



УНИВЕРЗИТЕТ У КРАГУЈЕВЦУ
ФАКУЛТЕТ МЕДИЦИНСКИХ НАУКА

Јован Јовановић

**Клиничка и генетска анализа хепатотоксичности узроковане
амјодароном код хоспитализованих пацијената**

Докторска дисертација

Ментор: др сци. мед. Драган Миловановић, редовни професор

Крагујевац, 2019. Године

ИДЕТИФИКАЦИОНА СТРАНИЦА ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ

<i>I Аутор</i>
Име и презиме: Јован Јовановић
Датум и место рођења: 19.01.1987.г., Београд
Садашње запослење: Клиника за кардиологију, КЦ Крагујевац
<i>II Докторска дисертација</i>
Наслов: Клиничка и генетска анализа хепатотоксичности узроковане амјодароном код хоспитализованих пацијената
Број страница: 128
Број слика: 79
Број библиографских података: 5
Установа и место где је рад израђен: Клиника за кардиологију, КЦ Крагујевац
Научна област (УДК): Кардиологија
Ментор: проф. др сци.мед Драган Миловановић
<i>III Оцена и одбрана</i>
Датум пријаве теме: 20.05. 2015.г.
Број одлуке и датум прихватања теме докторске дисертације: Број:IV-03- 526/32; Датум: 07.10.2015. г.
Комисија за оцену научне заснованости теме и испуњености услова кандидата: <ol style="list-style-type: none">1. Проф.др Жељко Мијаиловић, ванредни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Инфективне болести, председник ;2. Проф.др Александар Нагорни, редовни професор Медицинског факултета Универзитета у Нишу за ужу научну област Интерна медицина, члан;3. Проф.др Владимир Милорадовић, ванредни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Интерна медицина, члан.
Комисија за оцену и одбрану докторске/уметничке дисертације: <ol style="list-style-type: none">1. Проф.др Владимир Милорадовић, редовни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Интерна медицина, председник;2. Проф.др Наташа Ђорђевић, ванредни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Фармакологија и токсикологија, члан;3. Проф. др Биљана Радовановић Динић, ванредни професор Медицинског факултета Универзитета у Нишу за ужу научну област Интерна медицина, члан.
Датум одбране дисертације:

САЖЕТАК

Акутна хепатотоксичност је један од највећих проблема фармаковигиланце. Дијагноза овог нежељеног дејства би требало да се заснива на клиничким критеријумима али и на детекцији специфичних биомаркера хепатоцелуларног и/или холестатског оштећења. Неколико студија је доказало повезаност токсичних ефеката амјодарона и активности супероксид дизмутазе (SOD). Истраживање је спроведено у два дела. Један је био проспективна контролисана студија, дизајнирана према кохорти болесника који имају хепатотоксичност и примају амјодарон и други, који је обухватио ретроспективно прикупљање података и последичну анализу са два опсервациона дизајна, студије типа „случај-контрола“ (појава хепатотоксичности) и кохортне студије (изложеност фактору ризика-амјодарону). Истраживање је било спроведено у Клиници за кардиологију, према етичким принципима научно-истраживачког рада. Ретроспективну популацију су чинили пацијенти који су лечени у клиници у протеклих десет година. Подаци су били прикупљени увидом у историје болести. За проспективну, контролисану студију користити су се узорци крви болесника који се лече на клиници, одређивани су биомаркери хепатотоксичног оштећења и генетски полиморфизам SOD2. Током проспективне, контролисане студије коришћени су детаљни подаци неинвазивне клиничке дијагностике која је од значаја за варијабле истраживања. Статистичка анализа прикупљених података је обухватила прорачун величине узорка и статистичку обраду. Примарне независне варијабле су биле: присуство Val16Ala полиморфизма (rs4880) SOD2, у проспективној студији и узимање амјодарона, у ретроспективној кохорти. Примарна зависна варијабла је било присуство хепатотоксичности. С обзиром да су подаци у доступној литератури за дату популацију оскудни и контроверзни, резултати представљају оригинални допринос у области расветљавања механизма и значаја хепатотоксичности удружене са употребом амјодарона код хоспитализованих болесника.

Кључне речи: хепатотоксичност, амјодарон, биолошки маркери, супероксид дизмутаза, фактори ризика, прогностички значај

ABSTRACT

Acute hepatotoxicity represents nowadays one of the greatest problems in pharmacovigilance. The diagnosis of this adverse reaction should be based on clinical criteria as well as on the detection of specific biomarkers of hepatocellular and / or cholestatic damage. Several studies have demonstrated the correlation of toxic effects of amiodarone and the activity of superoxide dismutase (SOD). The research consisted of two parts. One was a prospective controlled study, designed according to the cohort of patients with hepatotoxicity and receiving amiodarone and the other, which included retrospective data collection and consequent analysis with two observational designs, case-control study (hepatotoxicity) and cohort study (exposure to risk factor-amiodarone). The research was conducted at the Clinic for Cardiology, according to the ethical principles of scientific research. The retrospective population consisted of patients who have been treated in the Clinic for the past ten years. The data were collected by screening the medical records of the patients. For a prospective, controlled study, blood samples of patients who are being hospitalized at the clinic were used for determination of hepatotoxic lesion biomarkers and genetic polymorphism of SOD2. During the prospective, controlled study were used detailed noninvasive clinical diagnostic data, which were important for the research variables. Statistical analysis of the collected data included a sample size calculation and statistical processing. Primary independent variables were: presence of Val16Ala polymorphism (rs4880) SOD2 in prospective study and amiodarone administration in a retrospective cohort. The primary dependent variable was the presence of hepatotoxicity. Considering the fact the data in available literature for the given population are scarce and controversial, the results will be an original contribution to the field of clarification of the mechanism and significance of hepatotoxicity associated with the use of amiodarone in hospitalized patients.

Key words: hepatotoxicity, amiodarone, biomarkers, superoxide dismutase, risk factors, prognostic significance

Садржај

ИДЕТИФИКАЦИОНА СТРАНИЦА ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ.....	2
САЖЕТАК.....	3
ABSTRACT.....	4
ЗАХВАЛНИЦА.....	5
1.0.УВОД.....	9
1.1.АМЈОДАРОН.....	9
1.1.1.Фармакодинамика и фармакогенетика.....	9
1.1.2.Квалитативни и квантитативни састав.....	10
1.1.3.Електрофизиолошки ефекти.....	10
1.1.4.Терапијске индикације	11
1.1.5.Дозирање и начин примене.....	11
1.1.6. Контраиндикације за примену	13
1.1.7. Нежељена дејства	13
1.1.8. Интеракције са другим лековима	14
1.1.9. Закључак	14
1.2. DILI.....	15
1.2.1. Анатомија, хистологија и патолошка слика DILI-ја.....	15
1.2.2. Увод у проблем DILI-ја.....	17
1.2.3. Значај проблема DILI.....	18
1.2.4. Фактори ризика за DILI.....	20
1.2.5. Патогенеза DILI-ја.....	22
1.2.6. Клиничка слика DILI-ја.....	23
1.2.7. Скале за процену DILI-ја.....	24
1.2.8. Додатни тестови (нерутински) за дијагнозу DILI-ја.....	27
1.2.9. Инкриминисани лек и лечење DILI-ја.....	28
1.2.10. Превенција и рано препознавање DILI-ја.....	30
1.2.11. Закључак.....	31
1.3. АМЈОДАРОН И DILI.....	32
1.3.1. Увод.....	32
1.3.2. Биомаркери.....	33
1.3.3. Патогенеза DILI-ја узрокованог амјодароном.....	34
1.3.4. SOD2.....	34

1.3.5. Клиничка, патоанатомска и лабораторијска презентација DILI-ја узрокованог амјодароном.....	36
1.4. ДОПРИНОС СТУДИЈЕ.....	39
2.0. ЦИЉЕВИ И ХИПОТЕЗЕ СТУДИЈЕ.....	40
2.1. ЦИЉЕВИ СТУДИЈЕ.....	40
2.2. ХИПОТЕЗЕ СТУДИЈЕ.....	41
3.0. МАТЕРИЈАЛ И МЕТОД.....	42
3.1. ВРСТА СТУДИЈЕ.....	42
3.2. СТУДИЈСКА ПОПУЛАЦИЈА.....	42
3.2.1. Узорковање студијске популације.....	43
3.2.1.1. Ретроспективна опсервациона студија.....	43
3.2.1.2. Проспективна контролисана студија.....	43
3.2.2. Критеријуми за укључивање.....	44
3.2.2.1. Општи критеријуми за укључивање у истраживање.....	44
3.2.2.2. Критеријуми за укључивање у групу “случај” опсервационог дизајна.....	44
3.2.2.3 Критеријуми за укључивање у “експерименталну групу” проспективне студије.....	44
3.2.2.4. Критеријуми за укључивање у контролне групе.....	45
3.2.3. Критеријуми за неукључивање у студију.....	45
3.2.4. Критеријуми за искључивање из проспективне, контролне студије.....	45
3.3. ПЛАН СТУДИЈЕ.....	46
3.4. СТУДИЈСКЕ ПРОЦЕДУРЕ.....	46
3.4.1. Узорковање крви, одређивање биомаркера хепатотоксичног оштећења и генетски полиморфизам SOD2.....	46
3.4.2. Анализа каузалности хепатотоксичности лекова.....	47
3.4.3. Класификација и ниво употребе лекова.....	48
3.4.4. Допунска клиничка дијагностика.....	48
3.5. ВАРИЈАБЛЕ ИСТРАЖИВАЊА.....	49
3.6. ЕТИЧКИ И ОРГАНИЗАЦИОНИ АСПЕКТИ СТУДИЈЕ.....	51
3.7. СНАГА СТУДИЈЕ И ВЕЛИЧИНА УЗОРКА.....	52
3.7.1. Статистичка анализа.....	52
3.7.2. Прорачун величине студијског узорка.....	52

3.8. СТАТИСТИЧКА ОБРАДА ПОДАТАКА.....	53
4.0. РЕЗУЛТАТИ.....	54
4.1. РЕТРОСПЕКТИВНА СТУДИЈА СЛУЧАЈ-КОНТРОЛА.....	54
4.1.1. Демографске, социо-економске и клиничке карактеристике.....	55
4.1.2. Анализа фактора ризика за појаву хепатотоксичности.....	71
4.2. ПРОСПЕКТИВНА КОНТРОЛИСАНА СТУДИЈА.....	73
4.2.1. Демографске, социо-економске и клиничке карактеристике.....	74
4.2.2. Анализа SOD2 генотипова.....	102
4.2.3. Дијагностичке перформансе теста ОТС-а и жучних киселина.....	105
4.2.3.1. ROC ОТС и хепатоцелуларно оштећење.....	107
4.2.3.2. ROC укупне жучне киселине и холестатско/мешано оштећење.....	107
5.0. ДИСКУСИЈА.....	109
5.1. РЕТРОСПЕКТИВНА СТУДИЈА.....	109
5.2. ПРОСПЕКТИВНА СТУДИЈА.....	114
5.2.1. Генотип SOD2.....	114
5.2.2. ОТС и жучне киселине.....	116
6.0. ЗАКЉУЧАК.....	118
СКРАЋЕНИЦЕ.....	120
7.0. ЛИТЕРАТУРА.....	121
БИОГРАФИЈА.....	136
БИБЛИОГРАФИЈА.....	137
ПРИЛОГ.....	138

Докторска дисертација

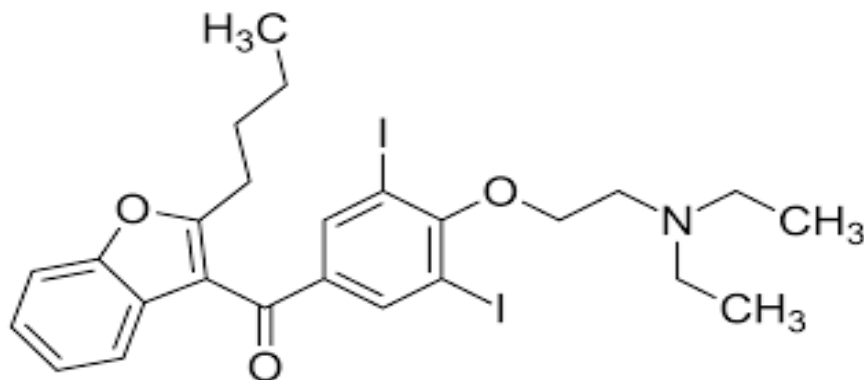
1.0. УВОД

1.1. АМЈОДАРОН

1.1.1. Фармакодинамика и фармакокинетика

Амјодарон ($C_{25}H_{29}I_2NO_3$) је антиаритмик III класе (Слика 1). Лек је избора за лечење бројних атријалних и вентрикуларних аритмија¹. Има антиисхемијски и хемодинамски ефекат, смањује периферни отпор, успорава срчани рад и тиме смањује преузимање и уопште потребу миокарда за кисеоником. Одржава минутни волумен срца снижењем притиска у аорти и смањењем периферног отпора. Некомпетитивни је блокатор алфа и бета адренергичких рецептора, инхибира ефекат катехоламина и рад Na-K пумпе. То је дериват бензофурана који садржи јод. Метаболише се у јетри преко цитохрома P450 (CYP 3A4 и CYP 2C8 изоформе) до моно-н-десетиламјодарона (DEA), који такође има антиаритмијска својства, а излучује се путем жучи², тако да дозу амјодарона не треба редуковати код бубрежних болесника јер се он не елиминира путем бубрега и безбедно може да се примени и код пацијената на дијализи¹. Време полуелиминације значајно варира од особе до особе и износи од 35-110 дана. Након пероралне примене, ресорпција амјодарона је спора и непотпуна, максимална концентрација лека се постиже за 3–7 h, док је биорасположивост ниска, до 50%. Након парентералне примене дејство лека настаје акутно, док уколико се примени ударна доза пероралног амјодарона, дејство наступа након 10, а ако се не примени тек након 28-30 дана. На почетку терапије време полуелиминације је 2-10 дана, а потом 20-100 дана³.

Слика1. Хемијска структура амјодарона



преузето са : https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Amiodarone_200.svg

1.1.2. Квалитативни и квантитативни састав

Једна таблета садржи 200 mg амјодарон-хидрохлорида. Пошто је амјодарон нестабилан у води, он се раствара са мешавином полисорбата 80 и бензил-алкохола⁴. Интравенска формулација амјодарона садржи амјодарон (50mg/ml), полисорбат 80 (100 mg/ml), бензил алкохол (20.2 mg/ml) и воду. РН раствора је 4.

1.1.3. Електрофизиолошки ефекти

Иако амјодарон спада у III класу антиаритмика, он поседује електрофизиолошке карактеристике све четири Vaughan-Williams класе. Слично антиаритмцима прве класе блокира натријумове канале у кардиомиоцитима и Хис-Пуркињиевом систему доводећи до успоравања нулте фазе акционог потенцијала а не смањујући његову амплитуду. Као некомпетитивни антагониста амјодарон блокира алфа и бета адренергеичке рецепторе тако да, слично антиаритмцима друге класе смањује тонички утицај симпатикуса на миокард и артерије, а блокирањем калијумових канала и калијумових струја одговорних за реполаризацију продужава трајање ефективног рефрактарног периода као и трајање акционог потенцијала у свим деловима срца, што је одлика антиаритмика III класе. Попут антиаритмика IV класе, амјодарон блокира и Са-канале у SA и AV чвору и акцесорним путевима чиме се објашњава настанак брадикардије и успорење спровођења кроз AV чвор. Антисимпатичко дејство и блокада Са и К –канала су одговорни за негативни дромотропни ефекат на синусни чвор и за успорено спровођење и продужавање рефрактарности у AV чвору. Вазодилататорни ефекат амјодарона може да смањи срчано напрезање а самим тим и потребе миокарда за кисеоником. Према томе електрокардиографски ефекти амјодарона су: синусна брадикардија, продужење PR интервала, продужење QT интервала. QT није продужен након акутне интравенске примене, већ само после хроничне пероралне примене амјодарона. Пацијентима са хипокалемијом или хипомагнезијемом треба да се претходно коригује електролитни статус, кад год је то могуће, пре него што се примени интравенски амјодарон, пошто ови поремећаји могу потенцирати степен продужења QT интервала и повећати потенцијал за torsade de points. Посебну пажњу треба обратити на равнотежу електролита и киселина код пацијената са тешком или продуженом дијарејом или код пацијената који примају истовремено диуретике. Амјодарон повећава праг за вентрикуларну фибрилацију, док

код већине болесника акутна примена парентералне формулације успешно купира рефрактарну VT⁵.

1.1.4. Терапијске индикације

Амјодарон се примењује код тахиаритмије у склопу Wolff-Parkinson-White (WPW) синдрома, преткоморског фибрило-флатера, свих пароксизмалних тахикардија (нпр. PSVT), вентрикуларне фибрилације - када је примена других антиаритмика контраиндикована. Амјодарон не доводи до негативног инотропног ефекта и успешан је у лечењу аритмија које су резистентне на друге антиаритмике (нпр. антиаритмици I класе)⁶. У великој рандомизованој студији коју су спровели Roy и сарадници, показано је да је амјодарон ефикаснији у одржавању синусног ритма код пацијената са атријалном фибрилацијом него пропафен и соталол⁷. Амјодарон се препоручује у комбинацији са другим лековима као што су бета блокатори за лечење одрживих вентрикуларних тахиаритмија код пацијената који имају структурно оштећење срца, посебно дисфункцију леве коморе и који нису кандидати за ICD⁸. Slavik је запазио да код пацијената са већ постојећом дисфункцијом леве коморе амјодарон може да изазове негативно инотропно дејство⁹.

1.1.5. Дозирање и начин примене

Лечење амјодароном пероралним путем треба започети са 200 mg, три пута на дан, у току прве недеље а затим два пута на дан током следеће недеље. Након тога дозу треба смањити на 200 mg дневно или мање, кроз разне терапијске модалитете (5/2-5 дана пије, два дана пауза или на 2-3 дан). Иницијална доза ампулираног амјодарона је 1000mg током прва 24h терапије, примењено по следећем режиму: 150 mg током првих десет минута (15 mg/min), затим 360 mg током следећих 6h (1mg/min), а затим 540 mg током наредних 18 h (0.5 mg/min). Након првих 24h наставља се примена интравенске дозе одржавања брзином од 0.5 mg/min. Брзина се може повећати како би се регулисала аритмија. Инфузија одржавања при брзини од 0.5 mg/min може да примењује до 3 недеље. Амјодарон има дуг полуживот и може да се примењује и орално и парентерално¹⁰. Често се примењује као интравенски болус при збрињавању животну угрожавајућих поремећаја ритма¹¹. Исто тако парентеална примена се препоручује код хоспитализованих пацијената са брзим поремећајима ритма који су кандидати за оралну терапију али из неког разлога нису у могућности да узимају терапију per os¹. После per os примене не испољава негативно инотропно дејство, осим

код болесника са дисфункцијом леве коморе. После брзе и.в. инјекције, може да узрокује хипотензију, која може бити праћена рефлексном тахикардијом. После споре и.в. инфузије, узрокује депресију миокардне контрактилности, при чему се срчани минутни волумен повећава услед израженог смањења системске васкуларне резистенције и накнадног оптерећења леве коморе. Сматра се да је један од најбезбеднијих антиаритмика за примену код пацијената са срчаним попуштањем и ниском EF⁹. Такође је утврђено да интравенски примењен амјодарон смањује појаву АФ код пацијената након аортокоронарног by-pass-a¹². Орална примена амјодарона често узрокује тиреоидну дисфункцију, корнеалне микродепозите, хепатичну дисфункцију, пулмоналну фиброзу и асимптоматску лезију јетре (15-50% пацијената)^{1,7}. Клинички манифестан DILI узрокован амјодароном није уобичајен, али када се јави често узрокује смртни исход или цирозу јетре (око 1%)¹³. За разлику од оралног, најчешћи нус ефекти парентерално примењеног амјодарона су хипотензија, кожне промене на месту примене, црвенило, диафореза, синусна брадикардија, различит степен AV блока, продужен QT интервал, а као проаритмогени ефекат може да се јави torsades de pointes и вентрикуларна фибрилација, као и акутни тромбофлебитис, епидидимитис, еректилна дисфункција и акутна хепатотоксичност која може да варира од благог асимптоматског пораста серумских ензима до фулминантне хепатичне инсуфицијенције. Пораст билирубина може да буде први знак токсичног ефекта амјодарона, а повећани нивои билирубина могу да се одржавају и након обуставе лека из терапије због дугог полуживота¹⁴⁻¹⁷. Хипотензија као најчешћи нежељени ефекат амјодарона се јавља код око 26% пацијената и то чешће код оних са EF ≤30% и после операције CABG⁹. Сматра се да хепатотоксичност која прати парентералну примену амјодарона није узрокована самим амјодароном већ његовим растварачем полисорбатом 80 који изазива хипотензију и последичну хепатичку исхемију. Полисорбат 80 који је присутан у интравенској формулацији лека је повезан са Е-ферол синдромом који је описан код деце после интравенске примене витамина Е и који има исту клиничку слику као и акутни DILI узрокован амјодароном¹⁰. Хепатичка исхемија која је узрокована применом амјодарона тј. полисорбата 80 али и срчаном слабошћу и варијацијама крвног притиска услед тахиаритмије, сматра се основом за настанак амјодароном узроковане хепатотоксичности¹⁸. Може проћи и више од шест месеци од почетка примене лека до појаве нежељених ефекта. Неки нежељени ефекти, посебно неуролошки и гастроинтестинални су дозно-зависни и јављају се у почетним фазама примене амјодарона¹.

1.1.6. Контраиндикације за примену

Контраиндикације за примену амјодарона су тиреороксиоза, цироза јетре или друге болести јетре, фиброза плућа или појава озбиљних нежељених ефеката при претходној примени лека¹. Амјодарон је контраиндикуван код познате преосетљивости на јод или амјодарон, или на било који од ексципијенаса (једна таблета од 200 mg садржи око 75 mg јода). Изузев у посебним околностима амјодарон је контраиндикуван у трудноћи (због његовог нежељеног дејства на тиреоидну жлезду фетуса). Излучује се у мајчином млеку у великој мери па није препоручљиво да се користи током лактације⁵.

1.1.7. Нежељена дејства

Амјодарон је лек који је врло ефикасан антиаритмик код низа суправентрикуларних и вентрикуларних тахиаритмија због чега има широку клиничку примену¹⁹. С друге стране, потенцијална нежељена дејства амјодарона често су клинички значајна и ремете, а у неким случајевима и онемогућавају терапију овим корисним и ефикасним леком. Амјодарон може да изазове поремећаје функције штитасте жлезде, замућење рожњаче, тамну пребојеност коже, опадање косе, фотосензибилизацију, тремор, ноћне море, периферну неуропатију, плућну фиброзу и оштећење јетре²⁰. Његова нежељена дејства се испољавају на многим органским системима и доводе до искључивања лека из терапије код 10-15% пацијената²¹. Најновија анализа указује да на свака четири болесника који се лече амјодароном један више је са додатним озбиљним нежељеним дејством попут брадикардије, хипотензије, мучке или флебитиса, а на сваких 14 лечених један више је са додатним поремећајима штитасте жлезде, хепатотоксичношћу, плућном токсичношћу или брадикардијом²². Амјодарон као липофилни молекул, као и његов активни метаболит DEA се акумулирају у масном ткиву, укључујући јетру¹. Обе компоненте су у високим концентрацијама директно токсичне за НЕР G2 ћелије и верује се да су одговорне за хепатотоксичност узроковану амјодароном¹¹. Утврђено је да пацијенти са срчаним попуштањем имају дужи полуживот активног метаболита амјодарона, што додатно ове пацијенте предиспонира за амјодаронску хепатотоксичност¹.

1.1.8. Интеракције са другим лековима

Због инхибиције СYP 2C9 изоформе цитохрома P450 амјодароном повећава се концентрација ОАК-а и фенитоина. Уколико се амјодарон даје са лековима који продужавају QT интервал, повећава се ризик за настанак torsades de pointes. Такође, при истовременој употреби, повећава концентрацију дигоксина и на тај начин потенцира симптоме и знаке који су у вези са високим нивоом дигоксина и поентираће се синергистички ефекат на срчану фреквенцу и атриовентрикуларно спровођење. Истовремена примена са диуретицима, системским кортико-препаратима тј. са лековима који доводе до хипокалијемije и/или хипомагнезијемije повећава ризик за настанак поремећаја срчаног ритма као што је torsades de pointes. Уколико се употребљава са циклоспорином, фентанилом, тј. са лековима који се метаболишу преко цитохрома P450 3A4, а зна се да амјодарон инхибира СYP 3A4, може доћи до пораста њихове концентрације у плазми, а самим тим и њихове токсичности.

