stanice) ubijajući ih. Supresorske T-stanice bi ograničavale rast EB virusom inficiranih B-limfocita djelujući antiproliferativno. Budući da je ciljna stanica prije supresije B-stanica nedavno inficirana virusom, a ciljna stanica prije citotoksičnosti je B-stanica aktivirana EB virusom na proliferaciju i secerniranje imunoglobulina, supresivno i citotoksično djelovanje razlikovalo bi se s obzirom na stanje virusom inficirane B-stanice. Ova dva regulatorska mehanizma jedan drugog dopunjuju i tako osiguravaju kontrolu infekcije.

Tokom infekciozne mononukleoze, razvijanjem limfocitne reaktivnosti počinje takozvani »rat limfocita«. U »trupe« imunološke obrane uključeni su T-limfociti i NK-stanice (koje reagiraju sa stanicama u replikacijskom ciklusu od kojih su mnoge nelimfoidne), a njihova meta su stanice koje u replikacijskom ciklusu sadrže EB virus, latentno inficirani B-limfociti, a vjerojatno i sam EB virus. Vidljive manifestacije tog »rata limfocita« su hiperplazija limfocita, infiltracija organa i pojavljivanje atipičnih mononuklearnih stanica.

SUBPOPULATIONS OF B- AND T-LYMPHOCYTES AND NK (NATURAL KILLER) CELLS (LGL-LARGE GRANULAR LYMPHOCYTES) IN PATIENTS WITH INFECTIOUS MONONUCLEOSIS

Summary

In a group of 54 patients with verified diagnoses of infectious mononucleosis values of leukocytes, lymphocytes and atypical mononuclear cells (AMNC) in the peripheral blood were measured and the number of B-lymphocytes, T11 T4, T8-lymphocytes and large granular lymphocytes (LGL) and NK (natural killer) cells respectively identified and determined by appropriate immunological tests.

Maximal leukocyte values in the peripheral blood did not exceed 14 x x 10^9/1 and were recorded in the first three weeks of the disease. Lymphocytes and AMNC were predominating cells in the differential leukocyte formula. Their maximal values amounted up to 88 per cent and were largest in the first three weeks of the disease. The values of antibodies to VCA (viral capsid antigen) and of antibodies to EBNA (Epstein-Barr nuclear antigen) were in accord with data reported in the literature.

In direct immunofluorescence tests (polyvalent and monovalent anti-immunoglobulin antibodies) we found increased values of B-lymphocytes, whihch culminated in the first week of the disease. In most cases we recorded elevated values of B-lymphocytes which carried on their membranes IgG + IgM + IgA or IgG + IgM. The rise B-lymphocyte values was most likely due to the action of EB virus as polyclonal activator of B-cells resulting in their proliferation and differentiation.

In indirect immunofluorescence tests with use of anti-T11, anti-T4 and anti-T8 monoclonal antibodies we found increased T11-lymphocytes values and marked rise in the values of suppressor-cytotoxic T-lymphocytes (T8) throughout the entire duration of the disease. There was also a mild upward trend in the values of T-helper lymphocytes (T4). Infection of B-lymphocytes with EB virus was accompanied by intensive immunostimulation and the activation of, and increase in the values of, T-lymphocytes, in the first place of those with a cytotoxic and suppressor function (T8), which also seemed to have been primarily activated. The tendency of a light increase in T-helper lymphocytes (T4) values might have been the result of the activation of this subspecies of T-lymphocytes in acute infectious mononucleosis.

In the smears of whole blood and in the smears of separated lymphocytes, and with the use of monoclonal NKH1 antibodies, we found increased values of large granular lymphocytes (LGL) and NK (natural killer) cells, respectively, which tallies with the results reported by other researchers. The increase in the mean values of NK cells was greatest between the fifteenth and thirtieth days of the disease. An intact function of NK cells is a precondition for normal protection against herpes simplex virus, so that these cells would behave in a similar way also against Epstein-Barr (EB) virus. NK cells alone could directly act on EB virus-infected B-cells, thus immediately taking part in defence processes, and could together with activated cytotoxic T-celles act on the plasma cells whose appearance is the result of virus-induced transformation of B-lymphocytes and could eliminate them. T-suppressor lymphocytes would restrict the growth of EB virus-infected B-cells by acting antiproliferously.

LITERATURA

(1) Jondal, M. and Klein, G. (1973): *Surface markers on human B and T lymphocytes.* II. Presence of Epstein-Barr virus receptors on B lymphocytes. J. Exp. Med., 138:1365—1378.

(2) Fingeroth, J. D., Weis, J. J., Tedder, T. F., Strominger, J. L., Biro, P. A. and Fearon, D. T. (1984): *Epstein-Barr virus receptor of human B lymphocytes is the C3d receptor CR2.* Proc. Natl. Acad. Sci. (USA), 81:4510—4515.