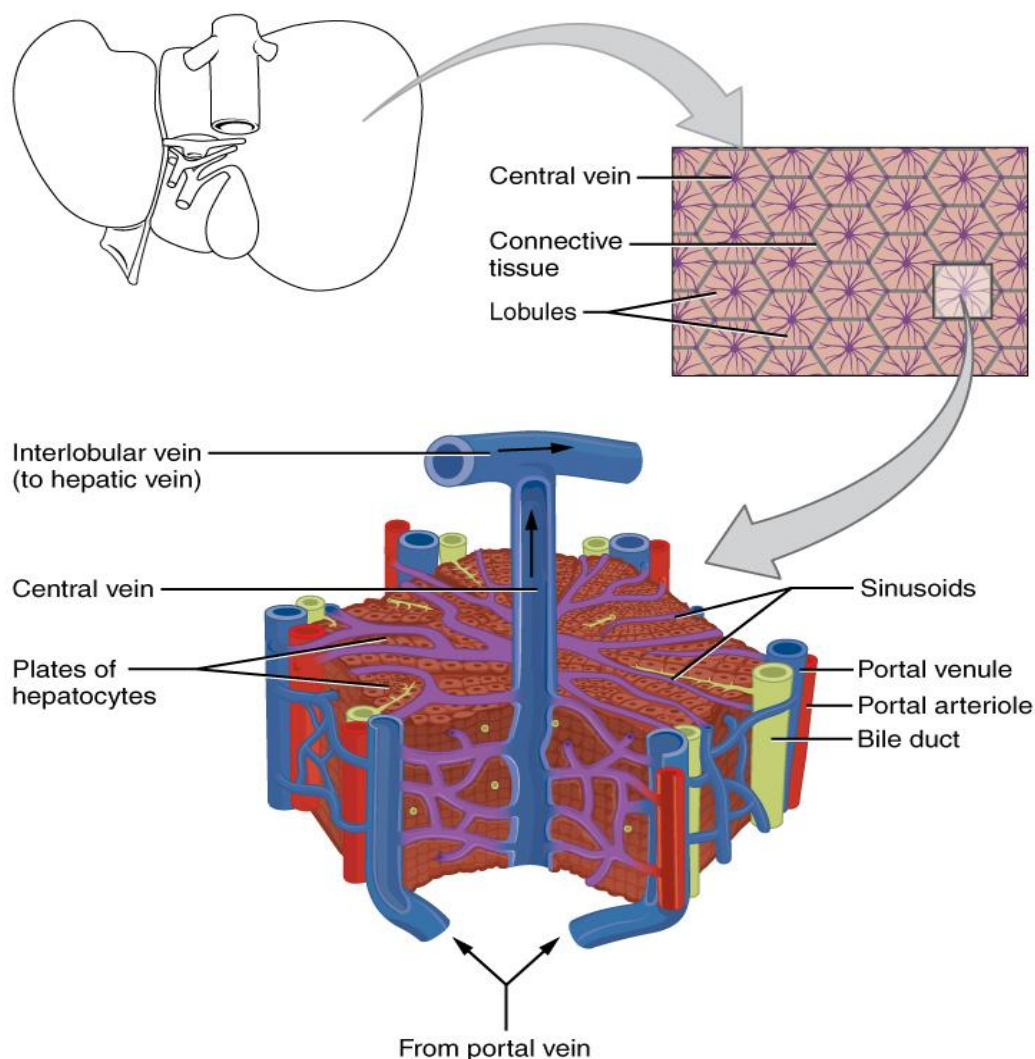
1.1.9. Закључак

Амјодарон је антиаритмик избора у случају животно угрожавајућих аритмија код болесника са акутном декомпензацијом хроничне срчане инсуфицијенције. Код хепатичне конгестије, примена амјодарона може да изазове акутно попуштање јетре, праћено скоком трансаминаза и не тако ретко и смртним исходом. Дијагноза оштећења јетре узрокованог амјодароном поставља се методом искључивања, тако да се истовремено разматрају и други узроци скока трансаминаза уз смањење дозе или искључење инкриминисаног лека.

1.2. DILI

1.2.1. Анатомија, хистологија и патолошка слика DILI-ја

Слика 2. Анатомско-хистолошке карактеристике јетре



преузето са: <https://en.wikipedia.org/wiki/Liver>

Јетра је главни орган где се детоксикују лекови и разни токсини. Због ове улоге токсична оштећења јетре су доста честа. Јетра се налази између гастроинтестиналног тракта и периферних органа и трајно је изложена ингестираним страним супстанцама, чији метаболизам може створити токсична једињења који могу довести до оштећења јетре, или погоршати већ постојеће оштећење. Јетра је савршено прилагођена за метаболизам липофилних лекова захваљујући фенестрацијама на ендотелној површини синусоидних простора. Фенестрације омогућавају пасивну дифузију серумских протеина из синусоида у Disseov простор, а ту лекови везани за протеине плазме долазе

у контакт с плазма мембраном хепатоцита. Затим протеини активним транспортом или пасивном дифузијом улазе у хепатоците где се метаболишу и затим излучују у Disseov простор, синусоиде и на крају у системску циркулацију (Слика 2.). Из организма лекови се излучују преко бубрега или преко жучи. Биотрансформација лекова којом они постају хидрофилни посредована је ензимским системом, који се налази на ендоплазматском ретикулуму хепатоцита. У ензимски систем укључене су оксидазе, монооксигеназе, цитохром-редуктазе и цитохром P450. Биотрансформација се одвија у две фазе: фаза I подразумева припрему спојева за коњугацију чиме се осигурава формирање поларних веза, обухвата оксидативне, редуктивне и хидролитичке реакције посредоване цитохромом P450 и фаза II у којој се метаболити коњугују с глутатионом, глукуронатом, сулфатом и глицином и тако се повећава њихова растворљивост у води, а затим долази до екскреције. Осетљивост јетре на токсична оштећења зависи од узраста, пола, генетских фактора и придружених болести. Повећана осетљивост код старих особа настаје због смањеног проласка крви кроз јетру, смањене активности цитохрома P450 и смањеног бубрежног клиренса. Код хроничне злоупотребе алкохола и малнутриције, долази до смањене синтезе и деплеције глутатиона у хепатоцитима. Удружена хипоалбуминемија и хепатотоксичност аспирина, настаје због смањеног везивања аспирина за протеине плазме, тако да долази до повећане концентрације аспирина у ткивима. Код Gilbertovog синдрома повећана је осетљивост на ацетаминофен.

Морфолошке промене јетре узроковане леком могу бити: масна јетра, интрахепатична холестаза, некроза хепатоцита. Стеатоза се испољава у две морфолошке слике накупљања триглицерида: макровезикуларна и микровезикуларна. Макровезикуларна стеатоза карактерише се накупљањем триглицерида у облику велике светле вакуоле која испуњава и проширује читаву цитоплазму. Овај тип стеатозе узрокује етанол, тровање тетрачлор угљеником, отровне гљиве, кортикостероиди и метотрексат, амјодарон (употреба амјодарона може довести до промена које личе на алкохолни хепатитис). Код микровезикуларне стеатозе ситне капљице масти распршене су по читавој цитоплазми. Овакве промене налазимо код употребе антиепилептика валпроата, сулфонамида и тетрациклина. Такође, типичну микровезикуларну стеатозу налазимо и код Рејовог синдрома, који је описан код деце која су добијала салицилате. Интрахепатична холестаза се јавља код употребе лекова с непредвидивим утицајем. Ту спадају орални контрацептиви, анаболички стероиди који изазивају централобуларну холестазу са чепићима згуснуте жучи, без некрозе или запаљења. Зоналне хепатоцелуларне некрозе су конфлуирајуће централобуларне

некрозе, јер у подручју око централних вена постоји већа активност ензима који разграђују лекове. Као пример за овакав вид оштећења наводе се парацетамол, тетрациклини, халотан. Масивну некрозу узрокује прекомерна доза халотана, ацетаминофена, метилдопе, изонијазида. Фенотиазин и хлорпромазин могу довести до некрозе и запаљења. Велики број лекова може довести до стварања гранулома: NSAID, фенилбутазон, сулфонамиди, кинидин, карбамазепин, алопуринол. Јатрогени грануломи су углавном смештени у портним просторима. Грађени су од епителних ћелија, еозинофила и лимфоцита. У центру нема некрозе. Никада не долази до фиброзирања гранулома. Ако су грануломи праћени некрозом хепатоцита говоримо о грануломатозном хепатитису²³.

1.2.2. Увод у проблем DILI-ја

Јетра је централни метаболички орган који учествује у метаболизму лекова. Оштећења јетре узрокована инкриминисаним леком настају као последица предозирања леком (након дате индикације за узмање лека од стране ординаријуса или самоиницијативним узимањем) и/или индивидуалне реакције преосетљивости на исти²⁴⁻²⁸. Тачније речено, оштећење јетре настаје као последица директног хепатотоксичног оштећења преко хепатосензибилизације или удруженог дејства напред наведених механизма. Хепатитис узрокован леком је ретка појава, код 1-3% свих оболелих од хепатитиса, док је чак 30% свих фулминантних хепатитиса узроковано леком²⁵⁻²⁹. Лекови доводе до стимулације продукције цитокина, хемокина, уопштено медијатора инфламације³⁰. Проинфламаторни цитокини активирају одбрамбену реакцију јетрених ћелија, укључујући и апоптозу. Кисеонични радикали настали активацијом имунолошког одговора активирају ћелијске механизме одбране (инфилтрација неутрофилима, запаљенски одговор)³¹. Хепатотоксичност може да се јави услед употребе једног лека, комбинације лекова или понављаног узимања инкриминисаног лека. Може да буде акутна и хронична²⁶, а клинички ток може бити асимптоматски, праћен сврабом, макуло-папулозном оспом, грозницом, фебрилношћу, муком, повраћањем, губитком апетита, појавом иктеруса, тамно пребојеном мокраћом, ахоличном столицом, крварењем десни, болом испод десног ребарног лука, проливом, абдоминалним болом, spider невусима, асцитесом³². Оштећење јетре изазвано леком се у лабораторијским анализама презентује као скок проширеног хепатограма и еозинофила²⁵. Патохистолошка слика је разнолика а доминира некроза хепатоцита, холестаза, перипортни запаљенски ћелијски инфилтрат²⁶. Повреда јетре изазавана

леком може да се заврши потпуном резолуцијом, преласком у хронични облик или чак акутном инсуфицијенцијом јетре са смтрним исходом²⁵. Дијагноза се поставља на основу позитивне анамнезе о употреби лека, клиничког налаза, лабораторије, патохистолошке верификације оштећења. Лечење подразумева обуставу или максимално смањење дозе инкриминисаног лека, супституциону и симптоматску терапију.

Циљ овог испитивања јесте брзо и правилно постављање дијагнозе DILI-ја, доказивање постојања узрочно-последичне везе између инкриминисаног лека и јетре, упознавање са клиничком презентацијом болести, што би свеобухватно помогло лекару клиничару у решавању диференцијално дијагностичких потешкоћа у третману ових болесника на Клиници за кардиологију.

1.2.3. Значај проблема DILI

Општа инциденца DILI-ја за највећи број лекова процењена је на 1-10/100.000 изложених особа. Најприсутнији је на интерном одељењу - Клиника за кардиологију и гастроентерохепатологију, где се на сваких 100 хоспитализованих пацијената верификује по један са неким обликом DILI-ја³³. Статистички подаци везани за DILI Светске здравствене организације указују да се број DILI случајева значајно повећао у односу на 1990-ту годину. Организација је регистровала приближно око 3 милиона DILI-ја од 1968 године³⁴. У студији Andrade и Lucene анализиран је 461 случај DILI-ја у Шпанији у периоду од 10 година. Доказали су да је амоксицилин са клавуланском киселином најчешћи узрочник DILI-ја, чак 59 случаја што је око 13 % од укупно оболелих. У истој студији је показано да су аторвастатин, бензодиазепин и каптоприл значајни хепатотоксини³⁵, док су Motola и сарадници доказали да су статини најчешћи узрочници DILI-ја у Италији од 1069 случајева које су верификовали са хепатотоксичном реакцијом на лек (4.5%)³⁶. Wai и сарадници су показали да су у Азији најчешћи узрочници DILI-ја дијететски суплементи и лековито биљке³⁷. Најчешћи изазивачи фаталног DILI-ја су: парацетамол, лекови против HIV-а, троглитазони, антиконвулзивни лекови (као што је валпроат), аналгетици, антибиотици, анксиолитици, статини, болест-модификујући лекови (метотрексат), имуносупресиви, антихипертензивни, онколошки лекови, NSAIL, медицинско биље, „over the counter” суплементи³³⁻⁴⁰ (Слика 3).

Слика 3. Лекови и DILI



преузето са: <https://www.articleblotter.com/new-antibiotic-capable-of-killing-superbugs-discovered-inside-the-human-nose/>

Хепатотоксичност је нежељено дејство лека које има негативан утицај на морбидитет и mortalитет као и негативан финансијски утицај на развој лека⁴¹. Велики број лекова са хепатотоксичним дејством је у промету: лекови које се прописују и издају на рецепт и “over the counter” препарати (традиционални биљни лекови) али и неки дијететски суплементи (витамински препарати, средства за мршављење). Све док се буду развијали и уводили у клиничку праксу нови лекови, оштећење јетре узроковано леком ће остати као проблем који има своју клиничку и регулаторну тежину⁴². DILI је главни разлог за престанак даљег развоја лека и повлачења са тржишта⁴³. Неки од примера за то су тровафлорксацин, нимесулид, телитромицин⁴³⁻⁵⁰. Повећана употреба суплемената и алтернативних лекова повећава број случајева хепатотоксичности што додатно збуњује и отежава постављање дијагнозе⁵¹. Оштећење јетре је релативно ретко, често са озбиљним последицама и има непредвидив ризик повезан са употребом великог броја лекова који припадају различитим терапијским групама и биљним производима који се користе било у терапијским дозама или приликом предозирања⁴³⁻⁵⁰. Водећи узрок акутне инсуфицијенције јетре у САД-у и Великој Британији у преко 50% случајева су парацетамол (39%), и други лекови (13%). Само 20% блесника са акутним застојем јетре преживи без трансплантације. Лекови су одговорни за 2-5% жутице која

захтева хоспитално лечење односно око 10% свих случајева акутног хепатитиса⁵². Изражено хепатотоксично дејство је најчешћи узрок повлачења лека из употребе (бромфенак, кетоконазол), појачаних мера опреза и знатног ограничавања употребе једног таквог лека у пракси. Праву преваленцу овог нежељеног догађаја тешко је утврдити због потешкоћа са правилним постављањем дијагнозе, недовољног пријављивања сумњи на нежељено дејство лека и неодговарајућег праћења особа са ризиком. Клинички значајни догађаји на основу извештаја су веома ретки 0,01-0,001%. Овако мала инциденца је последица касног откривања (хепатотоксичност се најчешће детектује у постмаркетиншкој фази јер је број укључених пацијената у већини клиничких истраживања мањи од 10.000)⁵³. Међутим, ипак се сматра да је стварна учесталост у пракси знатно већа. У Француској од 1997.г-2000.г број случајева медикаментног хепатитиса је 16 пута већи од броја спонтано пријављених случајева³⁹.

1.2.4. Фактори ризика за DILI

У факторе ризика убрајамо: дозни режим лека, генетски полиморфизам, старије животно доба, женски пол, потхрањеност/гладовање, гојазност, алкохолизам, конкомитантну употребу више лекова, анамнестички верификован хепатотоксични потенцијал лекова, удружене болести, трудноћа. У највећем броју случајева постојеће обољење јетре продужава опоравак а ређе доприноси хепатотоксичности коју изазива лек. Препознавање фактора ризика као што су старост, пол, трудноћа, унос алкохола може индиректно да укаже на дијагнозу DILI-ја, а неки скоринг системи укључују ове факторе⁵⁴. Узрочни агенси за DILI код деце и одраслих варирају а њихова различитост је заснована на индикацијама за увођење лека у терапију. Године старости могу да допринесу подложности за DILI код одређених лекова (нпр лекови који делују на CNS као и антибиотици су чести узрочници DILI-ја код деце)⁵⁵. Деца показују подложност за DILI узроковану валпроатом и они имају повећан ризик за развој Reу-овог феномена узрокованог ацетилсалицилном киселином. Иако пропилтиоурацил може изазвати DILI у свим старосним групама деца су подложна озбиљнијој и фаталној хепатотоксичности^{56,57}. Не постоје докази који указују да су жене у већем ризику за DILI било које етиологије, али изгледа да су у повећаном ризику за хепатотоксичност узроковану одређеним лековима као што је миноциклин, метилдопа, диклофен, нитрофурантоин, невирапин. DILI је редак узрок хепатотоксичности код трудница што је вероватно због ређе употребе и прописивања лекова током трудноће. Не постоје докази који указују да трудноћа сама по себи повћава подложност за DILI узрокован било којим леком изузев

тетрациклином⁵⁵. Оштећење јетре изазвано лековима као што су метотрексат и антитуберкулозици може да буде испољено код дијабетичара. Поједине студије су показале да је шећерна болест независан фактор ризика који је уско повезан са тежином клиничке слике DILI-ја²⁹. Иако је конзумирање алкохола битан фактор за процену DILI-ја у оквиру RUCAM скале, не постоје докази који указују да је хронична употреба алкохола фактор ризика за DILI генерално, међутим показано је да је конзумирање алкохола у великим количинама фактор ризика за DILI узрокован парацетамолом, метотрексатом и изонијазидом⁵⁵. Антибиотици и антиепилептици су одговори за 60% DILI-ја док су антихипертензивни и антидијабетички ретки узрочници (2-4%)^{29,58-60}. У неким истраживањима старост, као независан фактор ризика, је приказана као најзначајнија детерминанта скока трансаминаза који је узрокован употребом антибиотика, због споре елиминације лека кроз дегенеративно измењене органе задужене за клиренс антибиотика⁶¹. Неки лекови као што је валпроат хепатотоксичност чешће испољавају у детињству⁶², а трансплантација јетре је чешћа код жена које употребљавају инкриминисани лек него него код мушкараца⁶³. Тако да године и женски пол могу да утичу на клинички ток DILI-ја. Како су имунолошка реакција на лек и измењен метаболизам лека могући патогенетски механизми DILI-ја, различит имунолошки статус и метаболизам лека због година или пола могу да доведу до разлика у испољавању DILI-ја. Међутим Shapiro и Lewis су показали да фактори као што су старост преко 55 година, женски пол, алкохол, нису били специфични за случајеве DILI-ја који су потврђени CIOMS/RUCAM скалом⁶⁴. Генетски фактори који утичу на фармакодинамику и фармакокинетику лека, полиморфизам цитохрома P-450, мутација у POLG гену, полиморфизам SOD2 и GPX и дефицијенција N-ацетилтрансферазе, доприносе DILI-ју⁶⁵⁻⁶⁸. Број случајева који имају скок трансаминаза и/или смртни исход изазван лековима се повећава на дозно зависан начин⁶⁹. Постојећа болест јетре или присуство вируса повећавају вероватноћу за DILI. Тако су пацијенти који су пили антитуберкулозику а већ имали хепатитис Б, добили нагли скок трансаминаза, док су HIV пацијенти на антиретровирусној терапији добили акутни хепатитис који је прогедирао у акутну инсуфицијенцију јетре^{70,71}. Неалкохолна масна јетра је само по себи ризик фактор за DILI, а присутан оксидативни стрес додатно утиче на тешку форму DILI –ја⁷².

1.2.5 Патогенеза DILI-ја

Оштећења јетре могу настати због токсичног дејства штетног агенса, због стварања активних токсичних метаболита током биотрансформације у јетри или због имунског типа оштећења - када неки лек или његов метаболит постане хаптен, који ћелијске протеине претвара у неоантигене. Постоје два типа оштећења јетре: очекивано (узроковано интритичним хепатотоксичним спојевима) и неочекивано, или идиосинкразијско оштећење које настаје због идиосинкразијских хепатотоксина. Код предвидивог оштећења налазимо некрозу ћелија јетре, оштећење наступа кратко време након уношења штетног агенса у организам, степен оштећења зависи од количине агенса који је унет у организам. У такве агенсе спадају фосфор, органски растварачи-тетрахлор угљеник и лек ацетаминофен. Већина ових оштећења настаје деловањем метаболита наведених агенаса након I фазе биотрансформације. Реактивни метаболити су електрофилни радикали, слободни радикали и реактивни кисеоник. Реактивни метаболити се ковалентним везама везују за молекуле протеина, липида, нуклеинских киселина и доводе до поремећаја њихове функције. Такве ћелијске промене доводе до оштећења због инактивације кључних ензима или формирањем комплекса протеин-лек који може да доведе до имунски посредованог оштећења јетре. Ковалентна веза је најважнији механизам оштећења. Глутатион као главни интраћелијски антиоксиданс, који штити ћелију од токсичног утицаја ковалентног везивања, важан је у коњугацији метаболита ацетаминофена. Деплеција глутатиона због тога може потенцирати или повећати оштећење јетре. Непредвидива оштећења јетре лековима настају код малог броја изложених особа, па се сматра да се ради о идиосинкразијској реакцији, због склоности тих особа да покрену хиперсензитивну имунску реакцију на лек. Хиперсензитивна реакција се јавља након једне до пет недеља од узимања лека и јавља се након поновног узимања лека. Хиперсензитивна реакција је праћена повишеном телесном температуром, еозинофилијом, лимфоцитозом и запаљенском реакцијом јетре. Лекови који индукују имунски одговор (диклофен, сулфонамиди) стварају хаптен коњугате који изазивају хуморални и/или ћелијски одговор усмерен против јетре.

Да резимирамо, сагледавање клиничко-патолошких особина индивидуалаца са добро дефинисаним DILI-јем може да нам обезбеди кључ за одеђивање потенцијалног механизма DILI-ја као што се показало у случају фиалуридином изазване хепатотоксичности⁷³. Из фармаколошких особина лекова проистиче да механизам оштећења, који је већ горе наведен, може да буде метаболички или имунолошки⁷⁴⁻⁷⁶.

Честа и корисна карактеристика DILI-ја јесте подела на унутрашњи и идиосинкратски тип. Ова карактеризација се односи на лекове који су у стању да изазову лезију јетре код људи или у анималним моделима када се дају у довољно великој дози. Парацетамол је можда најпознатији и највише коришћен лек који изазива унутрашњи DILI. Идиосинкратски DILI је ређи и јавља се само код подложних особа, мање је дозно зависан и даје различитију презентацију него инстиндик⁷⁷. Дакле, два су механизма хепатотоксичног дејства лека: дозно-зависна предвидива реакција (предозирање парацетамолом или аспирином, дужа употреба амјодарона и метотрексата) и идиосинкразија. Први механизам је ређи, краћа је латенца, боља прогноза. Други механизам је чешћи, реакција је непредвидива, веома су ретка али озбиљна оштећења, није повезан са дозом, дужа је латенца и непознат узрок. Идиосинкразија може бити имунолошка посредована (алергија): независна од дозе (антиепилептици), метаболичка-може бити повезана са дозом (изонијазид) или не може да се диференцира механизам (преклапају се) - метилдопа, халотан.

1.2.6. Клиничка слика DILI-ја

Клиничка слика DILI-ја је различита и иде од асимптоматског, пролазног, благог пораста ензима јетре до фулминантног попуштања јетре у око 13-30% случајева који је често праћен смртним исходом^{78,79}. Клиничка слика оштећења је веома разнолика, од неспецифичних симптома и знакова до екстрахепатичних појава као што је DRESS синдром. Најчешћи симптоми и знаци имунолошке реакције на лек су општа слабост, губитак апетита, грозница, оспа, артралгија и еозинофилија, спленомегалија, али они могу бити присутни и код пацијената који не узимају лек и није правило да се увек јављају у оштећењу јетре изазваном леком. Многи нефармаколошки узроци доводе до скока трансaminaза, тако да је потребно диференцирати вирусне узрочнике (хепатитис А, С и Е, ЕВ вирус, цитомегаловирус), билијарне болести као што су билијарна калкулоза, алкохол, неалкохолна масна јетра, аутоимуне болести јетре, херидитарне болести као што су: хемохроматоза, алфа 1 анти трипсин дефицијенција и Wilsonova болест од фармаколошки узроковане повреде јетре. Добро узета анамнеза која указује на лек, искључење других узрочника, професионалних болести, генетске анализе (као што је полиморфизам SOD2, хистолошка испитивања јетре и имунолошка мерења антитела у аутоимуним болестима јетре могу бити корисна у диференцијалној дијагнози DILI-ја^{54,80}. Постоје клиничке скале доступне за дијагнозу DILI-ја. Али често пацијент узима више лекова који имају хепатотоксични потенцијал,

или има већ постојећу болест јетре или системску болест која захвата јетру, тако да је издвајања једног лека као узрочника DILI-ја понекад тешко коришћењем скоринг система тј. скалама за дијагнозу DILI-ја. Пораст трансаминаза сам по себи често није довољан већ је потребна опсежнија анализа функције јетре (билирубин, албумин време крварења...)