(3) Frade, R., Barel, M., Ehlin-Hendrikkson, B. and Klein, G. (1985): *Gp 140 the C3d receptor of human B lymphocytes, is also the Epstein-Barr virus receptor.* Proc. Natl. Acad. Sci. (USA), 82:1490—1493.

(4) Young, L. S., Sixbey, J. W., Clark, D. and Rickinson, A. B. (1986): *Epstein-Barr virus receptors on human pharingeal epithelia.* Lancet., 1:240—242.

(5) Sixbey, J. W., Vesterinen, E. A., Nedrud, J. G., Raab-Traub, N., Walton, L. A. and Pagano, J. S. (1983): *Replication of Epstein-Barr virus in human epithelial cells infected in vitro.* Nature, 306:480—489.

(6) Sixbey, J. W., Nedrud, J. G., Raab-Traub, N., Hanes, R. A. and Pagano, J. S. (1984): *Epstein-Barr virus replication in oropharyngeal epithelial cells.* N. Engl. J. Med., 310:1225—1230.

(7) Sixbey, J. W., Davis, D. S., Young, L. S., Hutt-Fletcher, L., Tedder, T. T. and Rickinson, A. B. (1987): *Human epithelial cell expression of an Epstein-Barr virus receptor.* J. Gen. Virolog., 68:805—811.

(8) Sixbey, J. W., Lemon, S. M. and Pagano, J. S. (1986): *A second site for Epstein-Barr virus shedding: The uterin cervix.* Lancet, 2:1122—1124.

(9) Klein, E., Ernberg, I., Masucci, M. G., Szigeti, R., Wu, Y. T., Masucci, G. and Svedmyr, E, (1981): *T-cell reponse to B-cells and Epstein-Barr virus antigens in infectious mononucleosis,* Cancer Res., 41: :4210—4215.

(10) Softić, N. (1988): *Hematološke laboratorijske pretrage,* Sveučilišna naklada Liber, Zagreb, str. 322.

(11) Kordić, D., Lukač, J., Silobrčić, V., Spaventi, Š., Dekaris, D. (1986):*Simple enumeration of large granular lymphocytes.* Periodicum Biologorum, 88:248—249. (Supp. 1).

(12) Sheldon, P. J., Papamichail, M., Hemsted, E. H. and Holborow, E. J. (1973): *Thymic origin of atipical lymphoid cells in infectious mononucleosis.* Lancet, 1:1153—115.

(13) Papamichail, M., Sheldon, P. J. and Holborow, E. J. (1974): *T and B cell subbpopulation in infectious mononucleosis,* Clin. Exp. Immunol., 18:1—11.

(14) *Leavell and Thhhorup's (Thorup, O. A. Jr.) Fundamentals of Clinical Haematology* (1987). W. B. Sannders Company, Phyladelphia-London-Thoronto, Fifth Ed., str. 72; 469.

(15) Tosato, G., Magrath, I., Koski, I., Dolly, N. and Blaese, M. (1979): *Activation of suppressor T-cells during Epstein-Barr virus-induced infectious mononucleosis.* N. Engl. J. Med., 301:1133—1137.

(16) Hassan, J., Feighery, C., Bresnihan, B., Whelan, A. (1990): *Increased CDS+B cells in patients with infectious mononucleosis.* Brit. J. Haematology, 74:375—376.

(17) Tomkinson, B. E., Maziarz, R., Sullivan, J. L. (1989): *Characterisation of the T cell-mediated cellular cytotoxicity during acute infectious mononucleosis,* J. Immunol., 143:660—670.

(18) Rickinson, A. B. (1986): *Cellular immunological response to the virus infection. In the Epstein-Barr virus.* Epstein, M. A. and Achong, B. G., eds. John Willey and Sons, New-York, str. 75.

(19) Brewster, F. E., Byron, K. S. and Sullivan, J. L. (1985): *Immunoregulation during acute infection with Epstein-Barr virus: Dynamics of interferon and 2'5'-oligoadenylate sinthetase activity.* J. Infect. Dis., 151: 1109—1115.

(20) Miyawaki, T., Kasahara, Y., Kanegane, H., Ohta, K., Yachie, A. and Taniguchi, N. (1991): *Expression of CD45RO(UCHLI) by CHD+ and CD+ T cells as a sign of in vivo activation in infectious mononucleosis,* Clin. Exp. Immunol., 83:447—451.

(21) Tomkinson, B. E., Wagner, D. K., Nelson, D. L. and Sullivan, J. L. (1987): *Activated lymphocytes during acute Epstein-Barr virus infection* J. Immunol., 139:3802—3807.

(22) Williams, M. L., Loughran, P. Jr., Kidd, P. G. and Starkebaum, G. A. (1989): *Polyclonal proliferation of activated suppressor/cytotoxic T cells with transient depression of natural killer cell function in acute infectious mononucleosis,* Clin. Exp. Immunol., 77:71—76.