1.2.7. Скале за процену DILI-ја

Према CIOMS/RUCAM скору DILI је подељен у три типа: хепатоцелуларни, холестатски и мешовити^{81,82}. Хепатоцелуларни тип се дефинише порастом ALT-а преко 3 пута од вредности која представља горњу границу референтног опсега или $R > 5$, где је R однос серумске активности ALT и серумске активности ALP, док се холестатски тип дефинише као $ALP > 2 \text{ ULN}$ или $R \leq 2$, а мешовити као $ALT > 3 \text{ ULN}$ и $2 < R < 5$ ^{81,83,84}. Хепатоцелуларни тип оштећења је најозбиљнији и најчешће је акутни док је холестатски и мешовити DILI чешће облик хроничног оштећења⁸⁵. Скок билирубина у хепатоцелуларном оштећењу указује на озбиљну лезију са честим смртним исходом од 0.7 до 1.3 на 100.000 пацијената који примају суспектан лек⁷⁸.

Брза и тачна дијагноза DILI-ја је важна у свакодневной пракси. Међутим, постављање дијагнозе DILI-ја није лако и углавном се базира на индиректним доказима. Најчешће, догађаји који сугеришу на суспектан DILI (DILI не може бити искључен ако нису сви присутни) су⁸⁶: увођење новог лека у претходна 3 месеца, присуство оспе или еозинофилије, холестаза са нормалном визуализацијом хепатобилијарног система и акутни и хронични хепатитис без аутоантитела и хипергамаглобулинемије. Како не постоји златни стандард за дијагнозу, основно је да се искључе други могући узроци оштећења јетре. Предлагани су бројни скоринг системи, али је процена и даље индивидуална. Да би се поставила дијагноза DILI-ја направљени су специфични скоринг системи који се називају клиничке скале за процену DILI-ја. Прва уведена скала за процену DILI-ја била је Нарањо скала. Њена предност је била у томе што је једноставана па самим тим и најчешће применљивана за брзу евалуацију DILI-ја. Али због њене ниске сензитивности и негативне предиктивне вредности, истраживачи је нису сматрали најмеродоавнијом дијагностичком скалом^{87,88}. Нова скала CIOMS/RUCAM се користи да диференцира тип оштећења јетре на хепатоцелуларни, холестатски или мешовити^{54,81}. Ова скала је одређена скором који узима у обзир 7 критеријума, укључујући привремену повезаност, клинички ток (одговор након искључивања лека из употребе), факторе ризика, придружене лекове,

искључивање других узрока оштећења који нису везани за лекове, вероватноћу појаве оштећења на основу назнаке на паковању лека (нежељена дејства) и *rechallenge* (да ли се реакција поново јавља ако се лек поново укључи у терапију). Широко се користи као стандардизована скала са високом поузданошћу, репродуцибилношћу и специфичношћу. Maria и Victorino (M&V) су приказали скалу која се зове Клиничка Дијагностичка Скала (CDS) која је поједностављена CIOMS/RUCAM скала и узима у обзир само 5 критеријума⁸⁹. Она је имала своје недостатке као што су често лажно негативна процена холестатског оштећења, DILI са дугом латенцом, и неслагања у случајевима брзопрогресивних хепатитиса и фокусирана је на имуноалергијске реакције, као што су екстрахепатичне манифестације^{90,91,92}. У Јапану је 2004. год. предложена скала које је настала из CIOMS/RUCAM, а која укључује тест лимфоцитне стимулације узроковане леком (DLST) као дијагностички фактор. Утврђено је да ова скала има већу сензитивност него CIOMS/RUCAM (93.8% у односу на 77.8%, редом) приликом анализирања 127 јапанских пацијената. Међутим, пецизност ове скале мора да се процени и на пацијентима који нису Јапанци како би се верификовала њена универзална корисност⁹³. Од свих скала највише коришћена је CIOMS/RUCAM.

У случају оригиналних критеријума, дијагноза DILI-ја се постављана на основу следећих критеријума: појава хепатичног оштећења која је директно повезана са применом лека, искључивање других узрока хепатитиса, опоравак тестова функције јетре након искључења лека из употребе и биопсија јетре. Мада је CIOMS/RUCAM скала најчешће коришћена и тренутно представља стандардну методу за дијагнозу DILI-ја, треба нагласити да многи лекари и даље постављају дијагнозу DILI-ја на основу сопствене процене. Дакле, дијагноза DILI-ја се примарно поставља ексјувантибус, а првенствено се заснива на детаљној анамнези, лабораторијским анализама, визуализационим дијагностичким методама и биопсији јетре^{51,94}. Дијагностички алгоритми доступни клиничарима заснивају се на клиничким скоринг системима, али њима недостаје конкретност и доказана тачност⁸⁹. Инциденца DILI-ја у општој популацији није тачно позната али се претпоставља да се јавља у 10-15 случајева на 100.000 пацијената годишње^{39,95}. Овако ниска инциденца DILI-ја је у вези са недостатком објективног дијагностичког маркера, који би представљао златни стандард, што отежава проучавање патогенезе овог поремећаја као и процену вероватноће узрочности лека, а самим тим и идентификација хепатотоксичности представља велики клинички и регулаторни изазов⁵³. DILI се генерално јавља између 5 и 90 дана од почетка примене лека⁵¹ и има значајан удео у развоју акутног застоја јетре⁹⁶. Хепатотоксичност узрокована леком је постала водећи узрок развоја акутног

застоја јетре у САД, где се јавља око 2000 случајева акутног застоја јетре годишње, од чега је у око 50% случајева лек узрочник, тако да је рана дијагностика хепатотоксичности и правовремено упућивање пацијената у трансплатационе центре од кључног значаја^{48,50}. Дуго година уназад DILI је био посебан изазов за кардиологе, гастроентерохепатологе, фармакологе, лекаре опште праксе, фармацевтске куће и државне агенције за лекове⁴⁶. У циљу бољег разумевања овог ретког али важног нежељеног догађаја, мултицентричне истраживачке мреже (DILIN) су почеле да стварају стандардизоване приступе за дијагнозу, евалуацију и пријављивање пацијената са суспектном лезијом јетре^{97,98}. Крајњи циљ ових напора је да се побољша безбедност пацијената смањивањем изложености високо ризичних индивидуалаца потенцијално хепатотоксичним лековима и омогућавање безбедне примене ових агенаса код великог броја нискоризичних индивидуалаца кроз персонализовану примену лека према пацијенту⁹⁷. Бројне методе су предлагане за процену вероватноће лека као фактора ризика за DILI. Неке су биле општег карактера (Нарањо, Крамеров алгоритам) док су друге специфичне за јетру (Maria и Victorino клиничка дијагностичка скала, CIOMS/RUCAM)^{49,93}. Нарањо скала је предложена као једноставна, неспецифична скала од 10 питања за процену нежељених реакција на лекове које се јављају током клиничког испитивања⁸⁷. Упркос њеној једноставности и широкој примени не само у клиничким истраживањима него и у клиничкој пракси, Нарањо скала има ограничену примену у процени узрочности хепатотоксичности због ниске сензитивности, ниске негативне предиктивне вредности и ограничене способности да се издвоје могући од вероватних категорија вероватноће⁸⁸. CIOMS/RUCAM скала је развијена као специфична за јетру, која класификује оштећење јетре као хепатоцелуларно, холестатско и мешовито, на основу бодовања које укључује 7 критеријума узрочности⁸¹. Ова скала се добро показала у процени оштећења јетре изазваног лековима и тренутно је златни стандард за процену узрочности хепатотоксичности^{88,91}. Њена апсолутна поузданост још увек није доказана^{97,99,100}. У DILIN студији у којој је скала била коришћена од стране три хепатолога уз два мерења у размаку већем од 5 месеци поузданост ретестирања је била ниска¹⁰¹. Квалитети који су неопходни за добар метод процене узрочности су репродукцибилност и валидност. Валидност значи да добијени резултати тачно рефлектују феномен који се испитије док је репродукцибилност значајна за упоређивање резултата, тако да различити корисници дођу до истих закључака, упркос разликама у времену и простору истраживања⁵¹.

1.2.8. Додатни тестови (нерутински) за дијагнозу DILI-ја

Предложени су и додатни тестови за потврђивање дијагнозе DILI-ја и идентификацију јединственог узрочног лека. Као што је горе поменуто пацијенти често узимају неколико лекова од којих је у највећем броју случајева само један одговоран за оштећење јетре. Међутим, чак и када клиничка скала за DILI чврсто указује на дати лек као узрочник оштећења јетре, идентификација једног узрочног лека не може бити утврђена коришћењем ових скала. Најпоузданији тест за потврду да је претпостављени лек сигурно изазивач DILI -ја у односу на друге факторе код посматраног пацијента је *rechallenge* са потенцијалним, узрочним леком^{54,81}. Међутим то није етички препоручљиво и контраиндиковано је код датог пацијента. Утврђивање секундарног имуног одговора који је посредован Б и Т ћелијама, а који се карактерише краћим периодом латенције и озбиљном реакцијом која се јавља након поновљене примене суспектног лека је јак показатељ да се ради о имунолошкој патогенези DILI-ја. Парау и сарадници су показали да приликом поновног излагања леку код 88 пацијената са хепатотоксичношћу која је узрокована различитим лековима, позитиван *rechallenge* је забележен у већини случајева, а 12 пацијената је развило озбиљно хепатоцелуларно оштећење са жутицом приликом поновне примене¹⁰². Тест лимфоцитне трансформације омогућава *in vitro* симулацију ефекта поновне примене суспектног лека у лимфоцитима узетим од пацијената са DILI-јем¹⁰³. Лимфоцити који су узети из хепаринизоване периферне крви пацијената се инкубирају са неколико различитих разређења са сумњивим узрочним леком¹⁰⁴. Лимфоцитни пролиферативни одговор је процењен мониторингом концентрације Н-тимидина. LTT се широко користи у Јапану и инкорпорисан је у дијагностичке критеријуме у Јапану (DDV.J скала). Овај тест се интерпретира као позитиван ако лимфоцитна пролиферација, која настаје као одговор на суспектни лек може да се детектује есејима, у поређењу са контролном културом, без лека¹⁰⁵. Међутим, ограничена сензитивност (око 50%) и специфичност теста, недостатак поновљивог и објективног читавања лимфоцитне пролиферације, као и могућност неспецифичних реакција су ограничили коришћење теста. Лимфоцитни одговор на суспектни узрочни лек не мора нужно да буде повезан са оштећењем јетре. Без обзира на то, у току су додатне студије од стране DILIN и других студијских група широм света о новим есејима лимфоцитне пролиферације, који потенцијално могу да се користе као дијагностички и прогностички тестови за реакције лекова. Још један тест у коме се користи периферна крв пацијената је тест леукоцитне миграције (LMT) за који је потврђено да је кориснији него DLST¹⁰⁶. Овај тест

укључује процену хемотаксе гранулоцита из једне коморе у другу комору која садржи моноклеарне ћелије користећи хемотактични фактор који продукују моноклеарне ћелије после инкубације са раствором суспектног узрочног лека. Даље, Murata и сарадници су приказали тест продукције цитокина као метод за анализу имунолошке патогенезе DILI-ја, који је такође показао високу сензитивност у дијагностиковању¹⁰⁷. У овој анализи HEP2G ћелије, које одлажу активност метаболичких ензима као што је CYP450 се прво инкубирају са дилуентима суспектног лека, и ова мешавина и култура медијума HEP2G ћелија се онда инкубира са лимфоцитима периферне крви изоловане од пацијената. Интрацитоплазматски цитокински профили лимфоцита, као што је интерферон гама, TNF алфа, интерлеукин 2 се на крају одређују коришћењем flowcytometry-је. Иако су ови тестови корисни за дијагнозу или идентификацију појединачног узрочног лека, нису једноставни за извођење и често нису изводљиви у рутинским испитивањима. Због често лажно-позитивних резултата наведених тестова за испитивање хепатотоксичности, појединачни узрочни лек не може да се са сигурношћу одреди, често пацијенти због лажно позитивног резултата теста морају доживотно да избегавају неколико лекова, најчешће нехепатотоксичних, и тиме непотребно ограничавају своје тераписке могућности за лечење других, озбиљних болести. Тако да на резултете ових тестова треба гледати са посебном обазривошћу.

1.2.9. Инкриминисани лек и лечење DILI-ја

DILI је комплексан клинички проблем са широким спектром манифестација које иду од асимптоматских благих биохемијских абнормалности до озбиљног хепатитиса са жутицом. При појави DILI-ја, очекивано би било искључити сумњиви лек из терапије или редуковати његову дозу, али ако је тај лек круцијалан у лечењу неког клиничког ентитета наставља се његова примена у пуној дози уз максималне мере предострожности. С друге стране, неки пацијенти са DILI-јем чак показују опоравак оштећења јетре без искључивања суспектног лека. Тако да пажљиво треба проценити да ли суспектни лек треба да буде обустављен из терапије, узимањем у обзир и важност тог лека у лечењу. У случају тешке форме DILI-ја који се презентује као акутни застој јетре са врло вероватним смртним исходом, практично једина терапијска могућност је трансплатациона хирургија¹⁰⁸. Не постоје јасни критеријуми за искључивање суспектног узрочног лека. Неки терапијски водичи предлажу да петоструко повећање вредности ALT-а изнад референтног опсега и одсуство симптома дозвољавају наставак примене суспектног лека уз повећан опрез, док 8 пута већа

вредност ALT-а указује да суспектни лек треба искључити из терапије^{109,110}, или ако уз скок ALT-а, постоји скок билирубина, значајан пад албумина, или поремећај тестова хемостазе⁸⁶. По Zimmermann-у, смртни исход је врло вероватан код пацијента који поред високог скока ALT-а има и клинички манифестну жутицу. Ну's (Хјуово) правило праћења DILI-ја каже да пораст ензима јетре (ALT или AST >3xULN или ALP > 1.5xULN) у комбинацији са порастом билирубина (>3x ULN) у било ком тренутку након увођења новог лека може да укаже на озбиљну повреду јетре и да суспектни лек треба да буде обустављен¹¹¹. Како се показало да је хепатоцелуларно оштећење јетре уз жутицу понекад фатално чак и ако је суспектни лек искључен из употребе, а да у неким случајевима када је испуњено Хјуово правило не долази увек до смртог исхода услед DILI-ја, и да велики број лекова може да изазове асимптоматски пораст ензима јетре без озбиљног оштећења јетре, благи пораст трансминаза не захтева увек повлачење узрочног лека из употребе. FDA је предложила да ALT > 8x ULN, ALT > 5 x ULN током 2 недеље, ALT > 3 x ULN у комбинацији са порастом серумског билирубина > 2 x ULN, пораст PT-INR >2x или постојање симптома оштећења јетре би требало да буду коришћени као предиктори озбиљне хепатотоксичности уз препоруку да се инкриминисани лек искључи из употребе^{34,35,40,78}. Хепатоцелуларно оштећење са жутицом треба лечити у интензивној нези Клинике за кардиологију и гастроентерохепатологију јер је врло често у питању озбиљно оштећење јетре са фаталним исходом, док се код холестатских DILI случајева често не обуставља лек, изузев ако се јаве симптоми везани за оштећење јетре, као што је жутица, пораст серумских билирубина (преко 3 x ULN) или продужен PT-INR (преко 1.5x ULN). Није било извешатаја о постојању терапије која би довела до побољшања, изузев примене Н- ацетилцистеина код хепатотоксичности узроковане ацетаминофеном. Кортикостероидна терапија може да се користи код DILI случајева са очигледном хиперсензитивношћу, али не постоје докази о њеној користи¹⁰⁸. Лечење DILI-ја укључује брзо искључивање суспектног лека из терапије. Позитивни dechallenge подразумева 50% смањење серумског ALT-а у оквиру 8 дана од повлачења лека из терапије у хепатоцелуларном типу оштећења, CIOMS/RUCAM критеријуми^{54,82}. С друге стране, за смањење билијарних ензима после искључивања инкриминисаног лека код холестатског типа оштећења је обично потребан дужи временски период. Међутим, временски период након обуставе лека није увек од помоћи у раној дијагностици и лечењу DILI-ја јер неки пацијенти захтевају промптну евалуацију и лечење DILI-ја при његовој првој појави.

1.2.10. Превенција и рано препознавање DILI-ја

Многи лекови могу да узрокују асимптоматску хепатотоксичност, скок вредности проширеног хепатограма без појаве било ког симптома који би указао на поремећај функције јетре. Иницијално пре укључивања новог лека, треба урадити проширени хепатограм, ехо абдомена и друге дијагностичке методе које би сугерисале постојање поремећаја функције јетре. Код пацијената са идиопатским абнормалностима тестова функције јетре прво би требало узети детаљне податке о узимању неког лека како у хоспиталним тако и у прехоспиталним условима, дозирању, начину примене, ранијем коришћењу препарата, ту спадају и разни суплементи и биљни препарати, употреби придружених лекова, конзумирању алкохола и постојању хроничних болести јетре. Чак позитивна породична анамнеза о појави нежељених реакција на лек може бити корисна у постављању дијагнозе DILI-ја⁶⁵⁻⁶⁸. При физикалном прегледу пацијенту треба проверити телесну температуру, присуство осипа или жутице. Посебно жутица треба пажљиво да се процени јер је то знак озбиљног оштећења јетре који указује на то да хитно треба обуставити примену суспектног лека. Трбало би обавити тестове функције јетре, укључујући серумске трансаминазе, ALP, GGT, билирубин укупни и директни, амилазе, као и хематолошке тестове који подразумевају број еозинофила и тестове коагулације. Класификација типа оштећења јетре би требало да се процени што раније јер су клинички ток, могућа етиологија и узрочни лекови другачији за различите типове оштећења. Серолошким тестовима, или ако је потребно imaging методама би требало искључити друге узрочнике, као што су вирусне инфекције, аутоимуне болести јетре, билијарне болести. DILI случајеви са озбиљним хепатитисом који показују пораст серумског билирубина на преко 3x ULN могу да доведу до инсуфицијенције јетре и требало би да се пажљиво третирају уз упућивање хепатологу након искључивања свих суспектних лекова. Мада случајна, поновна примена узрочног лека може да допринесе постављању дијагнозе DILI-ја, она може да доведе до озбиљног оштећења јетре и може чак да буде фатална, тако да се то не препоручује. Штавише, могућност за настанак DILI-ја треба да буде процењена коришћењем дијагностичких скоринг система, као што су CIOMS/RUCAM критеријуми. Међутим још увек не постоји сет дијагностичких критеријума који би представљао златни стандард. Иницијални третман обично подразумева обустављање даље примене лека. Ако узрочни лек не може да се обустави јер пацијент прима већи број лекова или је постојећа болест озбиљна, са лечењем може да се настави уз посебну

предострожност. Додатни тестови, као што су DLST, LMT, или тест продукције цитокина могу бити од користи приликом идентификације узрочног лека.

1.2.11. Закључак

DILI је јако комплексан проблем за клиничаре на Клиници за кардиологију због своје разнолике клиничке презентације и озбиљних последица по пацијента. Иако је оштећење јетре често благо и не захтева лечење ових пацијената, DILI може да доведе до озбиљног хепатитиса са смртним исходом. Тако да, адекватно иницијано лечење које подразумева и иницијално, промтно искључење лека или максимално смањење дозе, након добијања тачне дијагнозе је важно за лекаре. Иако је забележено да је инциденца DILI-ја у порасту тешко је одредити прецизну учесталост због недостатка глобалног система за праћење и недостатка златног стандарда за дијагнозу. Успостављање глобалног система за праћење нежељених ефеката лекова и успостављање златног стандарда за дијагнозу DILI-ја требали би да буду један од приоритета кардиолога, фармаколога, гастроентерохепатолога и других истраживача који се баве фармаковигиланцом. То би редуковало DILI и довело до практичних препорука и закључака у вези будућег третмана DILI-ја.

1.3. АМЈОДАРОН И DILI

1.3.1. Увод

Акутна хепатотоксичност је у данашње време један од највећих проблема фармаковигиланце и водећи узрок прекида терапије леком из безбедоносних разлога. Познато је да у клиничкој пракси амјодарон може да проузрокује нежељене ефекте на јетру, који се у неким случајевима испољавају и као права хепатотоксична реакција¹¹². Хепатички поремећаји изазвани амјодароном су најчешће асимптоматски и детектују се кроз повећање јетрених ензима и других биохемијских параметара крви. Повећање нивоа ензима јетре је најчешће хронично, умерено и реверзибилно, па мали број пацијената захтева прекид терапије амјодароном. Међутим, код неких болесника ови поремећаји су праћени и значајним клиничким симптомима и појавом озбиљних обољења као што су хепатитис, цироза или холестаза^{113,114}. У најтежој форми, описани су фатални исходи због хепатотоксичности изазване амјодароном¹¹⁵. У целини узев, клиничка испољавања хепатотоксичности амјодарона су варијабилна и то по учесталости, клиничким ентитетима, временском обрасцу јављања, патоанатомским карактеристикама и крајњим исходима као и одговору организма на укидање или наставак примене овог лека. Последишно, многи аспекти хепатотоксичности амјодарона нису довољно познати, посебно молекуларни механизам и интеракције са другим хепатотоксичним чиниоцима односно факторима који ово нежељено дејство могу да предиспонирају.

Имајући у виду епидемиолошке карактеристике, постоји интерес за детаљнијим увидом у опште и специфичне параметре морбидитета и морталитета амјодароном индуковане лезије јетре. Наиме, процена преваленце оштећења јетре је врло широка, у распону од 2.2-50%, што је сазнање које је, само по себи а без увида у друге придружене факторе, од малог значаја за лекаре практичаре. С друге стране, познавање инциденце у специфичним субпопулацијама болесника, као што су хоспитализовани болесници, је од посебног интереса, а о томе, за сада нема довољно валидних података. Други, мање познати чиниоци или разлике у методолошком приступу, могу бити од пресудног значаја за детекцију овог нежељеног дејства амјодарона. Примера ради, у једној студији критеријум за идентификовање хепатотоксичности амјодарона су били крупни клинички догађаји (појава искључивања амјодарона или смањења његове дозе) тако да су друге релевантне околности нпр. препознати или асимптоматски случајеви, биле изван домашаја те студије. Дакле, дијагноза овог нежељеног дејства би

требала да се заснива не само на клиничким критеријумима већ и на детекцији специфичних биомаркера хепатоцелуларног и/или холестатског оштећења пре него што се учини епидемиолошка анализа која ће дати поуздане податке.

1.3.2. Биомаркери

ОТС је ензим који катализује реакцију стварања цитрулина из л-орнитина и карбамоил фосфата у јетри и танком цреву. Ген за ОТС је лоциран на кратком краку X хромозома (Xp11.4)¹¹⁶. Код сисара готово у потпуности се налази у митохондријама хепатоцита и део је циклуса урее. Његова активност се повећава како у акутној тако и хроничној болести јетре. Висока концентрација ензима ОТС у ткиву јетре у односу на друга ткива указује на то да је ензим специфичан за јетру а минимални степен оштећења хепатоцита врло брзо ствара детектабилно повећање ензима у крви.

Жучне киселине су хидроксилирани стероиди који се стварају у јетри од холестерола и регулишу енергетску хомеостазу, активирају нуклеарне рецепторе и сигналне путеве у ћелији и контролишу ћелијску пролиферацију и инфламаторне процесе у јетри и гастроинтестиналном тракту. Жучне киселине су највћа органска једињења синтетисана из холестерола важна за апсорпцију липида из GIT-а¹¹⁷. Последично, промене у метаболизму жучних киселина могу бити биохемијски параметар оштећења јетре^{118,119}.

Улога предиспонирајућих чинилаца за настанак амјодароном индуковане хепатотоксичности је такође недовољно јасна. Зна се да је ово нежељено дејство, већином дозно-зависно тако да су примена већих доза, продужена терапија и укупна кумулативна доза препознати додатни фактори ризика. Познате су и разлике између фармацеутских облика лека. Хепатотоксичност након интравенске примене амјодарона најчешће се одвија по обрасцу различитом од оног након оралне формулације, јер чешће има акутни, нагли почетак, тежи клинички ток и неповољнији исход¹²⁰. Код оралне формулације лека почетак је постепен, патогенетски процес дуготрајан и асимптоматски, симптоми и знаци се јављају касно, и завршава се најчешће микронодуларном цирозом јетре узрокованом ниским дневним дозама оралног амјодарона у дужем периоду¹³. С друге стране, улога других важних клиничких фактора попут старости, пола, нутритивног статуса, придружених кардиолошких и других болести, тежине основног обољења и коморбидитета, лекова и других сличних чинилаца у развоју амјодароном индуковане хепатотоксичности, као и њихове међусобне интеракције, је скоро непозната. То је један од разлога да је тачна магнитуда

ризика од оштећења јетре амјодароном скоро потпуно непозната што захтева даље студије циљаног дизајна укључујући и фармакоепидемиолошке методе¹⁸.

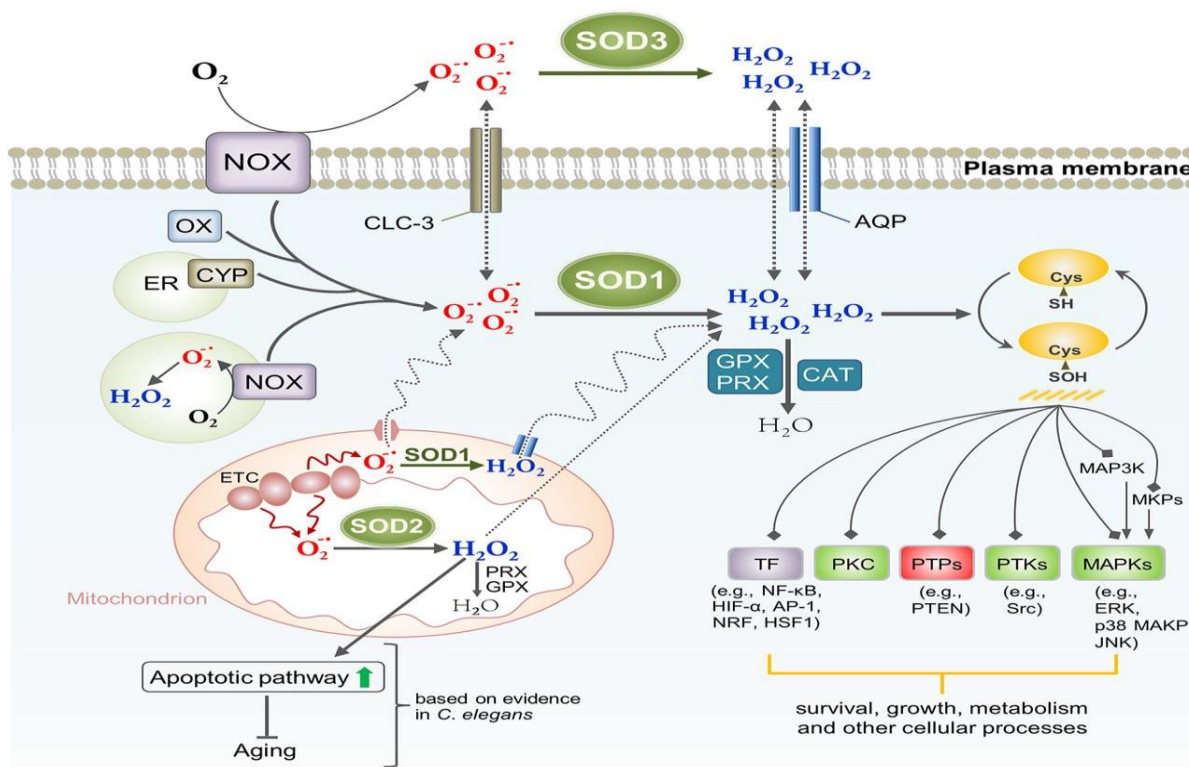
1.3.3. Патогенеза DILI-ја узрокованог амјодароном

Поједини аспекти патогенезе, а посебно молекуларних механизма, у развоју хепатотоксичности амјодарона су непознати. Амјодарон се акумулира у ткивима и ћелијама, оштећујући фосфолипидне мембране, лизозиме и митохондрије. Идиосинкразија, хиперсензитивност, токсичност на ексципијенс (код интравенске формулације) и исхемија због пропратне кардиоваскуларне депресије су неки од претпостављених, али значајем и ближим сигналним путевима, недовољно расветљених механизма токсичности. Познато је да амјодарон може да блокира фосфолипазу А, ензим важан за метаболизам фосфолипидних мембрана, али је утицај на друге сигналне молекуле слабо познат. Зна се да амјодарон повећава синтезу водоник пероксида (H_2O_2) што доводи до стања оксидативног стреса као што је нпр. липидна пероксидација¹²¹. Дакле, утицај на ензиме који синтетишу прооксидативне или антиоксидативне ендogene супстанце су један од могућих и још увек недовољно расветљених механизма.

1.3.4. SOD 2

Неколико студија је доказало повезаност токсичних ефеката амјодарона и активности супероксид дизмутазе (SOD), важног ензима одбране од оксидативног стреса, као нпр. код индукције плућне фиброзе¹²² или оштећења појединих ћелијских линија¹²³. С друге стране, амјодарон није мењао активност SOD у еритроцитима узорака крви у студији серије малог броја болесника¹²⁴. Разлике у опсервираним ефектима амјодарона могле би добрим делом да потичу од различите ткивне и/или целуларне дистрибуције појединачних форми овог ензима у ткивима. Наиме, супероксид дизмутаза се јавља у три форме, које су детерминисане са три различита гена: солубилна (SOD1), митохондријална (SOD2) и екстрацелуларна (SOD3) (Слика 4).

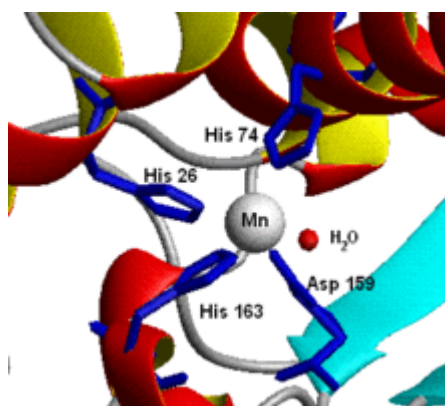
Слика 4. Солубилна, митохондријална и екстрацелуларна SOD



слика преузета из рада: [Wang Y, Branicky R, Noë A, Hekimi S. Superoxide dismutases: Dual roles in controlling ROS damage and regulating ROS signaling. *J Cell Biol* 2018;217\(6\):1915-1928. doi: 10.1083/jcb.201708007.](#)

Селективно дејство амјодарона на поједине изоформе није довољно испитано те се за сада не може искључити. Имајући у виду чињенице о ткивној и субцелуларној локализацији амјодарона, претпоставка да се токсични целуларни ефекти амјодарона остварују примарно или већим делом путем митохондријалне форме, SOD2, чини се врло вероватном (Слика 5).

Слика 5. Активно место хумане Mn супероксид дисмутазе (SOD2)



преузето са: https://en.wikipedia.org/wiki/Superoxide_dismutase

Додатни фактори би такође могли утицати на дејство амјодарона на SOD, а један од њих је и генетски полиморфизам. Генетске варијанте постоје код сва три SOD ензима, а у појединим случајевима показано је да оне имају значајне токсиколошке аспекте. Тако је нпр. у једној студији откривено да су варијације SOD1 биле значајно повезане са ризиком од појаве хепатотоксичности антитуберкулотика¹²⁵. Слично, генетска мутација SOD2 која на позицији 16 пептидног ланца узрокује замену валина и аланина, је значајно чешће удружена са појавом хепатотоксичности узроковане медикаментима⁶⁸. С друге стране, варијанта SOD3 ензима није утицала на фармаколошке особине три цитостатска медикамента већ генетске мутације NAD(P)H дехидрогеназе, хинон 1 ензима¹²⁶. Према подацима из доступне литературе, утицај генетског полиморфизма SOD ензима на могућу токсичност амјодарона, укључујући и оштећење јетре, до сада није испитиван. Наиме, у поменутој студији у којој је указана веза SOD2 полиморфизма и хепатотоксичности лекова само код 12% болесника узрок оштећења јетре су били кардиоваскуларни лекови, а ни код једног сам амјодарон⁶⁸. Сходно наведеном, испитивање утицаја генетског полиморфизма SOD2, самостално и удружено са другим потенцијалним факторима ризика који се могу установити у клиничким условима на појаву хепатотоксичности удружене са употребом амјодарона је теоријски утемељено. Додатно, резултати таквог истраживања, подупрети епидемиолошким подацима, би имали практични значај на пољу превенције нежељених дејстава лекова у клиничкој пракси.

1.3.5. Клиничка, патоанатомска и лабораторијска презентација DILI-ја узрокованог амјодароном

Неуобичајна форма DILI-ја је микровезикуларна масна јетра која може да настане услед примене амјодарона¹²⁷⁻¹²⁹. Ова форма DILI-ја се карактерише накупљањем микровезикуларне масти у хепатоцитима и смањењем броја митохондрија. Ово оштећење може последично да прогедира до макровезикуларне масне јетре са фокалном некрозом, фиброзом, холестазом и пролифеацијом жучних путева¹²⁷. Клинички, пацијенти са леком изазваном митохондријалном токсичношћу могу имати повраћање, губитак тежине и умор. Лабораторијски тестови често показују присуство хипергликемије, хиперамонијемije, лактатне ацидозе, али само благи пораст серумског ALT-а^{128,129}.

Као што је истакнуто од стране Mattar и сарадника, највећи број случајева оштећења јетре узрокованог амјодароном је ограничен на симптоматски скок трансaminaза који

се повлачи или спонтано или након редукције дозе. Они су испитивали употребу амјодарона у популацији од 409 пацијената за које се претпостављало да могу да буду у већем ризику за токсичност због већ постојећих поремећаја јетре услед метаболичког синдрома, повећане употребе статина и у великом броју случајева срчане инсуфицијенције. Насупрот очекивањима није било случајева клиничког хепатитиса, цирозе или смртог исхода узрокованих терапијском применом амјодарона у посматраној популацији током просечног периода посматрања од три године¹³⁰. Слично, већ постојећа дисфункција јетре није имала предиктивни значај у скоку трансaminaза у популацији од 720 кинеских пацијената. Кум и сарадници су показали не само да је велики део њихове популације пацијената који узима амјодарон имао абнормалност ALT-а у основи већ и да инциденца значајне дисфункције јетре није била статистички значајно различита код пацијената са или без почетног повећања ALT-а¹³¹. Хистолошке промене у јетри које се јављају код пацијената који конзумирају алкохол су веома сличне онима код пацијената који примају амјодарон^{132,133}. Као и алкохол амјодарон у различитом степену може да изазове микростеатозу, апоптозу и некрозу хепатоцита. За амјодарон се може показати да има дозно зависни ефекат на јетру при чему постоје разлике у сензитивности на оштећење у оквиру популације¹²⁴. Када се користи у малим дозама, амјодарон слично алкохолу изазива токсичност само при необичним околностима, иако се кумулативна доза најчешће наводи као индикатор повећаног ризика за хепатотоксичност. Mattar и сарадници су користећи своју и претходне студије правилно закључили да кумулативна доза нема велики утицај на преваленцу хепатотоксичности узроковане амјодароном^{124,130,134}. Због полуживота од 55 дана амјодарону је потребно 6-8 месеци да постигне равнотежно стање тј. да количина лека која се унесе у организам буде једнака количини која се елиминише¹³⁵, што је временски оквир на основу ког се базира већина студија која проучава везу између кумулативне дозе и токсичности. Временски период током ког кумулативна доза показује неку повезаност са утицајем на јетру може да се продужи и на преко осам месеци у зависности од индивидуалних карактеристика пацијента, фармакокинетики, промене телесне тежине, интеракције међу лековима или чак аутоинхибиције метаболизма. Међутим кумулативна доза само сумира брзину дозирања и време примене лека док се прави ризик изложености оштећењу најбоље процењује праћењем значајних промена које настају током постојања равнотежног стања концентрације лека. Лекари ово примењују као уобичајну процедуру за антиепилептике и дигоксин али због претерано великог временског опсега који је узрокован фармакокинетиком амјодарона велики део лекара одбија праћење амјодарона као безбедоносну меру. У

извештајима који сумирају све публикације у којима се помиње хепатотоксичност процена скока трансминаза узрокованог амјодароном варира између 4-50% пацијената. Међутим у новијим извештајима се долази до закључка да је проценат много већи од 4% ¹¹². Хепатотоксичност која прати оралну примену амјодарона се јавља у 1-3% пацијената док је она која се јавља током интравенске примене амјодарона ретка али може бити повезана са драматичним скоком трансминаза ¹³⁶. Презентација акутне хепатотоксичности варира од благо асимптоматског скока серумских трансминаза до фулминантне инсуфицијенције јетре. Акутна хепатотоксичност која прати интравенску примену амјодарона је ретка и јавља се годишње у око 1% случајева који примају интравенски амјодарон и може да доведе до фаталног исхода. Huang и аутори су приказали своје искуство са 802 пацијента који су примали интравенски амјодарон код којих се хепатотоксичност јавила у 12.6 % (101 од 802 пацијента) од којих су многи случајеви хепатотоксичности били благи ¹³⁷. Код њих се озбиљан скок трансминаза јавио у 1,1% (n=9), што је 8.9% од свих са скоком трансминаза ¹³⁷. Често исхемија јетре која је узрокована хемодинамском нестабилношћу до које доводи најчешће аритмија абсољута или срчана инсуфицијенција код кардиолошких пацијената може да потпомогне настанку хепатотоксичности узроковане амјодароном ^{2,112}. Gluck и аутори су показали сличности у хистолошкој слици кардијалне јетре и хепатотоксичности узроковане амјодароном ¹⁸. Доступна литература тврди да амјодарон може безбедно да се примењује оралним путем чак и код пацијената који су развили хепатитис услед претходне интравенске примене амјодарона ^{137,138}.

1.4. ДОПРИНОС СТУДИЈЕ

Очекује се да ће ова студија омогућити детаљнију анализу повезаности нових и до сада недовољно испитаних фактора ризика као и утицај комбинације ових прогностичких фактора на појаву хепатотоксичности код пацијената који су истовремено и лечени амјодароном. Очекивани резултати студије показују да су неки од до сада непознатих фактора ризика повезани са настанком хепатотоксичности код особа које истовремено узимају амјодарон. Такође, биће могуће идентификовати и евентуалне протективне чиниоце и предиспонирајуће факторе ризика на основу вредности укрштеног односа шансе. Од посебног интереса је сагледавање утицаја полиморфизма гена за SOD2 ензим који учествује у оксидативној одбрани, као и других клиничких фактора који су до сада недовољно испитивани. Ова сазнања ће створити теоријску основу за даље практичне кораке у циљу елиминисања фактора ризика, редукције инциденције болести, смањења морбидитета и морталитета а самим тим и трошкова лечења који представљају значајно оптерећење за здравствени систем. С обзиром да су подаци у доступној литератури за дату популацију болесника оскудни и често контроверзни, очекује се да ће резултати студије представљати оригинални допринос у области расветљавања механизма и значаја хепатотоксичности удружене са употребом амјодарона код хоспитализованих болесника.

2.0. ЦИЉЕВИ И ХИПОТЕЗЕ СТУДИЈЕ

2.1. ЦИЉЕВИ СТУДИЈЕ

Примарни циљеви ове студије су следећи:

1. одређивање значајности и магнитуде утицаја амјодарона на појаву новонастале хепатотоксичност код болесника са кардиоваскуларним болестима лечених у болници, без претходне лезије јетре, а који примају амјодарон;
2. одређивање прогностичког значаја додатних, до сада недовољно испитаних фактора ризика за настанак хепатотоксичности код болесника са кардиоваскуларним болестима лечених у болници, без претходне лезије јетре, а који примају амјодарон;
3. анализа утицаја генетског полиморфизма супероксид дизмутаза 2 (SOD2) на појаву хепатотоксичности код болесника са кардиоваскуларним болестима лечених у болници, без претходне лезије јетре а који примају амјодарон.

Додатни циљ истраживања је био и одређивање општих и специфичних епидемиолошких параметара морбидитета у вези са хепатотоксичношћу изазване амјодароном. Међутим, због недостајања многих података, увидом у историје болести, није било могуће прикупити поуздане информације у укупном броју DILI-ја и укупном броју изложених, те тај циљ није било објективно могуће достићи.

2.2. ХИПОТЕЗЕ СТУДИЈЕ

1. кардиолошки пацијенти представљају популацију пацијената коју одликују многе карактеристике које су у суштини фактори ризика за лезију јетре, посебно лекови, поједине социо-демографске карактеристике и коморбидитети код лечених болесника, при чему је утицај амјодарона значајан, доминантан у односу на друге лекове и независтан од других чинилаца;

2. присуство срчане слабости тешког степена представља значајнији предиспонирајући фактор за појаву хепатотоксичности него присуство других хепатотоксичних ризика код болесника са кардиоваскуларним болестима лечених у болници, без претходне лезије јетре, а који примају амјодарон;

3. генетска мутација SOD2 која на позицији 16 пептидног ланца узрокује замену валина и аланина, је значајно чешће удружена са појавом хепатотоксичности код болесника са кардиоваскуларним болестима лечених у болници, без претходне лезије јетре, а који примају амјодарон.

Једна од хипотеза у иницијалном плану студије је била да је преваленца асимптоматских и клинички манифестних облика лезије јетре код болесника са кардиоваскуларним болестима лечених у болници без претходне хепатичне лезије и који примају амјодарон виша од 30% што ову субпопулацију болесника сврстава у високоризичну категорију за појаву хепатотоксичности. Имајући у виду наведено у циљевима студије, таква хипотеза није могла да буде и доказана због присуства недовољно поузданих или одсутних података у анализираним историјама болести због чега није било могуће прикупити поуздане информације о укупном броју DILI-ја и укупном броју изложених.

3.0. МАТЕРИЈАЛ И МЕТОД

3.1. ВРСТА СТУДИЈЕ

Истраживање је спроведено у два дела од којих је један обухватио ретроспективно прикупљање података и последичну анализу са једним опсервационим дизајном, студија типа „случај-контрола“ (појава хепатотоксичности), и други који је био проспективна контролисана студија, дизајнирана према кохорти болесника који имају хепатотоксичност и примају амјодарон^{18,139}. Истраживање је спроведено у Клиници за кардиологију Клиничког центра „Крагујевац“ у Крагујевцу, према етичким принципима научно-истраживачког рада а по одобрењу надлежног Етичког одбора.

У иницијалном плану студије планирано је било да студија има два опсервациона дизајна, студије типа „случај-контрола“ (појава хепатотоксичности) и кохортне студије (изложеност фактору ризика-амјодарону). Због разлога наведених у циљевима и хипотезама студије, а посебно због недостајућих и недовољно поузданих података за одређени број испитаника о дози, начину примене, DDD амјодарона, тачном датуму увођења и искључивања амјодарона у хоспиталним условима у доступној медицинској документацији, објективно није било могуће сврстати кохортни део студије а да се добију валидни резултати.

3.2. СТУДИЈСКА ПОПУЛАЦИЈА

Студијска популација је обухватила особе са кардиоваскуларним болестима лечене у Клиници за кардиологију Клиничког центра „Крагујевац“ у Крагујевцу. На основу исхода тј. дијагнозе хепатотоксичности, као и примене амјодарона, болесници су били распоређивани у групе сходно студијском дизајну и то група „случај“ (ретроспективна студија „случај-контрола“), експериментална“ група (проспективна контролна студија), и одговарајуће контролне групе.

Иницијални план студије је предвиђао и распоређивање испитаника у групу „ризик“ (ретроспективна кохортна студија) и њој припадајућу контролну групу, али због разлога напред наведених тај део студије објективно није могло да буде спроведен.

3.2.1. Узорковање студијске популације

3.2.1.1 Ретроспективна опсервациона студија

Укупну доступну популацију су чинили болесници лечени од кардиоваскуларних обољења у поменутој установи, у периоду од 10 година, 2014.г.-2005.г. Из доступне популације болесника, сукцесивно, ретроактивно, почев од најскоријег временског интервала су укључивани сви случајеви клинички манифестне хепатотоксичности, који задовољавају укључујуће а немају искључујуће критеријуме. За сваки одабрани случај, одабрана су три контролна испитаника тако што су, почев од дана када је код датог болесника у групи случаја идентификована хепатотоксичност, одабране особе истог пола, унутар сличне старосне категорије (до две године млађи или старији) сукцесивно, ретроспективно, а према укључујућим и искључујућим случајевима за контролну групу. Одабир болесника се вршио на описани начин до броја прорачунатог за укупни студијски узорак. Целокупна популација таквих болесника је чинила ретроспективну кохорту, унутар које је формирана студија са дизајном „случај контрола“.

3.2.1.2. Проспективна контролисана студија

Укупна доступна популација су били болесници који су се актуелно, у тренутку извођења студије, лечили у хоспиталном одељењу Клинике за кардиологију Клиничког центра „Крагујевац“, у Крагујевцу, а који у тренутку хоспитализације нису имали симптоме и знакове акутне или хроничне лезије јетре. Током хоспитализације идентификовани су болесници са појавом хепатотоксичности који су примали амјодарон („експериментална група“) и њима су били придружени болесници који нису примали амјодарон и који нису имали хепатотоксичност („прва контролна група“) као и болесници који су примали амјодарон и који нису имали хепатотоксичност („друга контролна група“). За сваки одабрани случај су одабрана по два контролна испитаника тако што су биле одабране особе истог пола, унутар сличне старосне категорије (до две године млађи или старији) до броја предвиђеним прорачуном студијског узорка.

Друга контролна група је укључена с обзиром да једном контролном групом нису могли да буду обухваћени сви пацијенти који су под ризиком за настанак

амјодароном индуковане хепатотоксичности, као и да се свеобухватније сагледа утицај генотипа SOD2 на испољавање хепатотоксичне реакције.

3.2.2. Критеријуми за укључивање

Критеријуми за укључивање су били општи, за студије оба дизајна („случај контрола , и проспективни контролни “) као и специфични за студијски дизајн.

3.2.2.1. Општи критеријуми за укључивање у истраживање

- о болесник мушког или женског пола, старости од 18 до 75 година;
- о болесник лечен у Клиници за кардиологију Клиничког центра „Крагујевац“ у Крагујевцу

3.2.2.2. Критеријуми за укључивање у групу „случај“ опсервационог дизајна

- о припадност одабраној, ретроспективној кохорти;
- о болесник са клинички значајном хепатотоксичношћу током боравка у болници а која је идентификована као било које од следећег: пораст ензима јетре за више од три пута од горње границе референтних вредности, тотални билирубин виши од два пута од горње границе референтних вредности и/или клинички манифестни симптоми акутног оштећења јетре (бол испод десног ребарног лука, мука, гађење, повраћање, иктерус, хеморагични синдром, болови у абдомену, хепатомегалија).

3.2.2.3. Критеријуми за укључивање у „експерименталну групу“ проспективне студије

- о болесник са клинички значајном хепатотоксичношћу током боравка у болници а која је идентификована као било које од следећег: пораст ензима јетре за више од три пута од горње границе референтних вредности, тотални билирубин виши од два пута од горње границе референтних вредности и/или клинички манифестни симптоми акутног оштећења јетре (бол испод десног ребарног лука, мука, гађење, повраћање, иктерус, хеморагични синдром, болови у абдомену, хепатомегалија);
- о болесник који прима амјодарон.

3.2.2.4. Критеријуми за укључивање у контролне групе

Критеријуми за укључивање у контролне групе, укупно три (две за проспективну контролну и једна за ретроспективну кохорту), следили су опште и специфичне критеријуме за дати дизајн са претходно описаним разликама у односу на групу „случаја“ (одсуство хепатотоксичности) и „експерименталну“ групу (одсуство примене амјодарона и хепатотоксичности - прва група и примена амјодарона и одсуство хепатотоксичности - друга контролна група).

3.2.3. Критеријуми за неукључивање у студију

- о болесници оба пола, млађи од 18 и старији од 75 година;
- о болесници са дијагностикованим оштећењем јетре, акутног или хроничног карактера, стање после вирусног хепатитиса Б, Ц, цироза јетре, Вилсонова болест, порфирија, алфа-1 антитрипсин дефицијенција, примарна билијарна цироза, примарни склерозирајући холангитис, наркоманија на пријему;
- о болесници са билијарном калкулозом, холециститисом, панкреатитисом;
- о болесници са траумом абдомена;
- о етилизам, алкохолни индекс $AST/ALT > 2$, на пријему;
- о болесници са високим вредностима AST, ALT, GGT, ALP, билирубин укупни, билирубин директни, ниске вредности тромбоцита, на пријему.

3.2.4. Критеријуми за искључивање из проспективне, контролне студије

У узорцима крви болесника су накнадно одређиване концентрације додатних биомаркера хепатотоксичног оштећења, који се не одређују у условима рутинске клиничке праксе, али су неопходни у претклиничким и клиничким истраживањима која се тичу појава оштећења јетре лековима (DILI-Drug-Induced Liver Injury) (препоруке Европске агенције за лекове, www.ema.europa.eu). Сходно томе, из студије су били накнадно искључени болесници код којих је установљено следеће:

- о одсуство потврде хепатоцелуларног и/или хепатобилијарног оштећења потврдним анализама биомаркера, за болеснике у „експерименталној“ групи;
- о присуство хепатоцелуларног и/или хепатобилијарног оштећења установљено потврдним анализама биомаркера, за болеснике у контролним групама.

3.3. ПЛАН СТУДИЈЕ

Студија је спроведена у Клиници за кардиологију Клиничког центра „Крагујевац“ у Крагујевцу. У ретроспективној студији, студијску популацију су чинили пацијенти који су лечени у клиници у протеклих десет година а подаци су прикупљани увидом у историје болести пацијената. Кључни догађај у овој студији је била појава нове, акутне лезије јетре, тако да су такви болесници били сврстани у групу „случај“ а њима су били придружени болесници без те лезије, у групи контрола. Даљи клинички исходи осим фаталног исхода (након појаве хепатотоксичности) нису били предмет овог истраживања тако да су болесници у проспективној студији били праћени до узорковања крви и прикупљања свих потребних података, а у ретроспективној кохорти закључно са датумом појаве акутне лезије јетре. У проспективну студију су били укључивани болесници код којих се током хоспитализације појавила акутна лезија јетре, као и у ретроспективној студији, који су примали амјодарон и њима су били придружени болесници без такве лезије који не примају амјодарон а који су чинили прву контролну групу, као и болесници без такве лезије јетре који примају амјодарон а који су чинили другу контролну групу.