(23) Lopez, C. (1984): *Natural resistance mechanisms against herpes virus in health and disease, in Rouse,* B. T., Lopez, C. (eds): *Immunobiology of Herpes Simplex Infections,* Boca Raton, F. L. CRC Press, str. 45—64.

(24) Tosato, G. (1989): *Cell-mediated immunity,* in Schlossberg, D.: *Infectious mononucleosis,* Eds. Springer Verlag, str. 100—116.

ANU BiH АНУ БиХ

ANU
BiH
АНУ
БиХ

SADRŽAJ

Strana

J. A. Gaon, R. Mulić, V. Ilisić, B. S. Telebak

Virusni hepatitisi u Jugoslaviji sa posebnim osvrtom na stanje u SRBiH i na nova otkrića iz ove oblasti / Viral Hepatitis in Yugoslavia — with Special Review of the Situation in the Republic of Bosnia and Herzegovina and the New Discoveries Regarding this Disease 5

Seid Huković, Sreten Bošković, Iris Rajman, Nedim Huković i Elvedina Kapić

Performansa izolovanog humanog uretera kao model-sistem za ispitivanje neurotransmisije i njene modulacije / The Performances of the Electrically Stimulated Isolated Human Ureter as Model-System for the Investigation of Neuromuscular Transmission 25

Aleksandar Nikulin i Svjetlana Radović

Razrada morfoloških kriterija za dijagnosticiranje displastičnih promjena u sluznici debelog crijeva / The Elaboration of the Morphological Criteria for Determination of the Dysplastic Changes in Mucous Membrane of the Colon 33

Adila Filipović, Džemal Rezaković

Sociomedicinski problemi ishrane u trećoj životnoj dobi / Sociomedical Problems of Nourishment in the Third Age of Life 45

Hasna Mesihović, S. Dinarević, Z. Rončević, H. Čengić

Kompleksna disritmija i kardiomiopatije dojenčeta / Complex Dysrhitmia and Cardiomyopathiae of Infant 59

Lutvo Hodžić

Uticaj metaboličkih poremećaja na tok i ishod proljevne dehidracione toksikoze dojenčadi / The Influence of Metabolic Changes on the Course and Outcome of Enterolitic Dehydratation Toxicosis of Infants 69

Zlata Kundurović

Udio melatonina u usmjeravanju ultrastrukturnih promjena tireocita epifizektomisanih i ozračenih pacova / Share of Melatonin in Directing of Ultrastructural Thyreocyte Changes of Epiphyzecotomised and X-Irradiated Rats 83

Ivo Ruszkowski, Osman Muftić, Tomo Pavić

Mehanička teorija kauzalne histogeneze kao podloga tumačenja osifikacije pri distrakciji kosti / Mechanical Theory of Causal Histogenesis as a Base of the Explanation of Ossification with Distraction of Bones 95

ANU BiH АНУ БиХ

Franc Srakar Strana

Iskustva i problemi kod produžavanja ekstremiteta na Univerzitetskoj ortopedskoj klinici u Ljubljani / Experiences and Problems with Extremity Lengthening at the University Orthopedic Clinic in Ljubljana 103

Nikola Milićević

Metoda Ilizarova — osobenosti tehnike i mogućnost primjene / Ilizarov's Technique for Lengthening of Limbs and Its Applicatibility . 111

Božo Ljubić, Mihajlo Milašević, Zdravko Trolić

Elongacija ekstremiteta kod kongenitalnih i razvojnih anomalija / The Lengthening of Extremities in Congenital and Developmental Anomalies 125

Nikola Milićević, Safet Ćibo

Modeliranje i prolongacija potkoljenice primjenom metode Ilizarova / Thickening of the Tibia by Using the Ilizarov Method 137

Zdravko Trolić, Nikola Milićević

Elongacija donjih ekstremiteta metodom epifizarne distrakcije / Elongation des membres inferièurs par distraction épiphysometaphisaire 145

Dragomir Stanković

Metode toksikologije in vitro u procjeni rizika za čovjeka i njegovu okolinu u ekotoksikološkom monitoringu 151

Seid Huković i Nedim Huković

Alternativne motode za istraživanje na životinjama u ispitivanju ksenobiotika i ekotoksina sa posebnim osvrtom na izolirane organe / Alternatives to Animal Experiments in Risk Assessment of Xenobiotics and Ecotoxins Using Isolated Organs 155

Ladislav Ožegović

Metode ispitivanja mikotoksikoza u ekotoksikologiji / Methods of Investigation of Mycotoxicoses in Ecotoxicology 163

Marija Keser-Stanković

Istraživanje djelovanja teških metala na membranski i akcioni potencijal / The Estimation of Effects of Heavy Metals on Membrane and Action Potential 177