3.4. СТУДИЈСКЕ ПРОЦЕДУРЕ

3.4.1. Узорковање крви, одређивање биомаркера хепатотоксичног оштећења и генетски полимиорфизам SOD2

Узорци крви болесника су се користили ради одређивања биомаркера хепатотоксичног оштећења и генетског полимиорфизма SOD2, а само за проспективну, контролисану студију. Током болничког лечења, а симултано са узорковањем за рутинске хематолошке и биохемијске анализе, према ординацији и клиничкој процени надлежног кардиолога, крв је узоркована у додатне две епрувете, у запремини од по 10 ml. Једна епрувета је центрифугирана а издвојени серум се чувао замрзнут, на -20°C, до одређивања орнитин карбамоилтрансферазе (ОТС), маркера хепатоцелуларног оштећења и укупних жучних киселина (Total Bile Acids - ТВА), маркера холестазног (хепатобилијарног) оштећења. ОТС је био одређиван ензимским имуносорбентим тестом („Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay“-ELISA) методом а ТВА спектрофотометријском методом на стандардном биохемијском анализатору.

Методолошки приступ за одређивање ОТС и ТВА је заснован на претходно публикованим студијама где су коришћене дате методе у циљу детекције хепатичког оштећења у клиничким условима^{140,141}. Концентрација орнитил-карбамоил трансферазе (Ornithine Carbamoyl Transferase) у серуму одређивана је сендвич ELISA методом (ElabScience), према протоколу произвођача. Крв је узоркована у прокоагулационе епрувете и остављана пола сата на собној температури. Након тога крв је центрифугирана на 3000 g у трајању од 15 минута и издвајан је серум који је чуван на -20°C до извођења есеја. Због очекиваних виших вредности, серуми су дилуирани у односу 1:5 са дилуентом обезбеђеним у киту, а резултат који је прочитан на 450 nm, је множен овим корективним фактором. Концентрација укупних жучних киселина–ТВА (Total Bile Acid) одређена је спектрофотометријски према протоколу. Крв је узоркована у прокоагулационе епрувете и остављена пола сата на собној температури. Након тога крв је центрифугирана на 3000 g у трајању од 15 минута и издвојен серум који је чуван на -20°C до извођења есеја. Акоришћени реагенси су tio-NAD 0.9 gr/l, NADH 6 gr/l и 3 α -HSD 12 500U/L. У присуству tio-NAD, ензим 3 α -HSD претвара жучне киселине у 3-кето стероиде и tio-NADH. Реакција је реверзибилна и може да се одвија и у супротном смеру. У присуству вишка NADH ензимски циклус се ефикасно дешава и брзина формирања tio-NADH је одређена мерењем специфичне промене апсорбанце на 405nm². Минимална запремина узорка је 0.5ml а обртно време један дан. Други узорак крви је коришћен за екстракцију ДНК и потоњу анализу генетског полиморфизма SOD2 ради утврђивања присуства Val16Ala варијанте (rs4880) сходно претходно описаним методама такође коришћеним у клиничким студијама^{65,142}.

3.4.2. Анализа каузалности хепатотоксичности лекова

Могућа узрочност лека са акутним оштећењем јетре је била процењена за сваког болесника коришћењем Нарањо скала, општег упитника за одређивање каузалности нежељених дејстава лекова као и CIOMS/RUCAM скале, упитника који је специфично дизајниран за процену каузалитета хепатотоксичности лекова, биљних принципа и других ксенобиотика. Оба ова упитника су већ коришћена у бројним клиничким студијама и валидирана су као признати метод процене каузалитета нежељених реакција на лекове^{51,87}.

3.4.3. Класификација и ниво употребе лекова

Лекови су били класификовани према АТС класификацији Светске здравствене организације (http://www.whocc.no/atc_ddd_index). Изложеност болесника лековима за које је процењено да постоји значајна вероватноћа каузалитета са оштећењем јетре је била изражена у дефинисаним дневним дозама на 1000 болесничких дана.

3.4.4. Допунска клиничка дијагностика

Током проспективне, контролисане студије користили су се детаљни подаци допунске, клиничке дијагностике која је од значаја за варијабле истраживања, а која је спровођена сходно клиничкој процени надлежног кардиолога. Подаци рутинских биохемијских анализа, ултразвучних и других прегледа су коришћени ради ближе класификације кардиолошких поремећаја од значаја за удруженост са хепатотоксичношћу, посебно присуства и стадијума срчане инсуфицијенце (ЕКГ налаз, ејекциона фракција, рго-BNP, вредности тропонина и миокардијалних ензима, налази коронарографије и друго), као и ултразвучна валидација хепатотоксичности (хепатобилијарна сонографија, доплер крвних судова јетре и друго), како је прикладно за датог болесника. Основни циљ допунске дијагностике је поуздана идентификација присуства хепатотоксичности одн. њене одсутности (зависно од студијске подгрупе). С тим у вези, све поменуте методе нису морале бити коришћене код сваког појединачног болесника (посебно за податке ретроспективне кохорте). Категоризација болесника према присуству одн. одсуству хепатотоксичности је била обављана на основу консензуса клиничке процене најмање два истраживача студије и ординирајућег кардиолога, од којих је бар један специјалиста гастроентерохепатологије.

3.5. ВАРИЈАБЛЕ ИСТРАЖИВАЊА

Варијабле истраживања су класификоване у две групе: зависне и независне. У групи зависних и независних варијабли, одређена је по једна примарна варијабла и више секундарних варијабли. Дефинисане су, такође, и збуњујуће варијабле за које се зна да могу да модификују утицај амјодарона на примарни исход попут његове дозе или друга придружена кардиолошка и друга обољења^{124,130}.

Примарна зависна варијабла било је присуство хепатотоксичности.

Секундарне зависне варијабле су биле следеће:

- о вредности хепатичких параметара, изражене као континуирана нумеричка варијабла, у одговарајућим јединицама;
- о морфолошке лезије јетре, изражене као бинарна, категоријална варијабла;
- о клинички преглед: хепатомегалија, бол у пределу јетре;
- о ултразвучни налаз који указује на акутну лезију јетре;
- о налаз визуализационе дијагностике (СТ, MSCT, MRI) који указује на акутну лезију јетре;
- о налаз ERCP који указује на акутну лезију јетре;
- о вредности других биохемијских параметара крви: протеини, глукоза, уреја, креатинин, триглицериди, холестерол, електролити и друго.

Примарне независне варијабле биле су:

- о присуство Val16Ala полиморфизма (rs4880) SOD2, у проспективној, контролисаној студији;
- о узимање амјодарона.

Секундарне независне варијабле биле су следеће:

- о кумулативна доза амјодарона, до индексног дана;
- о начин примене амјодарона;
- о дефинисана дневна доза амјодарона на 100 болесничких дана;
- о време узимања лека, у односу на оброк;
- о болест миокарда;
- о степен срчане инсуфицијенције изражено као ејекциона фракција;
- о срчана фреквенца;
- о тип коронарне болести;
- о врста аритмије;

- o артеријска хипертензија;
- o болест перикарада;
- o старост пацијента;
- o пол;
- o респираторна инсуфицијенција;
- o гојазност;
- o нефротски синдром;
- o хипотермија;
- o ниво образовања и социјални статус;
- o занимање и радно место;
- o дијететске навике болесника
- o поремећај ацидобазне равнотеже;
- o пушење и напаци са кофеином;
- o брзина перисталтике црева;
- o хронична бубрежна инсуфицијенца;
- o дијететски суплементи, биљни препарати и други лекови у слободној продаји (“over the counter“)

Збуњујуће варијабле биле су следеће:

- лекови за које се зна да имају изражен хепатотоксични потенцијал (нпр. хиполипемиси, парацетамол, дантролен, сулфонамиди, валпроат, карбамазепин, нестероидни антиинфламаторни лекови, хлорпромазин, амоксицилин плус клавуланска киселина, сулфасалазин, флуклоксацилин, бетахистин, азатиоприн, хлорфенирамин, макролидни антибиотици, тетрациклини, метоклопрамид, антиепилептици и диклофенак¹⁴³).
- o присуство обољења или стања за које се зна да је удружено са значајном хепатотоксичношћу (цироза јетре, портна хипертензија, масна дегенерација, карцином јетрених ћелија, конгениталне аномалије, цистицеркоза, апсцес);
- o дијагностичко-терапијске процедуре за које се зна да могу узроковати лезију јетре (ендоскопска ретроградна холангиопанкреатографија; аспирациона биопсија јетре);
- o унос алкохола и психоактивних супстанци;
- o тровање, узимање печурки које изазивају некрозу хепатоцита (нпр. зелена пупавка);
- o изложеност хепатотоксинима радне средине;

3.6. ЕТИЧКИ И ОРГАНИЗАЦИОНИ АСПЕКТИ СТУДИЈЕ

Студија је спроведена као академско и непрофитно истраживање, према принципима Добре клиничке праксе и Хелсиншке декларације. Пре спровођења студије протокол истраживања и друга потребна документа су била достављена ради мишљења, одобрења, надлежном етичком одбору, Етичком одбору Клиничког центра „Крагујевац“. Истраживачи у студији су били квалификовани медицински експерти, са искуством у области: клиничке фармакологије, интерне медицине са усмерењем за кардиологију и за гастроентерохепатологију, истраживачи доктори медицине. Финансијски аспекти истраживања су били усклађени са стандардима уобичајеним за домаћа академска истраживања и сходно некомерцијалној природи студије, усмерени на обезбеђивање материјалних трошкова.

3.7. СНАГА СТУДИЈЕ И ВЕЛИЧИНА УЗОРКА

3.7.1. Статистичка анализа

Статистичка анализа је обухватала прорачун величине узорка и статистичку обраду прикупљених података.

3.7.2. Прорачун величине студијског узорка

Прорачун студијског узорка је учињен за проспективну и ретроспективну студију посебно, коришћењем одговарајућег рачунарског програма, уз алфа грешку од 0.05, снагу студије 0.8, дихотомно обележје посматрања (χ^2 -тест)¹⁴⁴. Очекивана разлика у примарним варијаблама је одређена на основу ранијих студија и прелиминарне анализе.

Прорачун студијског узорка у ретроспективној кохорти је заснован на подацима прелиминарног увида у учесталост хепатоксичности, по дизајну пресека, на одељењу кардиологије КЦ Крагујевац. Од прегледаних болесника око трећина је имала симптоме и/или знакове лезије јетре а међу њима 42.5% је примало амјодарон. Код осталих болесника, без лезије јетре, учесталост примене амјодарона је била нижа за око 10% (32.5%) тако да је улазни количник шансе био 1.49 а однос 1:3 броја испитаника у две групе. Резултат прорачуна је одредио 280 испитаника у експерименталној групи и 840 у контролној, што чини укупни студијски узорак од 1120 болесника. План студије је предвиђао спровођење међуанализе и критеријум за даље укључивање нових болесника у случају достизања статистичке значајности утицаја амјодарона као фактора независно удруженог са појавом хепатотоксичности (DILI). Имајући у виду да је током спровођења студије тај циљ и достигнут, укупан број испитаника је био 560 болесника.

Прорачун студијског узорка у проспективној, контролисаној студији је заснован на подацима о учесталости нормалног алела SOD2 и његове варијанте (rs4880) у 11 досадашњих студија (www.pharmgkb.org). Имајући у виду значајно варирање учесталости фреквенце варијанте алела у појединим студијама, за прорачун је узета разлика његове учесталости између два перцентила интерквartilног ранга (13%-P25, 47%-P75), за однос броја болесника 1:1:1 у три групе. На овај начин, добијен је број испитаника од најмање 27 у свакој од група, тако да је укупан узорак утврђен на

најмање 81 болесника док је укључивањем додатних испитаника коначан број болесника је био 87.

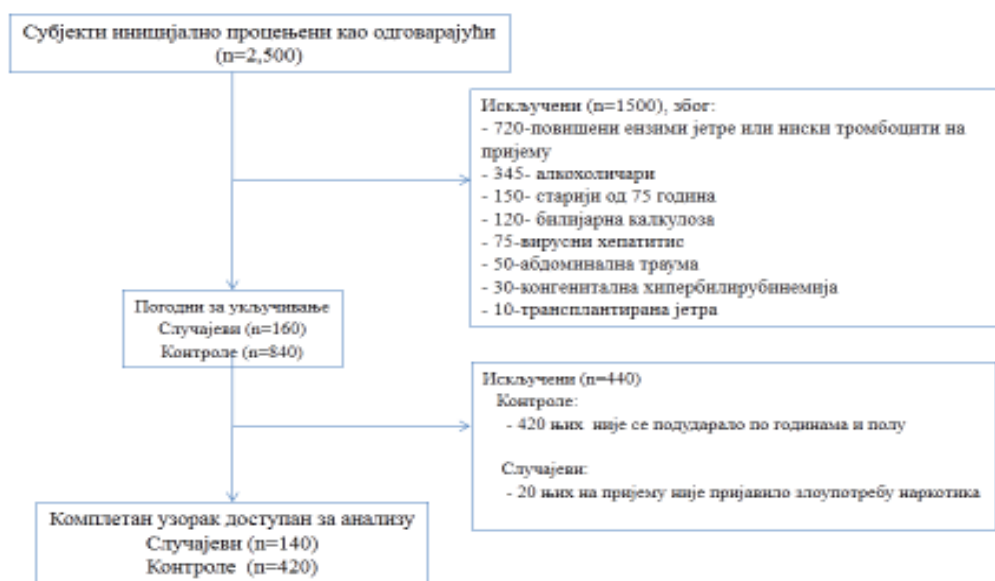
3.8. СТАТИСТИЧКА ОБРАДА ПОДАТАКА

За континуалне варијабле биле су одређене мере централне тенденције и варијабилитета, док су за категоријске варијабле биле одређене учесталости по категоријама. У зависности од тога да ли континуалне варијабле прате нормалну расподелу или не била је испитана значајност разлике у вредностима варијабли помоћу Student T или Man-Whitney U теста. За тестирање значајности разлике у процентуалној заступљености категорија коришћен је χ^2 или Fisher-ов тест. Значај потенцијалних фактора ризика по групама и њихов утицај на исход је прво поређен „сировим“ унакрним односом шансе („crude odds ratio“-ом) уз 95% интервал поверења. Унакрсни однос шансе је затим био прилагођен за дејство више фактора коришћењем бинарне логистичке регресије чиме је одређено који фактор ризика утиче на настанак исхода независно од осталих фактора. За све статистичке прорачуне предвиђена је анализа током спровођења (“interim analysis”) и на крају студије након прикупљања и валидације свих потребних података. Статистичка анализа била је спроведена коришћењем одговарајућег рачунарског програма а граница значајности разлика у свим статистичким анализама је установљена на мање или једнако 5% (0.05). Однос сензитивности и специфичности приказан је ROC кривом.

4.0. РЕЗУЛТАТИ

4.1. РЕТРОСПЕКТИВНА СТУДИЈАСЛУЧАЈ-КОНТРОЛА

Студија је обухватила 2500 историја болести пацијената који су, током четворогодишњег периода трајања студије лечени у Клиници за кардиологију, Клинички Центар Крагујевац, Крагујевац, Србија. Након примарне процене подобности, искључили смо укупно 1500 историја болести због постојања елиминишућих фактора. Крајњи узорак је, након искључивања неподударних пацијената контролне групе и прецизније идентификације елиминишућих критеријума, укључио 140 историја болести које су чиниле групу случај и 420 историја болести које су чиниле групу контрола (Слика 6).

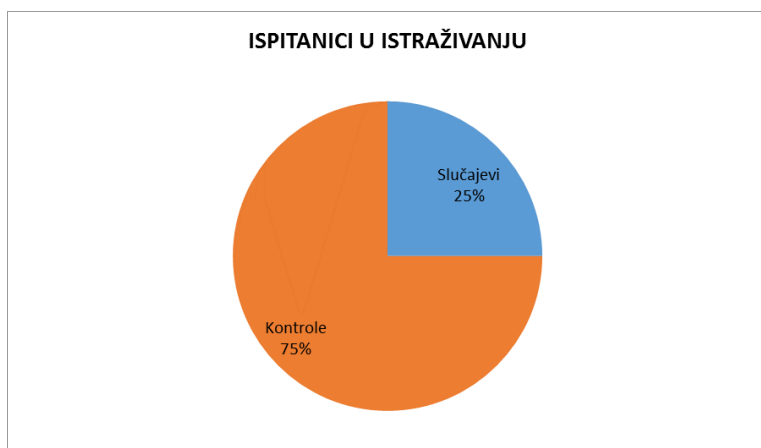


Од укупног броја испитаника, 140 (25,0%) је било случајева а 420 (75,0%) су биле контроле (Табела 1; Слика 7).

Табела 1. Структура испитаника у истраживању

Испитаници	n	%
Случајеви	140	25,0
Контроле	420	75,0
Укупно	560	100,0

Слика 7. Структура испитаника у истраживању



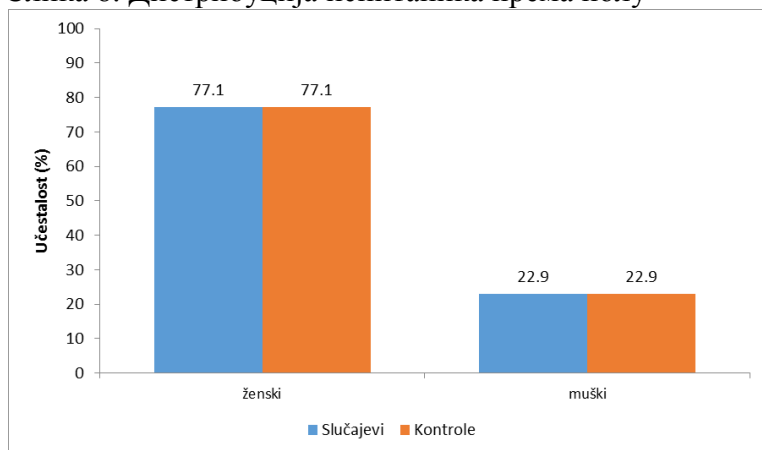
4.1.1. Демографске, социо-економске и клиничке карактеристике

Већина пацијената биле су жене (432 од укупног броја од 560, 77,1%). Код случајева мушког пола било је 77,1% а женског 22,9%, док је код контрола 77,1% било мушког и 22,9% женског пола (Табела 2; Слика 8).

Табела 2. Дистрибуција испитаника према полу

Пол	Случајеви		Контроле	
	n	%	N	%
женски	108	77,1	324	77,1
мушки	32	22,9	96	22,9
Укупно	140	100,0	420	100,0

Слика 8. Дистрибуција испитаника према полу

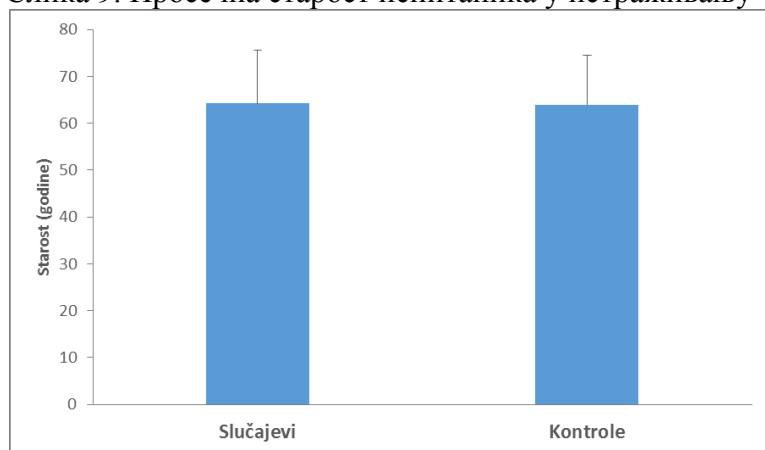


Просечна старост учесника у истраживању била је 64,1 година старости (уз стандардно одступање –SD, 10,7 година, од 24 до 85 година старости). Просечна старост случајева износила је $64,2 \pm 11,3$ година, док је просечна старост контрола износила $64,0 \pm 10,5$ година (Табела 3; Слика 9).

Табела 3. Просечна старост испитаника у истраживању

Старост (године)	n	\bar{x}	Sd	med	min	max
Случајеви	140	64,2	11,3	64,0	28,0	85,0
Контроле	420	64,0	10,5	64,0	24,0	85,0

Слика 9. Просечна старост испитаника у истраживању

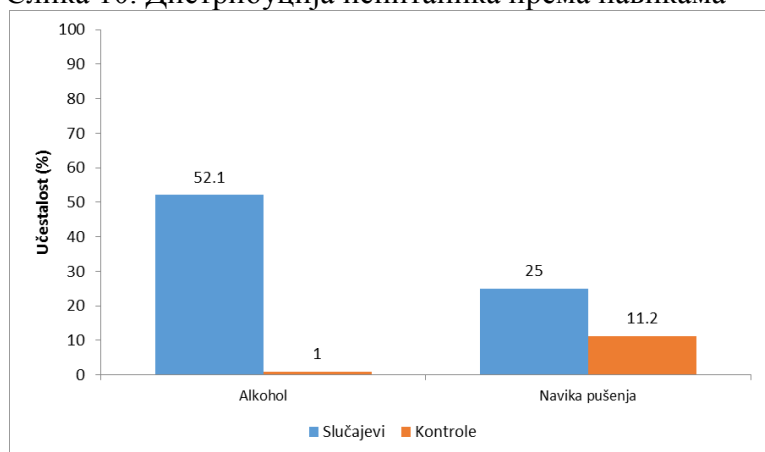


Само је мали број пацијената повремено конзумирао алкохол, док већина пацијената нису били пушачи. Конзумирање алкохола имало је 52,1% случајева и 1,0% контрола, што је статистички значајна разлика ($p < 0,001$). Навику пушења имало је 25,0% случајева и 11,2% контрола, што је статистички значајна разлика ($p < 0,001$) (Табела 4; Слика 10).

Табела 4. Дистрибуција испитаника према навикама

Варијабле	Случајеви		Контроле		p- вредност
	n	%	n	%	
Алкохол	73	52,1	4	1,0	
Навика пушења	35	25,0	47	11,2	

Слика 10. Дистрибуција испитаника према навикама

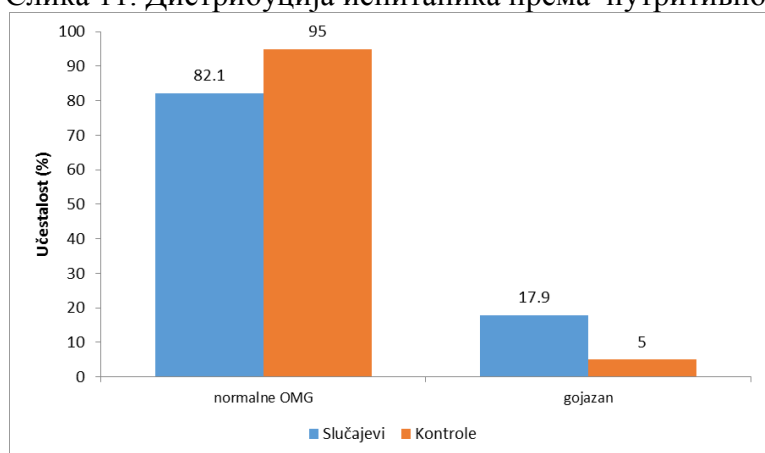


Гојазност није била у значајној мери заступљена у студијској популацији јер је само 46 (8.2%) пацијената, од читаве студијске групе било гојазно. Код случајева, нормалне ОМГ је било 82,1% а гојазних 17,9%, док је код контрола 95,0% било нормалне ОМГ и 5,0% гојазних, што је статистички значајна разлика ($p < 0,001$) (Табела 5; Слика 11).

Табела 5. Дистрибуција испитаника према нутритивном статусу

Нутритивни статус	Случајеви		Контроле	
	n	%	n	%
нормалне ОМГ	115	82,1	399	95,0
гојазан	25	17,9	21	5,0
Укупно	140	100,0	420	100,0

Слика 11. Дистрибуција испитаника према нутритивном статусу



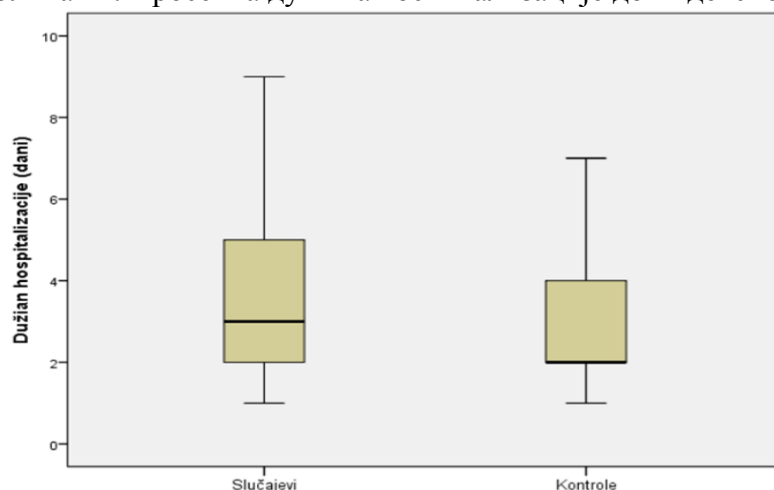
Медијана дана хоспитализације за целокупни студијски узорак је износила 4 дана (од 1 до 45) а средња вредност за све испитанике била је 6,0 (SD =5,6). У групи случај,

медијана дана хоспитализације је износила 7 (опсег 2-30) а просечна вредност 7.7 (SD =5,0), док је у контролној групи медијана била 3 дана (опсег 1-45) а просечна вредност 5.4 (SD =5,7). Медијана дужине хоспитализације до индексног дана (тј. дана појаве хепатотоксичности) код случајева је износила 3,0 дана (опсег, 1,0-14,0), док код њима мечованих контрола је износила 2,0 дана (опсег, 1,0-44,0) (Табела 6; Слика 11).

Табела 6. Просечна дужина хоспитализације до индексног дана

Дужина хоспитализације (дани)	n	\bar{x}	Sd	med	min	max
Случајеви	140	3,9	2,8	3,0	1,0	14,0
Контроле	420	3,7	4,8	2,0	1,0	44,0

Слика 12. Просечна дужина хоспитализације до индексног дана

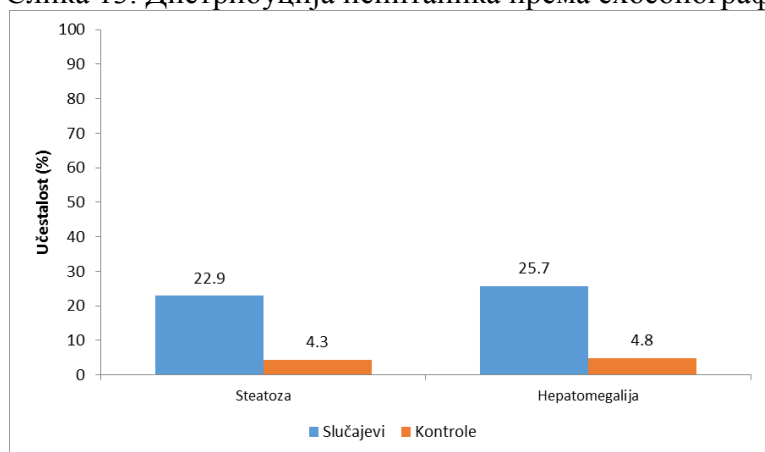


Морфолошка лезија јетре, ултразвучно верификована као масна јетра или хепатомегалија је уочена код 116 (20.7%) пацијената у укупној студијској популацији, док је у групи случај 28 (20.0%) пацијената имало клинички симптоматску хепатотоксичност. Стеатозу је имало 22,9% случајева и 4,3% контрола, што је статистички значајна разлика ($p < 0,001$). Хепатомегалију је имало је 25,7% случајева и 4,8% контрола, што је статистички значајна разлика ($p < 0,001$) (Табела 7; Слика 13).

Табела 7. Дистрибуција испитаника према ехосонографском налазу абдомена

Варијабле	Случајеви		Контроле		p-вредност
	n	%	n	%	
Стеатоза	32	22,9	18	4,3	<0,001
Хепатомегалија	36	25,7	20	4,8	<0,001

Слика 13. Дистрибуција испитаника према ехосонографском налазу абдомена



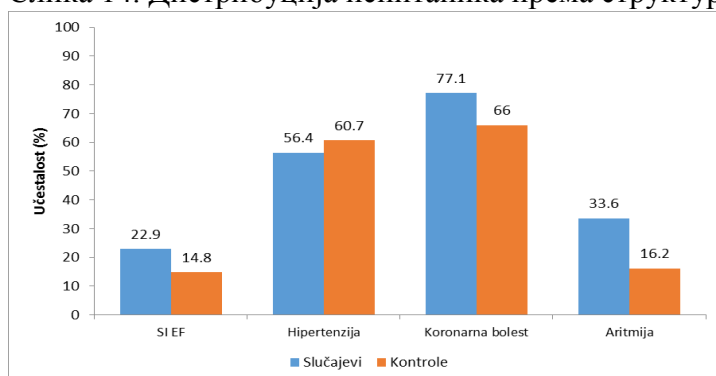
Пацијенти су били хоспитализовани због кардиоваскуларних болести, међу којима је најчешћа била коронарна болест, затим хипертензија, аритмије и срчана слабост. Хипертензију је имало 56,4% случајева и 60,7% контрола, што није статистички значајна разлика ($p = 0,371$). Коронарну болест је имало 77,1% случајева и 66,0% контрола, што је статистички значајна разлика ($p = 0,013$). Аритмије је имало 33,6% случајева и 16,2% контрола, што је статистички значајна разлика ($p < 0,001$) (Табела 8; Слика 14).

Табела 8. Дистрибуција испитаника према структури КВВ

КВВ	Случајеви		Контроле		p-вредност
	n	%	n	%	
SI	32	22,9	62	14,8	0,026
Хипертензија	79	56,4	255	60,7	0,371
Коронарна болест	108	77,1	277	66,0	0,013
Аритмија	47	33,6	68	16,2	<0,001

КВВ-кардиоваскуларне болести; SI –срчана инсуфицијенција

Слика 14. Дистрибуција испитаника према структури кардиоваскуларних болести



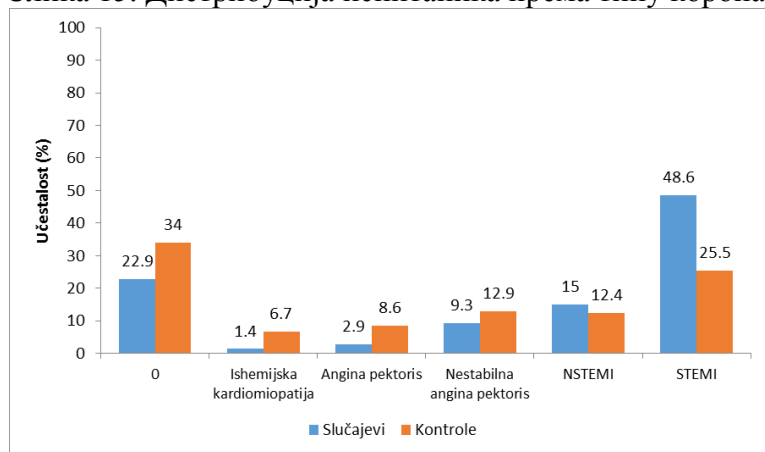
Од свих коронарних болести најчешћи је био инфаркт миокарда са ST елевацијом (STEMI), затим инфаркт миокарда без ST елевације (NSTEMI), нестабилна ангина, стабилна ангина и исхемијска кардиомиопатија. И случајеви и контроле су најчешће имали STEMI (48,6% према 25,5%) (Табела 9; Слика 15).

Табела 9. Дистрибуција испитаника према типу коронарне болести

Тип коронарне болести	Случајеви		Контроле	
	n	%	n	%
0	32	22,9	143	34,0
Исхемијска кардиомиопатија	2	1,4	28	6,7
Ангина пекторис	4	2,9	36	8,6
Нестабилна ангина пекторис	13	9,3	54	12,9
NSTEMI	21	15,0	52	12,4
STEMI	68	48,6	107	25,5
Укупно	140	100,0	420	100,0

NSTEMI-инфаркт миокарда без ST елевације;STEMI-инфаркт миокарда са ST елевацијом

Слика 15. Дистрибуција испитаника према типу коронарне болести

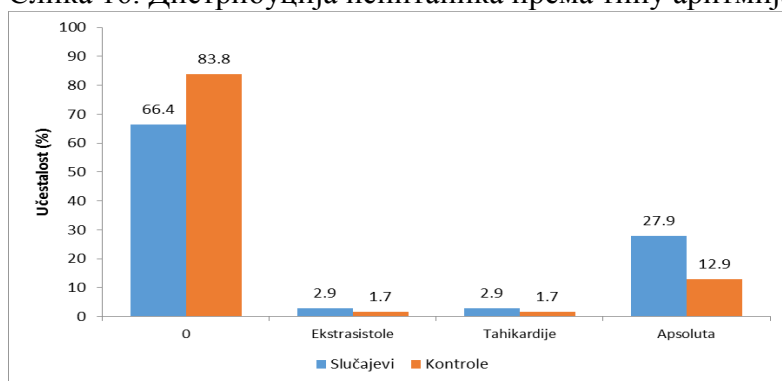


Међу пацијентима који су имали аритмију, најчешћи разлог за започињање медикаментозне терапије је била атријална фибрилација, затим тахикардија и екстрасистоле. И случајеви и контроле су најчешће имали апсолуту (27,9% према 12,9%) (Табела 10; Слика 16).

Табела 10. Дистрибуција испитаника према типу аритмија

Тип аритмије	Случајеви		Контроле	
	n	%	n	%
0	93	66,4	352	83,8
Екстрасистоле	4	2,9	7	1,7
Тахикардије	4	2,9	7	1,7
Апсолута	39	27,9	54	12,9
Укупно	140	100,0	420	100,0

Слика 16. Дистрибуција испитаника према типу аритмија



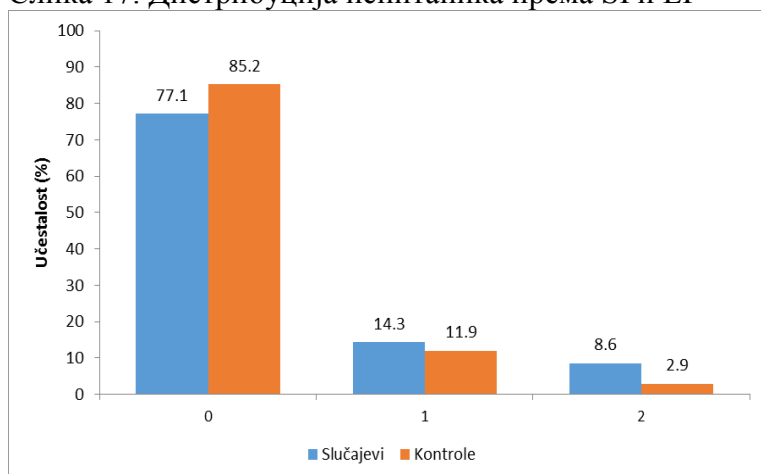
Што се тиче пацијената са срчаном инсуфицијенцијом, око три четвртине њих је имало ејекциону фракцију (EF) већу од 45%, а остали су имали срчано попуштање са EF мањом од 45%. SI са очуваном или без очуване EF је имало 22,9% случајева и 14,8% контрола, што је статистички значајна разлика ($p = 0,026$). И случајеви и контроле су најчешће имали очувану EF и нису имали SI (77,1% према 85,2%) (Табела 11; Слика 17).

Табела 11. Дистрибуција испитаника према SI и EF

SI EF	Случајеви		Контроле	
	n	%	n	%
0	108	77,1	358	85,2
1	20	14,3	50	11,9
2	12	8,6	12	2,9
Укупно	140	100,0	420	100,0

0-немаSI, очувана EF; 1-има SI, EF >45%; 2-има SI, EF ≤45%.

Слика 17. Дистрибуција испитаника према SI и EF

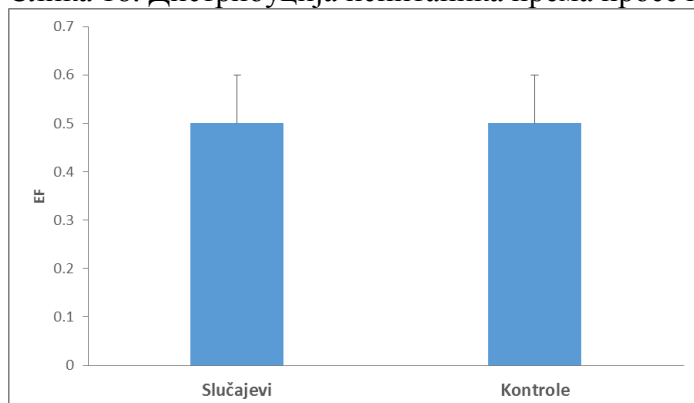


Не постоји статистички значајна разлика у просечној EF између испитиваних група ($p = 0,151$) (Табела 12; Слика 18).

Табела 12. Дистрибуција испитаника према просечној EF

EF	n	\bar{x}	sd	med	min	max
Случајеви	89	0,5	0,1	0,5	0,3	0,8
Контроле	115	0,5	0,1	0,5	0,3	0,9

Слика 18. Дистрибуција испитаника према просечној EF

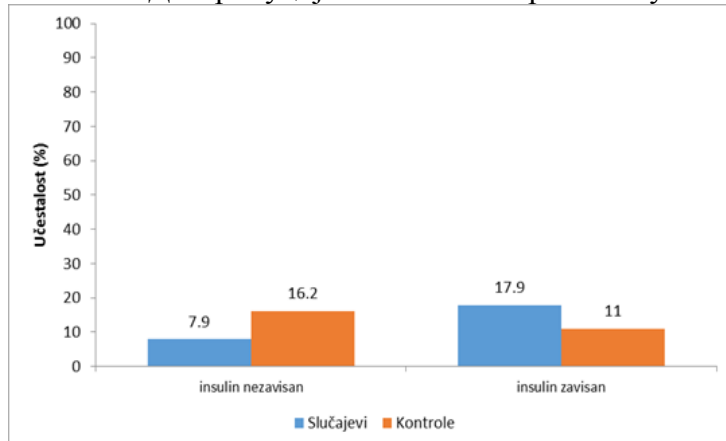


Најчешћи некардиоваскуларни коморбидитет је био дијабетес мелитус. Инсулин независни DM имало је 7,9% случајева и 16,2% контрола, што је статистички значајна разлика ($p = 0,014$). Инсулин зависни DM имало је 17,9% случајева и 11,0% контрола, што је статистички значајна разлика ($p = 0,033$) (Табела 13; Слика 19).

Табела 13. Дистрибуција испитаника према типу DM

Варијабле	Случајеви		Контроле		p- вредност
	n	%	n	%	
инсулин независан	11	7,9	68	16,2	0,014
инсулин зависан	25	17,9	46	11,0	0,033

Слика 19. Дистрибуција испитаника према типу DM



Средња вредности CCI (Charlson Comorbidity Index (CCI)) скора читаве студијске групе била је 3.8 (SD1.7, од 1 до 10), а процењено CCI-10-огодишње преживљавање је износило 54.4% (SD=33.5). Карактеристике пацијената и лабораторијске вредности за читаву студијску групу, као и за одговарајуће подгрупе дате су у табелама 14. и 15.

Табела 14. Демографске и клиничке карактеристике студијских пацијената

Варијабле	Група случај (n=140)	Група контрола (n=420)	p*	Статистички тест
Пол (мушки)	32 (22.9)	96 (22.9)	1.000	HI
Старост (године)	64.2±11.3	64.0±10.5	0.914	T
Гојазност	25 (17.9)	21 (5.0)	<0.001	HI
Масна јетра	32 (22.9)	18 (4.3)	<0.001	HI
Хепатомегалија	36 (25.7)	20 (4.8)	<0.001	HI
Срчана инсуфицијенција SI EF	32 (22.9)	62 (14.8)	0.026	HI
0	108 (77,1)	358 (85,2)	0,010	HI
1	20 (14,3)	50 (11,9)		
2	12 (8.6)	12 (2.9)		
Хипертензија	79 (56.4)	255 (60.7)	0.371	HI
Коронарна болест	108 (77.1)	277 (66.0)	0.013	HI
STEMI	68 (48.6)	107 (25.5)	<0.001	HI
NSTEMI	21 (15.0)	52 (12.4)	0.425	HI
Нестабилна ангиина	13 (9.3)	54 (12.9)	0.260	HI
Стабилна ангиина	4 (2.9)	36 (8.6)	0.023	HI
Аритмије	47 (33.6)	68 (16.2)	<0.001	HI
Атријална фибрилација	39 (27.9)	54 (12.9)	<0.001	HI
тахикардија	4 (2.9)	7 (1.7)	0.480	F
екстрасистола	4 (2.9)	7 (1.7)	0.480	F
Дијабетес мелитус тип 1	11 (7.9)	68 (16.2)	0.014	HI
Дијабетес мелитус тип 2	25 (17.9)	46 (11.00)	0.033	HI
Конзумирање алкохола†	73 (52.1)	4 (1.0)	<0.001	HI
Пушење	35 (25.0)	47 (11.2)	0.001	HI
CCI скор (поени)	5 (1-10)	3 (1-7)	<0.001	MW
CCI десетогодишње преживљавање (процент)	21 (0-96)	77 (0-96)	<0.001	MW
Време до индексног дана ‡	3 (1-14)	2 (1-44)	<0.001	MW
Укупни дани хоспитализације (дани)	7 (2-30)	3 (1-45)	<0.001	MW

Број представља средњу вредност ± стандардна девијација (континуиране варијабле), медијана (опсег) и број (процент) пацијената (учесталост), по редоследу; *- вероватноћа разлике између вредности групе случај и групе контрола; †-повремено, незадовољавајући критеријуми за елиминацију (види методу); CCI - Charlson Comorbidity Index ‡-(види методу, индексни дан-дан када је у току хоспитализације настала нова лезија јетре); EF - ејекциона фракција; STEMI -инфаркт миокарда са ST елевацијом; NSTEMI- миокардни инфаркт без ST елевације; HI-χ(хи) квадрат тест, T- Studentov T-тест, F - Fisherov eгзактни тест, MW-Mann-Whitney U тест.

Табела 15. Лабораторијски параметри пацијената студијских група (случај-хепатотоксичност, контрола-без хепатотоксичности)

Варијабле	Сви пацијенти (n=560)	Група случај (n=140)	Група контрола (n=420)	p*	Ста т. тест
Аланин трансминаза (U/L)	95±226(24, 6-2760) (559)	305±382 (221,150-2760) (140)	25±15(20,6-125) (420)	<0.001	MW
Аспаратат трансминаза (U/L)	98±463(23,9-8811) (560)	303±895(129, 16-811) (140)	29±34(20, 9-372) (420)	<0.001	MW
Гама-глутамилтрансфераза (U/L)	38±64(22,5-858) (312)	45±41(29, 7-224) (131)	33±76(20, 5-858) (181)	<0.001	MW
Укупни билирубин(μmol/l)	15±10(12.3,3-83) (560)	24±15 (20, 5.7-83) (140)	12±5(11,3-35.5) (420)	<0.001	MW
Алкална фосфатаза (U/l)	71±85(56.5,3.24-1185) (306)	91±126(62, 31-1185) (128)	57±21(55,3-227) (178)	<0.001	MW
Лактат дехидрогеназа (U/L)	452±233(419,13-1723) (294)	464±280(449, 55-1723) (123)	442±192(407,13-1228) (171)	0.728	MW
Креатин фосфокиназа (U/L)	505±1027(118,8.2-8030) (386)	885±1384(289.5, 25-8030) (136)	299±686(103,8-5680) (250)	<0.001	MW
Креатин фосфокиназа-МВ (U/L)	84±310(16.3,3.4-3869) (381)	161±497(31, 4-3869) (135)	42±94(14.35,3-908) (246)	<0.001	MW
Амилаза (U/l)	70±56(60,4-603) (218)	63±44(56, 4-404) (104)	75±65(64,16-603) (114)	0.036	MW
Тропонин (ng/mL)	16.1±60.9(0.95, 0.002-797) (234)	24.2±84.7(2.49, 0-797) (102)	9.8±31.1(0.3,0-242) (132)	<0.001	MW
Протеини (g/L)	66±8 (361)	67±7 (129)	65±8 (232)	0.006	T
Албумини (g/L)	40±6 (376)	39±6 (132)	40±6 (244)	0.526	T
Фибриноген (g/L)	4.2±7.3(3.76, 0.54-127) (294)	3.8±1.4(3.66, 0.5-11) (116)	4.6±9.3(3.85, 1.48-127) (178)	0.352	MW
Интернационални нормализовани однос (INR)	1.3±0.7(1.083,0.9-6) (326)	1.4±0.7(1.1, 0.9-4.9) (117)	1.3±0.7(1.08,0.9-6) (209)	0.344	MW
Ц-реактивни протеин (mg/L)	22±36(7,0.2-256) (367)	31±40(12.15,1.3-196) (130)	17±32(5.5,0.2-256) (237)	<0.001	MW
Глукоза (mmol/L)	6.4±2.5 (465)	6.7±2.6 (138)	6.2±2.4 (327)	0.067	T
Холестерол (mmol/L)	4.9±1.2 (425)	5.0±1.3 (133)	4.8±1.1 (292)	0.037	T
Триглицериди (mmol/L)	1.8±1.0(1.4,0.5-7.4) (419)	1.8±1.0(1.52,0.66-6) (131)	1.7±1.0(1.3,0.5-7.4) (288)	0.092	MW
Уреа (mmol/L)	7.7±8.3(6.1,1.9-145) (415)	7.5±3.8(7,2.4-24.5) (139)	7.8±9.6(6,1.9-145) (276)	0.073	MW
Креатинин(μmol/L)	100±45 (417)	100±36 (139)	99±49(278)	0.880	T
Леукоцити(×10 ⁹ /L)	8.6±2.5 (409)	9.4±2.4 (136)	8.3±2.5 (273)	<0.001	T
Тромбоцити(×10 ⁹ /L)	219±64 (408)	213±61 (135)	222±64 (273)	0.122	T

Бројеви представљају средњу вредност±стандардна девијација(број пацијената); и медијана (опсег); *-вероватноћа разлике између вредности групе случај и групе контрола; MW- Mann-Whitney U test; T-Studentov T-тест.

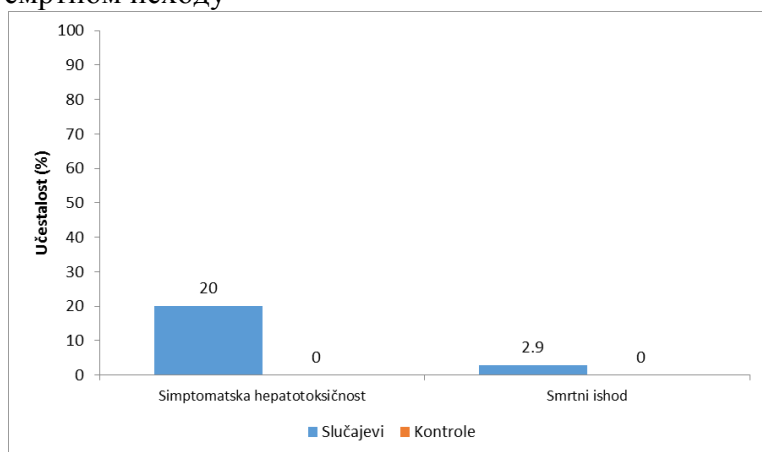
Укупан број смртних случајева у студијској популацији је био 4 (0.7%), узимајући у обзир чињеницу да у групи контрола није било смртних исхода.

Смртних исхода је било 4 (2,9%) од свих случајева. Симптоматска хепатотоксичност се јавила код 28 (20%) случајева (Табела 16; Слика 20).

Табела 16. Дистрибуција испитаника према симптоматској хепатотоксичности и смртном исходу

Варијабле	Случајеви		Контроле		p-вредност
	n	%	n	%	
Симптоматска хепатотоксичност	28	20,0	0	0,0	<0,001
Смртни исход	4	2,9	0	0,0	0,004

Слика 20. Дистрибуција испитаника према симптоматској хепатотоксичности и смртном исходу



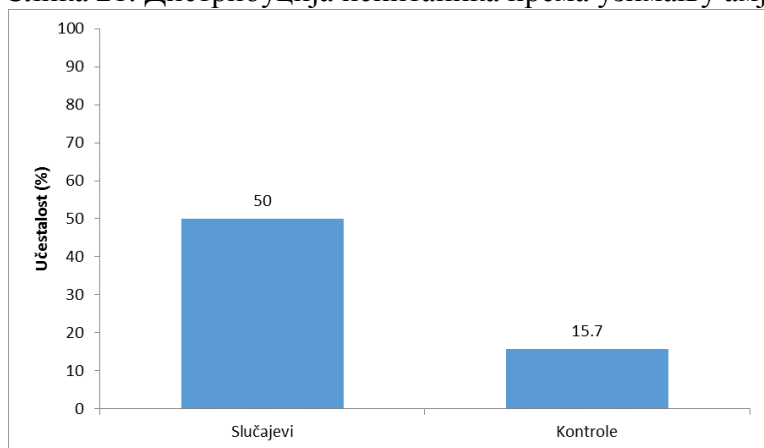
Амјодарон је имао највећу стопу прописивања, а медијана дефинисане дневне дозе амјодарона је била 112,5 на 100 хоспиталних дана болесника (опсег 3.6-800). Код испитаника из главне, експерименталне групе, та вредност је износила 193,8 DDD на 100 дана хоспитализације (у распону од 8,3 до 412,5), а код испитаника из контролне групе 75,0 DDD на 100 дана хоспитализације (у распону од 3,6 до 800,0) ($p < 0,001$). Испитаницима из главне, експерименталне групе амјодарон је примењиван парентерално код 44 пацијента (31,4%), орално код 5 пацијената (3,6%) и на оба начина код 21 пацијента (15,0%), док су ти резултати у контролној групи износили 11 (2,6%), 45 (10,7%) и 10 (2,4%), понаособ ($p < 0,001$).