Marija Keser-Stanković, Dragan Stanković

Ekotoksikološka istraživanja djelovanja interakcije teških metala sa antidotima na neuromišićnu transmisiju / Ecotoxicologic Investigation of Interaction of Lead and Antidots on Neuromuscular Transmission 185

Marija Keser-Stanković, Danica Hlača, Dragan Stanković

Procjena rizika ekspozicije metalima na tkivima embriona kokošijeg jajeta i kulturi ćelija u ekotoksikologiji / The Risk Assessment of Exposition to Heavy Metals on Cells of Chicken Embryo and Tissue Cultures in Ecotoxicology 191

Jasna Đuričić Strana

Ekotoksikološko ispitivanje rizika od inhaliranih para lakih i teških benzina kao i trihloretilena u toku gestacije / Ecotoxicological Risc Investigation of Inhaled Light and Heavy Benzine Vapours as Well as Trichloroethylene in the Course of Gestation 203

Elvedina Kapić

Toksikološke metode ispitivanja na izolovanim organima prepariranim iz usne šupljine / Pharmacological Methods in Toxicology on the Isolated Innervated Organs from the Mouth 213

Iris Rajman, Boris Vujović i Seid Huković

Djelovanje ekotoksina na izolovani inervirani humani ureter / Effects of the Toxins on the Isolated Innervated Human Ureter 219

Branko Nikolin, Miroslav Šober, Milan Tomljenović, Meliha Lekić, Igor Davor Gaon

Identifikacija organskih supstanci u atmosferi grada Zenice metodom gasna hromatografija — spektrometrija masa / Organic Substances Identification in the Atmosphere of the City of Zenica Using the Method of Chromatography — Mass Spectrometry 225

Koviljka Stojkov

Primjena metode hromatografske identifikacije lipidnih komponenata tkiva u ekotoksikologiji / Application of the Method of Chromatographic Identification of Lipid Components of Tissue in Ecotoxicology 233

Jela Grujić-Vasić

Uvodne napomene o kvalitetu lijekova 243

Seid Huković i Dubravka Potkonjak

Kvalitet u istraživanju lijekova / The Quality of Drug Investigation . 247

Seid Huković, Nedžad Mulabegović, Elvedina Kapić, Iris Rajman, Biljana Ivković i Nedim Huković

Autobioesej u kontroli kvaliteta lijekova / Autobioassay in the Quality Control of Drugs 253

Jela Grujić-Vasić, Tamara Bosnić, Salko Ramić, Sejfudin Tokić, Sulejman Redžić

Kvantitativno određivanje tanina u biljkama sa područja Bosne i Hercegovine / Quantitative Determination of Tannins in Plants of Bosnia and Herzegovina 261

Anton Štalc

Specifične osobine lekova dobivene rekombinantnom DNA-tehnologijom / Specific Properties of the Drugs Produced by DNA-Recombinant Biotechnology 269

Milan Škrlj

Dobra laboratorijska praksa kao proces za obezbeđenje pouzdanih podataka kod ispitivanja hemikalija / Good Laboratory Practice, a Process to Assure Reliable Data in the Testing of Chemicals . . . 277

ANU BiH АНУ БіХ

Slavko Marković i Dženana Tatarević Strana

Obezbjeđenje kvaliteta lijekova — stanje u farmaceutskoj industriji Jugoslavije u odnosu na zahtjeve Svjetske zdravstvene organizacije / Quality Assurance for Drugs — Yugoslav Pharmaceutical Industry Situation in Relation to WHO Requirements 285

Biljana Ivković

Aditivi u lijekovima i kvalitet lijekova / Additives in Drugs and Drug Quality 291

Sabira Hadžović, Jela Milić-Aškrabić, Aida Mehmedagić, Ljiljana Savković

Uticaj farmaceutskog oblika na kvalitet terapije / Influence of Pharmaceutical Dosage Form on Quality of Therapy 299

Meliha Lekić, Ljiljana Kudra, Miroslav Sober, Branko Nikolin

Ispitivanje strukture metabolita alprenolola metodom gasna hromatografija — spektrometrija masa / Alprenolol Metabolites Structure Study by Using the Method of Gass Chromatography — Mass Spectrometry 307

Nijaz Softić i Tatjana Jeren

Subpopulacija B- i T-limfocita i NK-stanica (NKC-natural killer cells; LGL-large granular lymphocytes) u bolesnika s infekcioznom mononukleozom / Subpopulations of B- and T-Limphocytes and NK (Natural Killer) Cells (LGL — Large Granular Lymphocytes) in Patients with Infectious Mononucleosis 317

ANU BiH АНУ БиХ

ANU
BiH
АНУ
БиХ

Štampa: DP »DES« Sarajevo
Za štampariju: Kolundžić Lazar