Амјодарон је примало 50,0% случајева и 15,7% контрола, што је статистички значајна разлика ($p < 0,001$) (Табела 17, Слика 21).

Табела 17. Дистрибуција испитаника према узимању амјодарона

Амјодарон	Случајеви		Контроле	
	n	%	n	%
не	70	50,0	354	84,3
да	70	50,0	66	15,7
Укупно	140	100,0	420	100,0

Слика 21. Дистрибуција испитаника према узимању амјодарона

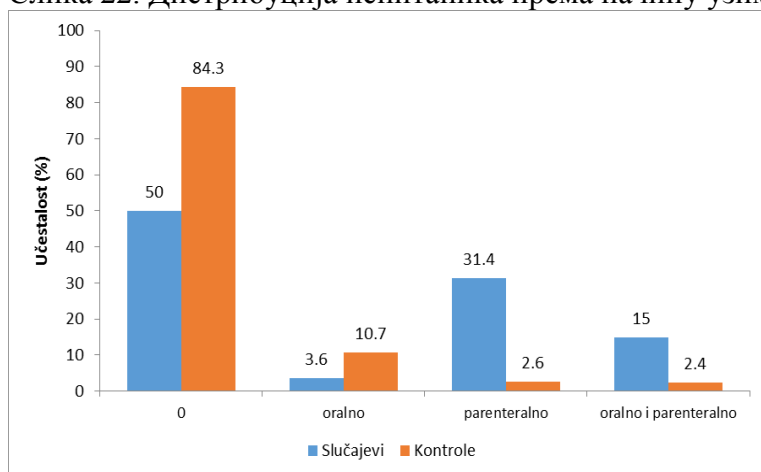


Најчешћи начин примене амјодарона у групи случај био је парентерални док је у групи контрола најзустапљенија била орална администрација (Табела 18; Слика 22).

Табела 18. Дистрибуција испитаника према начину узимања амјодарона

Амјодарон начин примене	Случајеви		Контроле	
	n	%	n	%
0	70	50,0	354	84,3
орално	5	3,6	45	10,7
парентерално	44	31,4	11	2,6
орално и парентерално	21	15,0	10	2,4
Укупно	140	100,0	420	100,0

Слика 22. Дистрибуција испитаника према начину узимања амјодарона

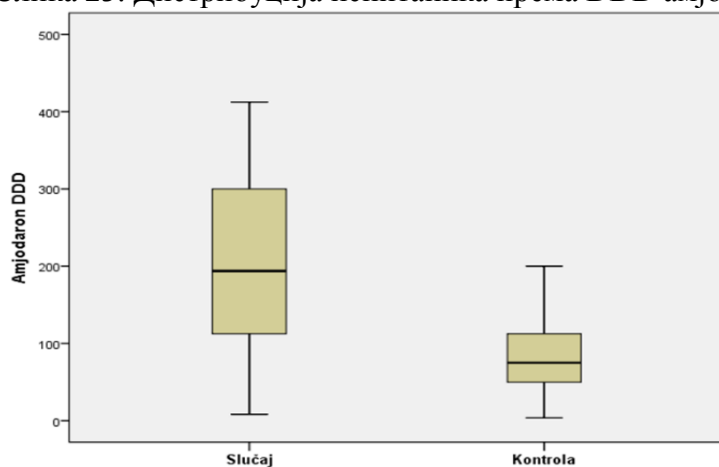


Медијана DDD амјодарона код случајева износила је 193,8 (опсег, 8,3 - 412,5), док је код контрола износила 75,0 (опсег, 3,6 - 800,0), што је статистички значајна разлика ($p < 0,001$) (Табела 19; Слика 23).

Табела 19. Дистрибуција испитаника према DDD амјодарона

Амјодарон DDD	N	\bar{x}	sd	med	min	max
Случајеви	70	200,9	102,6	193,8	8,3	412,5
Контроле	66	97,6	113,5	75,0	3,6	800,0

Слика 23. Дистрибуција испитаника према DDD амјодарона



Испитаници су у највећем броју случајева били лечени ацетилсалицилном киселином (аспирином), али и АСЕ инхибиторима, селективним бета блокаторима, клопидогрелом, аторвастатином, инхибиторима протонске пумпе, органским нитратима, еноксапарин содијумом, триметазином, диуретицима, амјодароном, бензодиазепаном, дихидропиридином, антагонистима H₂ рецептора метформином, ксантином, спиронолактоном и сулфонилауреом. Остали лекови су били прописани код мање од 5% укупног броја студијских пацијената, те су због ниске учесталости употребе искључени из даље анализе. Приказ најчешће коришћених лекова у обе студијске групе дат је у табели 20.

Табела 20. Најчешће коришћени лекови у студијским групама (случај-хепатотоксичност, контрола-без хепатотоксичности)

Варијабле	Група случај (n=140)	Група контрола(n=420)	p*	Стат. тест
H ₂ рецепторски антагонисти	32 (22.9)	40 (9.5)	<0.001	HI
Инхибитори протонске пумпе	96 (68.6)	174 (41.4)	<0.001	HI
Метформин	8 (5.7)	62 (14.8)	0.005	HI
Сулфонилауреа	7 (5.0)	33 (7.9)	0.256	HI
Еноксапарин	89 (63.6)	104 (24.8)	<0.001	HI
Клопидогрел	105 (75.0)	225 (53.6)	<0.001	HI
Ацетилсалицилна киселина	124 (88.6)	326 (77.6)	0.005	HI
Амјодарон	70 (50)	66 (15.7)	<0.001	HI
Органски нитрати	75 (53.6)	192 (45.7)	0.107	HI
Триметазидин	54 (38.6)	120 (28.6)	0.027	HI
Диуретици хенлеове петље	62 (44.3)	108 (25.7)	<0.001	HI
Спиринолактон	16 (11.4)	44 (10.5)	0.752	HI
Бета блокатори	93 (66.4)	256 (61.0)	0.247	HI
Дихидропиридици	16 (11.4)	75 (17.9)	0.074	HI
АСЕ инхибитори	97 (69.3)	253 (60.2)	0.055	HI
Аторвастатин	105 (75.0)	222 (52.9)	<0.001	HI
Бензодиазепини	31 (22.1)	87 (20.7)	0.720	HI
Ксантини	25 (17.9)	42 (10.0)	0.013	HI

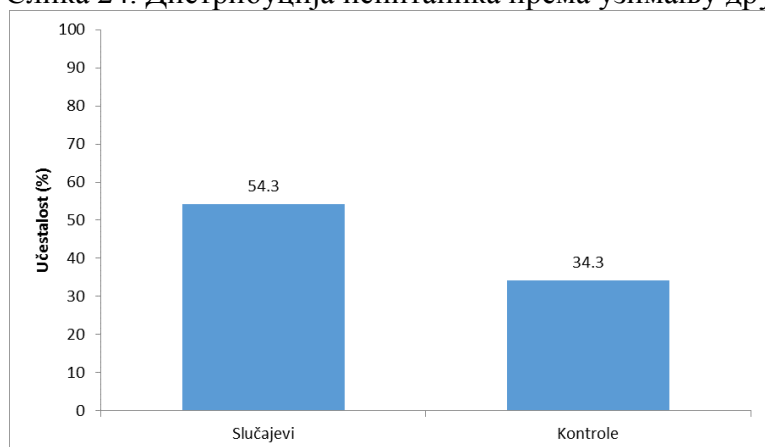
Број представља број (проценат) пацијената (фреквенца); *- вероватноћа разлике између вредности групе случај и групе контрола; HI- χ^2 (хи) квадрат тест.

Други хепатотоксични лек примало је 54,3% случајева и 34,3% контрола, што је статистички значајна разлика ($p < 0,001$) (Табела 21; Слика 24).

Табела 21. Дистрибуција испитаника према узимању другог хепатотоксичног лека

Други хепатотоксични лек	Случајеви		Контроле	
	n	%	n	%
не	64	45,7	276	65,7
Да	76	54,3	144	34,3
Укупно	140	100,0	420	100,0

Слика 24. Дистрибуција испитаника према узимању другог хепатотоксичног лека

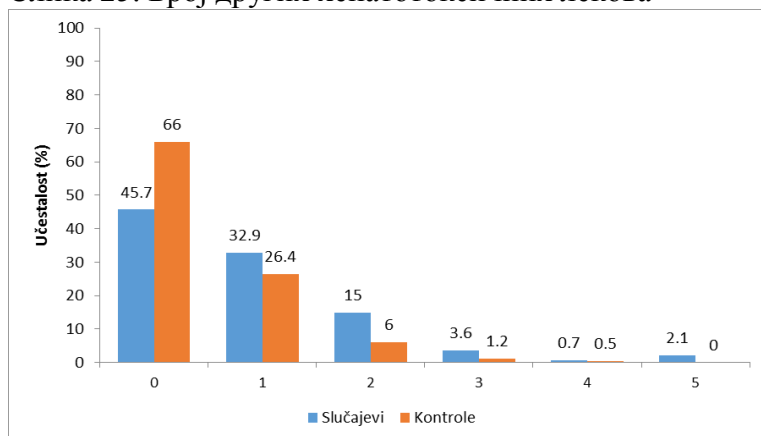


И случајеви и контроле су најчешће били без других хепатотоксичних лекова (45,7% према 66,0%) (Табела 22; Слика 25).

Табела 22. Број узимања других хепатотоксичних лекова у испитиваним групама

Број других хепатотоксичних лекова	Случајеви		Контроле	
	n	%	n	%
0	64	45,7	277	66,0
1	46	32,9	111	26,4
2	21	15,0	25	6,0
3	5	3,6	5	1,2
4	1	0,7	2	0,5
5	3	2,1	0	0,0
Укупно	140	100,0	420	100,0

Слика 25. Број других хепатотоксичних лекова



4.1.2 Анализа фактора ризика за појаву хепатотоксичности

Првобитна анализа фактора ризика који су повезани са оштећењем јетре је извршена постављањем хипотезе која је тестирала различитости проучаваних варијабли између група случај и контрола (Табеле 14, 15, 20). У групи случај, 114 пацијената (81.4%) је имало хепатоцелуларни тип оштећења, 9 пацијената (6.4%) холестатски тип, а 17 (12.2%) мешовити тип оштећења јетре. Постојале су статистички значајне разлике у погледу бројних демографских и клиничких карактеристика, лабораторијских параметара и лекова којима су третирани испитаници из две групе. Фактори попут конзумирања алкохола пре хоспитализације, тренутна гојазност, тип аритмије и дијабетес мелитус типа 2, холестерол и леукоцитоза, као и третирање амјодароном и еноксапарином могу се у великој мери довести у везу са оштећењима јетре у оквиру ризичних група пацијената (Табела 14, 15, 20).

У мултиваријабилном бинарном логистичком моделу регресије, од девет претпостављених фактора ризика за развој хепатотоксичности, које смо издвојили на основу статистичке значајности, постојећег знања и клиничке праксе, шест фактора (конзумирање алкохола, амјодарон, еноксапарин, гојазност, аторвастатин, ССИ резултат) били су независни предиктори оштећења јетре (Табела 23). Цео модел (са свим претпостављеним факторима) био је статистички значајан ($p < 0,001$). Цео модел (са свим претпостављеним предикторима) показао је статистички значајан резултат ($p < 0,001$) при Cox & Snell R Square $p = 0,457$ и Hosmer-Lemeshow тесту $p = 0,279$. Није примећена значајна мултиколинеарност између предиктора. Модел је био стабилан и након што је уведена интеракција амјодарона и ССИ резултата, која није била значајна ($p = 0,251$). Алкална фосфатаза, креатин фосфокиназа, креатин фосфокиназа МБ, укупни серумски протеини, Ц-реактивни протетин, холестерол, бела крвна зрнца су били такође статистички значајно повезани са оштећењем јетре, коришћењем униваријантне логистичке регресије, али магнитуда њихових колничника шансе је била ниска, а њихов интервал поверења је на доњој граници додиривао један, тако да су они искључени из модела (Табела 23).

Табела 23. Фактори који су значајно повезани са лезијом јетре утврђени, након униваријантне и мултиваријантне бинарне логистичке регресије

Варијабле	Униваријантна логистичка регресија	Мултиваријантна логистичка регресија
Гојазност	4.13 (2.23-7.65), <0.001	2.78 (1.15-6.71), 0.023
Коронарна болест	1.74 (1.12-2.71), 0.014	n.a.
Аритмија	2.62 (1.69-4.05), <0.001	n.a.
Срчана инисуфицијенција (EF<45%)	1.71 (1.06-2.76), 0.028	n.a.
Дијабетес мелитус тип 1	0.44 (0.23-0.86), 0.016	n.a.
Дијабетес мелитус тип 2	1.77 (1.04-3.00), 0.035	n.a.
CCI укупан скор	1.80 (1.58-2.07), <0.001	1.89 (1.53-2.34), <0.001
Повремено узимање алкохола	113.31 (40.09-320.27), <0.001	96.47 (28.95-321.43), <0.001
Пушење	2.64 (1.62-4.31), <0.001	1.92 (0.84-4.38), 0.121
H ₂ рецептор антагониста	2.82 (1.69-4.70), <0.001	n.a.
Иинхибитори протонске пумпе	3.08 (2.06-4.63), <0.001	n.a.
Метформин	0.35 (0.16-0.75), 0.007	0.14 (0.04-0.51), 0.003
Еноксапарин	5.30 (3.52-7.98), <0.001	3.29 (1.79-6.05), <0.001
Клопиодогрел	2.60 (1.70-3.99), <0.001	n.a.
Ацетилсалицилна киселина	2.24 (1.26-3.95), 0.006	n.a.
Амјодарон	5.36 (3.51-8.19), <0.001	3.70 (1.82-7.53), <0.001
Триметазидин	1.57 (1.05-2.34), 0.027	n.a.
Диуретик хенлеове петље	2.30 (1.54-3.42), <0.001	1.04 (0.53-2.03), 0.916
Аторвастатин	2.68 (1.74-4.10), <0.001	2.67 (1.33-5.38), 0.006
Ксантин	1.96 (1.14-3.35), 0.014	n.a.
Број других хепатотоксичних лекова	1.77 (1.41-2.21) <0.001	n.a.

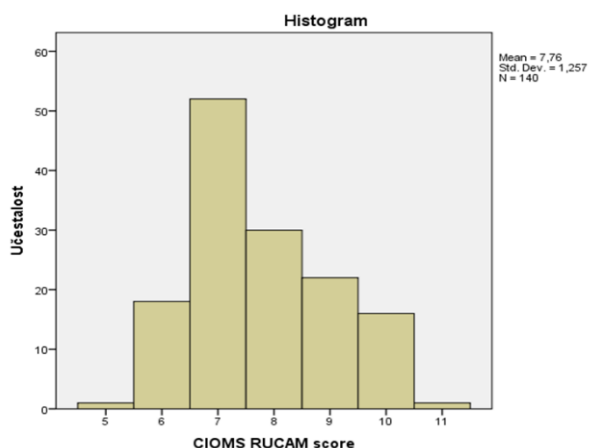
Бројеви представљају количник шансе (OR), 95% интервал поверења (CI) и вероватноћу (p), редом; n.a. – није примењиво (варијабле нису укључене у мултиваријабилни модел)

Анализом је добијено да су лекови са могућим хепатотоксичним дејством најчешћи узрочници оштећења јетре, у односу на све друге факторе ризика присутне код хоспитализованих пацијената. Процена узрочности лека за оштећење јетре у групи случај коришћењем CIOMS/RUCAM скоринг система је додатно потврдила налазе. Просечна вредност CIOMS/RUCAM скорa код случајева износи $7,8 \pm 1,3$. Најнижа вредност износи 5,0 а највиша 11,0 (Табела 24; Слика 26).

Табела 24. Процена CIOMS RUCAM скорa за групу случај

CIOMS RUCAM скор	n	\bar{x}	Sd	med	min	max
Случајеви	140	7,8	1,3	7,0	5,0	11,0

Слика 26. Процена CIOMS RUCAM скорa за групу случај



Од 140 случајева, код 39 (27.8%) пацијената узрочност лека је процењена као врло вероватна (CIOMS/RUCAM score ≥ 9), код 100 (71.4%) пацијената као вероватна (скор од 6-8), а код једног (0.7%) пацијента као могућа (скор 3-5).

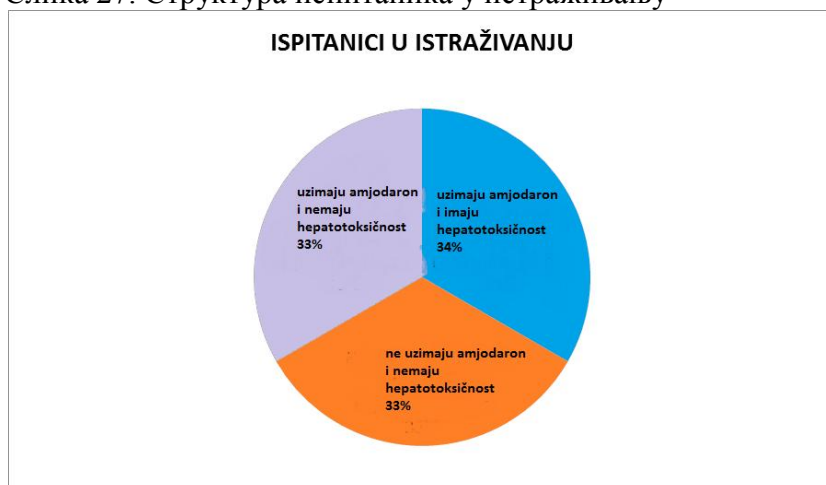
4.2. ПРОСПЕКТИВНА КОНТРОЛИСАНА СТУДИЈА

Од укупног броја испитаника, 29 (33,3%) је узимало амјодарон и имало хепатотоксичност (у даљем тексту А+Х+), 29 (33,3%) није узимало амјодарон и није имало хепатотоксичност (у даљем тексту А-Х-), а 29 (33,3%) је узимало амјодарон и није имало хепатотоксичност (у даљем тексту А+Х-) (Табела 25; Слика 27).

Табела 25. Структура испитаника у истраживању

Испитаници	N	%
Узимају амјодарон и имају хепатотоксичност	29	33,3
Не узимају амјодарон и немају хепатотоксичност	29	33,3
Узимају амјодарон и немају хепатотоксичност	29	33,3

Слика 27. Структура испитаника у истраживању



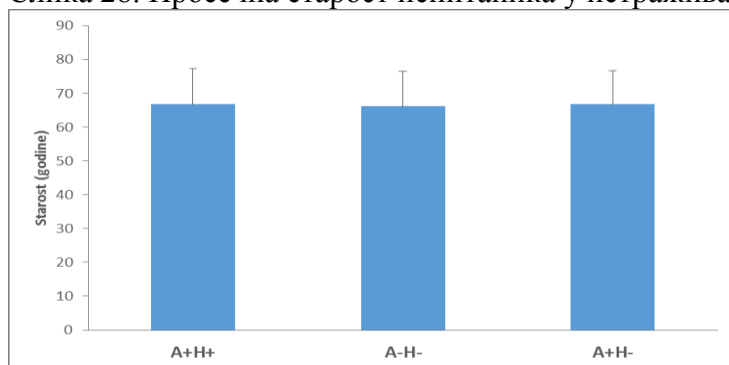
4.2.1 Демографске, социо-економске и клиничке карактеристике

Просечна старост испитаника са A^+X^+ износила је $66,8 \pm 10,4$ година, у групи A^-X^- износила је $66,1 \pm 10,3$ година, док је просечна старост испитаника са A^+X^- била $66,8 \pm 9,8$ година. Не постоји статистички значајна разлика у просечној старости између испитиваних група ($F=0,040$; $p=0,961$) (Табела 26; Слика 28).

Табела 26. Просечна старост испитаника у истраживању

Старост (године)	\bar{x}	sd	med	min	max	p-вредност
A^+X^+	66,8	10,4	71,0	35,0	75,0	0,961
A^-X^-	66,1	10,3	71,0	37,0	75,0	
A^+X^-	66,8	9,8	70,0	37,0	75,0	

Слика 28. Просечна старост испитаника у истраживању

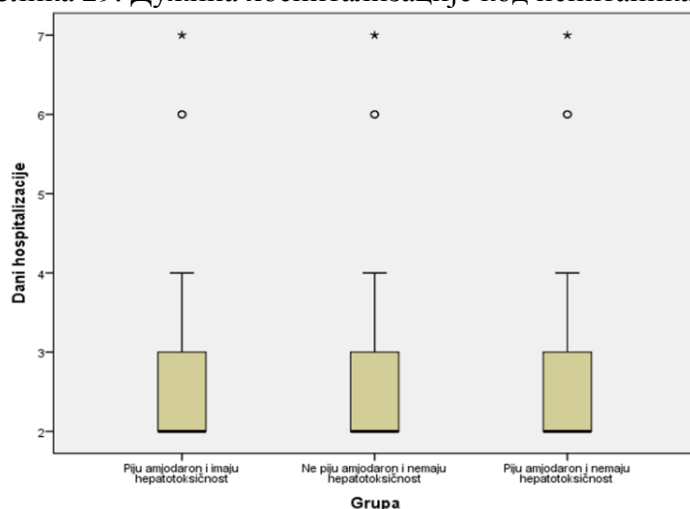


Медијана дужине хоспитализације код испитаника са A^+X^+ , A^-X^- и A^+X^- износила је 2 дана (опсег, 2-7) (Табела 27; Слика 29).

Табела 27. Дужина хоспитализације код испитаника у истраживању

Дужина хоспитализације	\bar{x}	sd	med	min	max	p-вредност
A^+X^+	3,0	1,6	2,0	2,0	7,0	1,000
A^-X^-	3,0	1,6	2,0	2,0	7,0	
A^+X^-	3,0	1,6	2,0	2,0	7,0	

Слика 29. Дужина хоспитализације код испитаника у истраживању

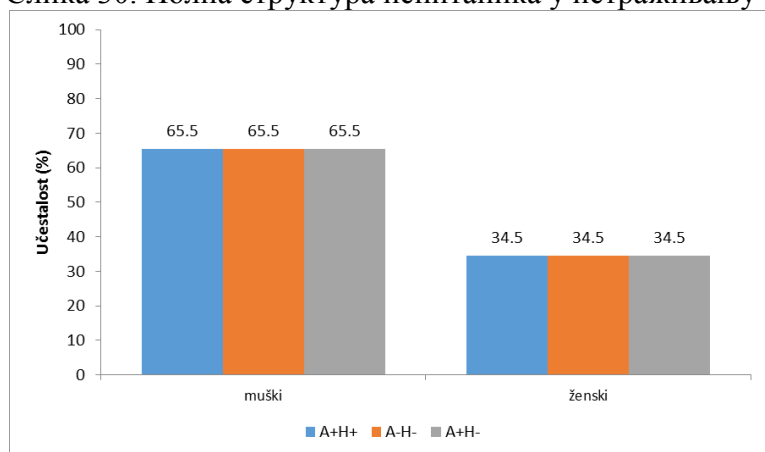


Пошто су пацијенти мечовани по полу није постојала статистички значајна разлика у учесталости пола између испитиваних група (χ (хи)-квадрат=0,000; $p=1,000$) (Табела 28; Слика 30).

Табела 28. Полна структура испитаника у истраживању

Полна структура	A^+X^+		A^-X^-		A^+X^-		p-вредност
	n	%	n	%	n	%	
мушки	19	65,5	19	65,5	19	65,5	1,000
женски	10	34,5	10	34,5	10	34,5	
укупно	29	100,0	29	100,0	29	100,0	

Слика 30. Полна структура испитаника у истраживању

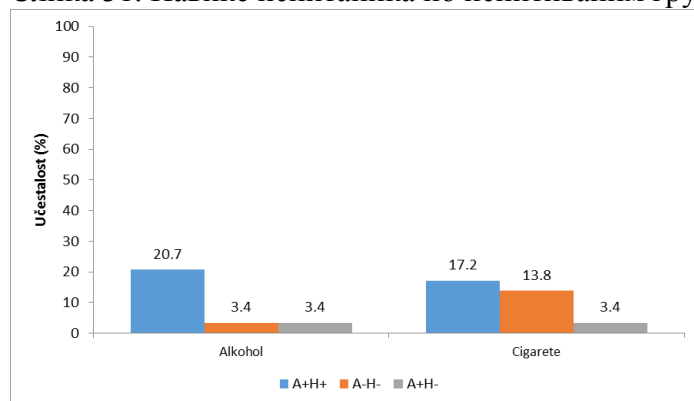


Алкохол је конзумирало 20,7% испитаника са A^+X^+ , 3,4% са A^-X^- и 3,4% са A^+X^- , што је статистички значајна разлика (Fisherov тест тачне вероватноће; $p=0,045$). Навику пушења имало је 17,2% испитаника са A^+X^+ , 13,8% са A^-X^- и 3,4% са A^+X^- , што није била статистички значајна разлика (Fisherov тест тачне вероватноће; $p=0,326$) (Табела29; Слика 31).

Табела 29. Навике испитаника по испитиваним групама

Навике	A^+X^+		A^-X^-		A^+X^-		p-вредност
	n	%	n	%	N	%	
алкохол	6	20,7	1	3,4	1	3,4	0,045
цигарете	5	17,2	4	13,8	1	3,4	0,326

Слика 31. Навике испитаника по испитиваним групама

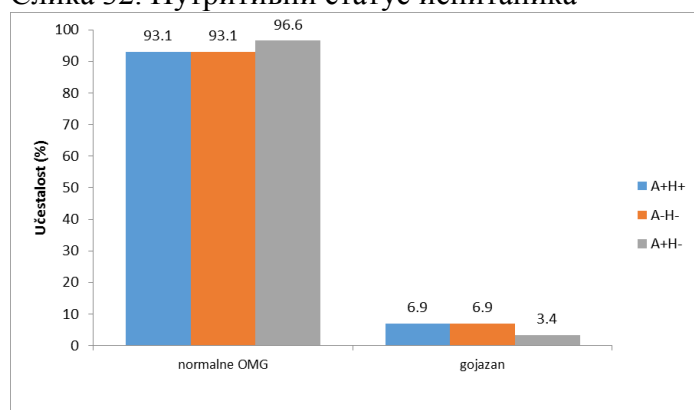


Није постојала статистички значајна разлика у учесталости категорија нутритивног статуса између испитиваних група (Fisherov тест тачне вероватноће; $p=1,000$) (Табела 30; Слика 32).

Табела 30. Нутритивни статус испитаника по испитиваним групама

нутритивни статус	A^+X^+		A^-X^-		A^+X^-		p-вредност
	n	%	n	%	N	%	
нормална ОМГ	27	93,1	27	93,1	28	96,6	
гојазан	2	6,9	2	6,9	1	3,4	1,000
Укупно	29	100,0	29	100,0	29	100,0	

Слика 32. Нутритивни статус испитаника

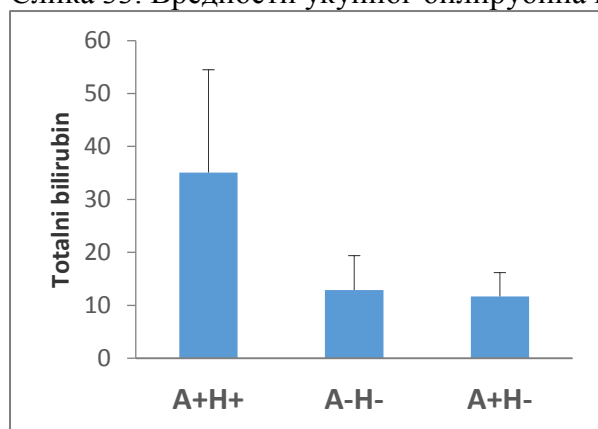


Постојала је статистички значајна разлика у просечним вредностима тоталног билирубина између испитиваних група ($F=34,375$; $p<0,001$). Статистички значајна разлика постојала је између испитаника са A^+X^+ у односу на испитанике са A^-X^- ($p<0,001$) и A^+X^- ($p<0,001$), док није постојала статистички значајна разлика између испитаника са A^-X^- и A^+X^- ($p=0,924$) (Табела 31; Слика 33).

Табела 31. Вредности укупног билирубина испитаника по испитиваним групама

Укупни билирубин	\bar{x}	sd	med	min	max	p-вредност
A^+X^+	35,1	19,4	36,0	6,5	73,5	
A^-X^-	12,9	6,5	12,0	5,0	34,0	$<0,001$
A^+X^-	11,7	4,5	11,0	4,0	22,0	

Слика 33. Вредности укупног билирубина испитаника по испитиваним групама

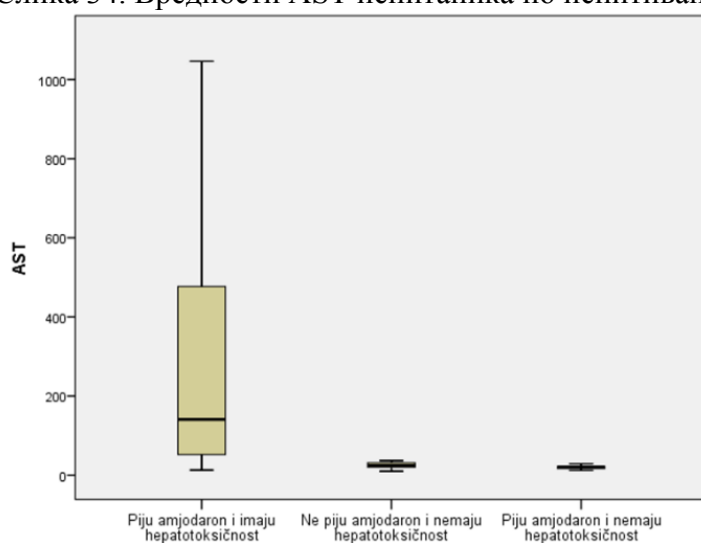


Постојала је статистички значајна разлика у медијанама АСТ-а између испитиваних група (хи-квадрат=34,677; $p < 0,001$). Статистички значајна разлика је постојала између испитаника са A^+X^+ у односу на испитанике са A^-X^- ($p < 0,001$) и A^+X^- ($p < 0,001$), а није постојала између испитаника са A^-X^- и A^+X^- ($p = 0,029$) (Табела 32; Слика 34).

Табела 32. Вредности АСТ-а испитаника по испитиваним групама

AST	\bar{x}	sd	med	min	max	p-вредност
A^+X^+	359,7	627,5	141,0	13,0	3238,0	
A^-X^-	36,9	37,5	25,0	10,0	200,0	<0,001
A^+X^-	21,6	6,6	20,0	12,0	40,0	

Слика 34. Вредности АСТ испитаника по испитиваним групама



Постојала је статистички значајна разлика у медијанама ALT-а између испитиваних група (hi-квадрат=58,007; $p < 0,001$). Статистички значајна разлика постојала је између испитаника са A^+X^+ у односу на испитанике са A^-X^- ($p < 0,001$) и A^+X^- ($p < 0,001$), док није постојала статистички значајна разлика између испитаника са A^-X^- и A^+X^- ($p = 0,234$) (Табела 33; Слика 35).

Табела 33. Вредности ALT-а испитаника по испитиваним групама

ALT	\bar{x}	sd	med	min	max	p-вредност
A^+X^+	607,8	1047,6	288,0	217,0	5748,0	
A^-X^-	29,3	17,8	24,0	8,0	85,0	<0,001
A^+X^-	23,5	11,6	22,0	8,0	59,0	

Слика 35. Вредности ALT испитаника по испитиваним групама

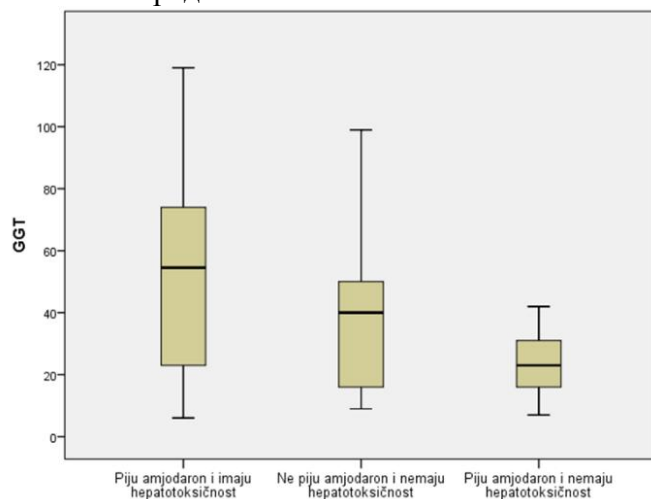


Постојала је статистички значајна разлика у медијанама GGT-а између испитиваних група (hi-квадрат=58,007; $p < 0,001$). Статистички значајна разлика постојала је између испитаника са A^+X^+ у односу на испитанике са A^-X^- ($p < 0,001$) и A^+X^- ($p < 0,001$), док није постојала статистички значајна разлика између испитаника са A^-X^- и A^+X^- ($p = 0,234$) (Табела 34; Слика 36).

Табела 34. Вредности GGT-а испитаника по испитиваним групама

GGT	\bar{x}	sd	med	min	max	p-вредност
A^+H^+	60,0	52,7	54,5	6,0	271,0	
A^+H^-	51,2	41,7	40,0	9,0	148,0	0,033
A^-H^-	31,2	29,9	23,0	7,0	143,0	

Слика 36. Вредности GGT-а испитаника по испитиваним групама

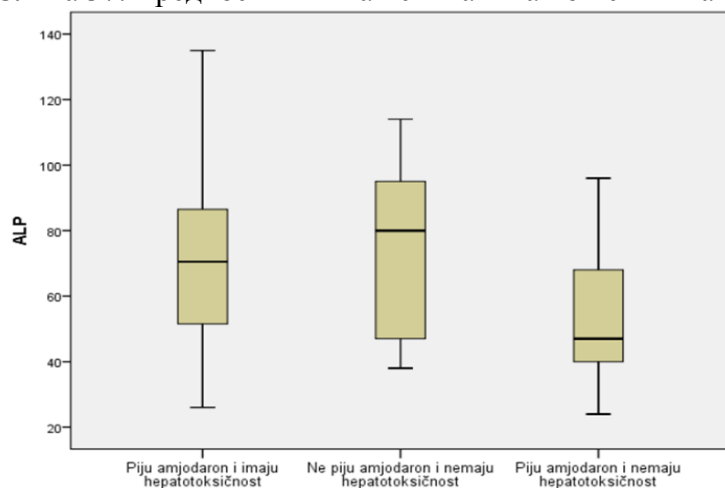


Постојала је статистички значајна разлика у медијанама ALP-а између испитиваних група (χ^2 -квадрат=58,007; $p < 0,001$). Статистички значајна разлика постојала је између испитаника са A^+X^+ у односу на испитанике са A^-X^- ($p < 0,001$) и A^+X^- ($p < 0,001$), док није постојала статистички значајна разлика између испитаника са A^-X^- и A^+X^- ($p = 0,234$) (Табела 35; Слика 37).

Табела 35. Вредности ALP-а испитаника по испитиваним групама

ALP	\bar{x}	sd	med	min	max	p-вредност
A^+X^+	75,9	33,4	70,5	26,0	174,0	0,009
A^-X^-	89,0	67,1	80,0	38,0	306,0	
A^+X^-	52,2	19,0	47,0	24,0	96,0	

Слика 37. Вредности ALP-а испитаника по испитиваним групама

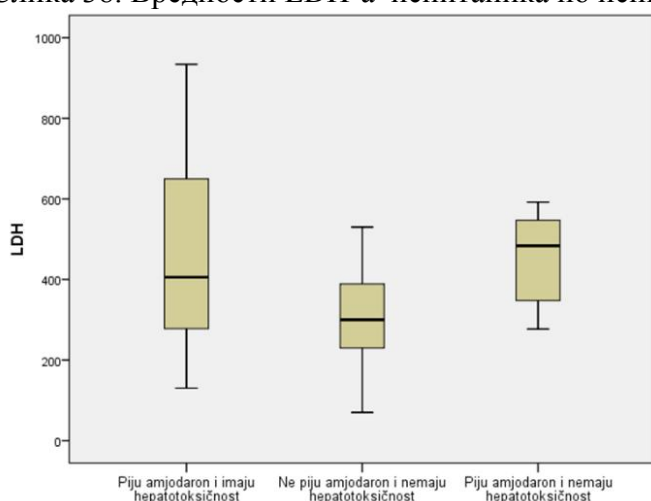


Постојала је статистички значајна разлика у медијанама LDH-а између испитиваних група (hi-квадрат=9,291; $p=0,010$). Статистички значајна разлика постојала је између испитаника са A^+X^+ у односу на испитанике са A^-X^- ($p=0,021$), као и између A^-X^- и A^+X^- ($p=0,004$). Није постојала статистички значајна разлика између испитаника са A^+X^+ у односу на испитанике са A^+X^- ($p=0,566$) (Табела 36; Слика 38).

Табела 36. Вредности LDH-а испитаника по испитиваним групама

LDH	\bar{x}	sd	med	min	max	p-вредност
A^+X^+	470,6	256,8	405,5	130,0	1241,0	0,010
A^-X^-	320,0	138,8	300,0	70,0	667,0	
A^+X^-	472,9	156,0	483,5	277,0	910,0	

Слика 38. Вредности LDH-а испитаника по испитиваним групама

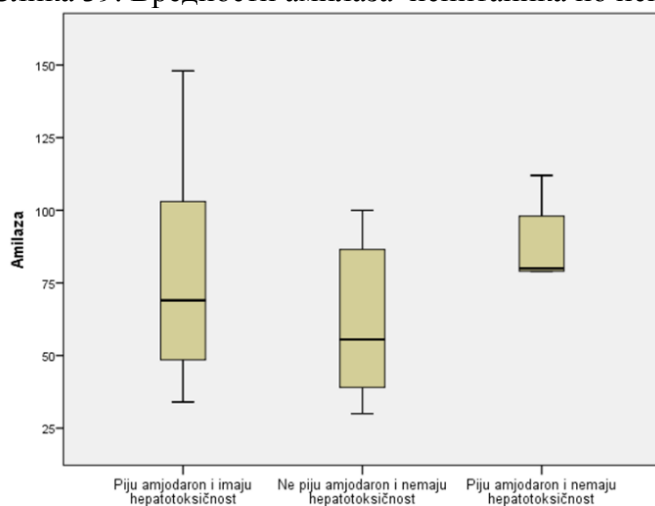


Није постојала статистички значајна разлика у медијанама амилазе између испитиваних група (hi-квадрат=2,843; $p=0,241$) (Табела;37; Слика 39).

Табела 37. Вредности амилазе испитаника по испитиваним групама

амилаза	\bar{x}	sd	med	min	max	p-вредност
A^+X^+	97,0	93,4	69,0	34,0	414,0	0,241
A^-X^-	74,2	60,2	55,5	30,0	300,0	
A^+X^-	95,0	51,0	80,0	33,0	198,0	

Слика 39. Вредности амилаза испитаника по испитиваним групама

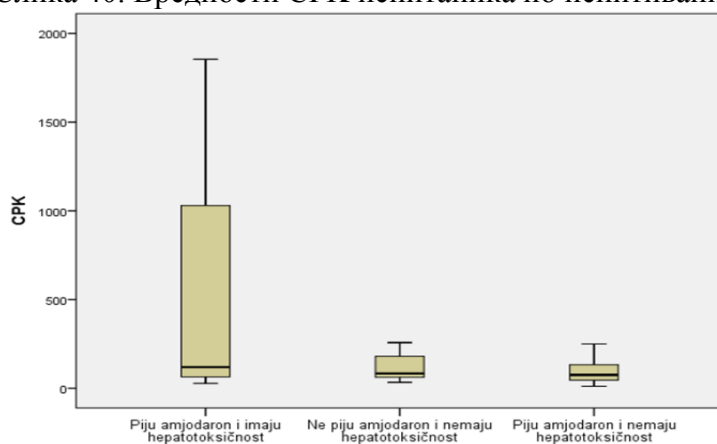


Постојала је статистички значајна разлика у медијанама СРК између испитиваних група (χ^2 -квадрат=7,863; $p=0,020$). Статистички значајна разлика постојала је између испитаника са A^+X^+ у односу на испитанике са A^+X^- ($p=0,008$). Није постојала статистички значајна разлика испитаника са A^+X^+ у односу на испитанике са A^-X^- ($p=0,144$), као и између A^-X^- и A^+X^- ($p=0,096$) (Табела 38;Слика 40).

Табела 38. Вредности СРК испитаника по испитиваним групама

СРК	\bar{x}	sd	med	min	max	p-вредност
A^+X^+	574,5	687,5	119,0	27,0	2590,0	0,020
A^-X^-	222,5	313,9	83,0	33,0	1414,0	
A^+X^-	92,2	67,8	75,0	11,0	250,0	

Слика 40. Вредности СРК испитаника по испитиваним групама

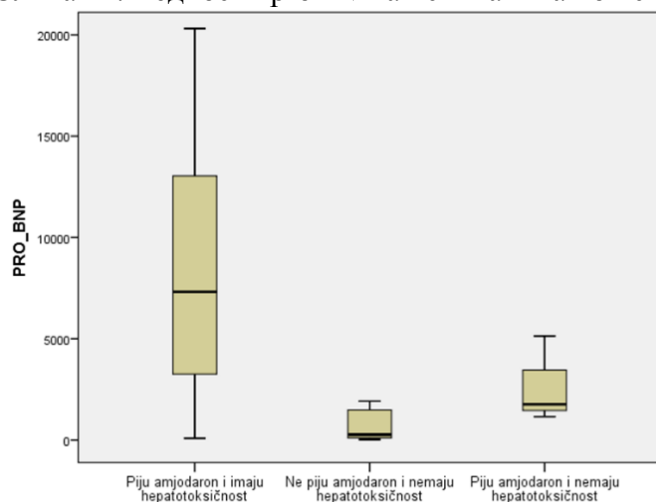


Постојала је статистички значајна разлика у медијанама проBNP-а између испитиваних група (hi-квадрат=11,313; p=0,003). Постојала је статистички значајна разлика између испитаника са A⁺X⁺ у односу на испитанике са A⁻X⁻ (p=0,001). Није постојала статистички значајна разлика између испитаника са A⁺X⁺ у односу на испитанике са A⁺X⁻ (p=0,214), као ни и између A⁻X⁻ и A⁺X⁻ (p=0,138) (Табела 39;Слика 41).

Табела 39. Вредности проBNP-а испитаника по испитиваним групама

PRO BNP	\bar{x}	sd	med	min	max	p-вредност
A ⁺ X ⁺	8332,3	6488,2	7316,0	85,0	20316,0	0,003
A ⁻ X ⁻	1361,9	2323,3	264,0	26,0	7674,0	
A ⁺ X ⁻	2685,7	2142,7	1764,0	1158,0	5135,0	

Слика 41. Вредности проBNP-а испитаника по испитиваним групама

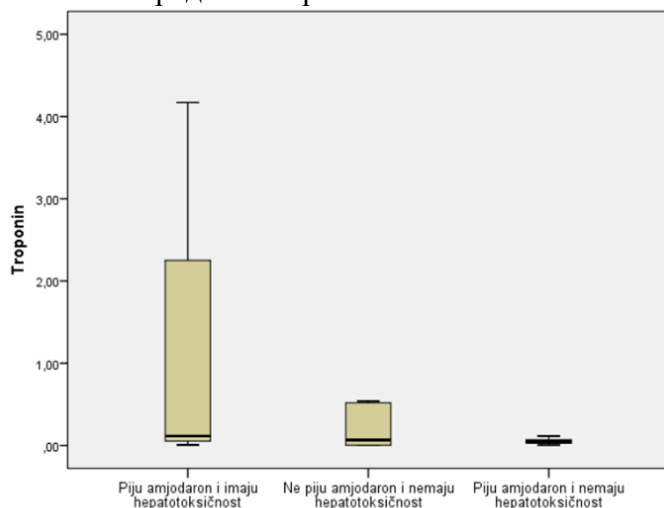


Није постојала статистички значајна разлика у медијанама тропонина између испитиваних група (hi-квадрат=4,687; p=0,096) (Табела 40 ;Слика 42).

Табела 40. Вредности тропонина испитаника по испитиваним групама

тропонин	\bar{x}	sd	med	min	max	p-вредност
A ⁺ X ⁺	1,2	1,8	0,1	0,0	6,1	0,096
A ⁻ X ⁻	1,5	3,7	0,1	0,0	14,7	
A ⁺ X ⁻	0,1	0,1	0,1	0,0	0,2	

Слика 42. Вредности тропонина испитаника по испитиваним групама

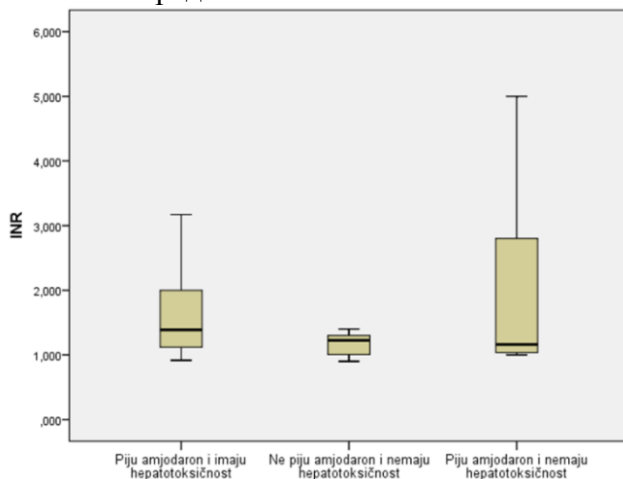


Није постојала статистички значајна разлика у медијанама INR-а између испитиваних група ($\chi^2=3,511$; $p=0,173$) (Табела 41; Слика 43).

Табела 41. Вредности INR-а испитаника по испитиваним групама

INR	\bar{x}	sd	med	min	max	p-вредност
A ⁺ H ⁺	1,7	0,8	1,4	0,9	3,2	0,060
A ⁻ H ⁻	1,3	0,3	1,2	0,9	2,1	
A ⁺ H ⁻	2,0	1,6	1,2	1,0	6,0	

Слика 43. Вредности INR-а испитаника по испитиваним групама

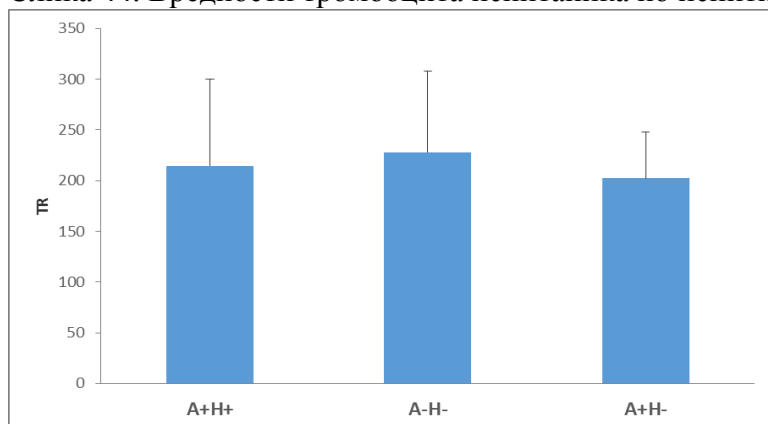


Није постојала статистички значајна разлика у просечним вредностима тромбоцита између испитиваних група ($F=0,735$; $p=0,483$) (Табела 42; Слика 44).

Табела 42. Вредности тромбоцита испитаника по испитиваним групама

Tr	\bar{x}	sd	med	min	max	p-вредност
A ⁺ X ⁺	214,6	85,7	201,0	93,0	472,0	0,483
A ⁻ X ⁻	228,0	79,9	210,5	132,0	395,0	
A ⁺ X ⁻	202,4	45,7	199,0	135,0	306,0	

Слика 44. Вредности тромбоцита испитаника по испитиваним групама

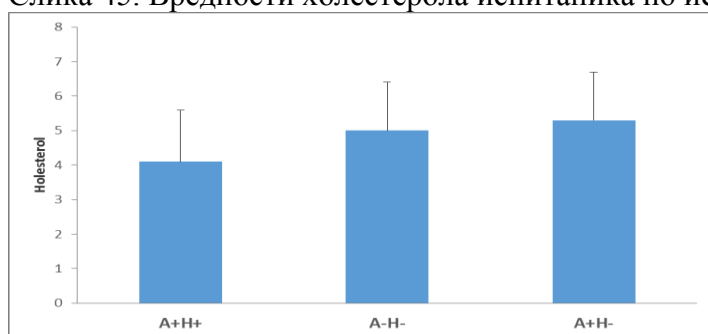


Постојала је статистички значајна разлика у просечним вредностима холестерола између испитиваних група ($F=4,786$; $p=0,011$). Статистички значајна разлика постојала је између испитаника са A⁺X⁺ и A⁺X⁻ ($p=0,013$), док није постојала статистички значајна разлика између испитаника са A⁺X⁺ у односу на испитанике са A⁻X⁻ ($p=0,068$) и A⁻X⁻ у односу на A⁺X⁻ ($p=0,750$) (Табела 43; Слика 45).

Табела 43. Вредности холестерола испитаника по испитиваним групама

холестерол	\bar{x}	sd	med	min	max	p-вредност
A ⁺ X ⁺	4,1	1,5	4,1	1,5	7,8	0,011
A ⁻ X ⁻	5,0	1,4	5,0	3,0	8,7	
A ⁺ X ⁻	5,3	1,4	5,0	3,1	9,4	

Слика 45. Вредности холестерола испитаника по испитиваним групама

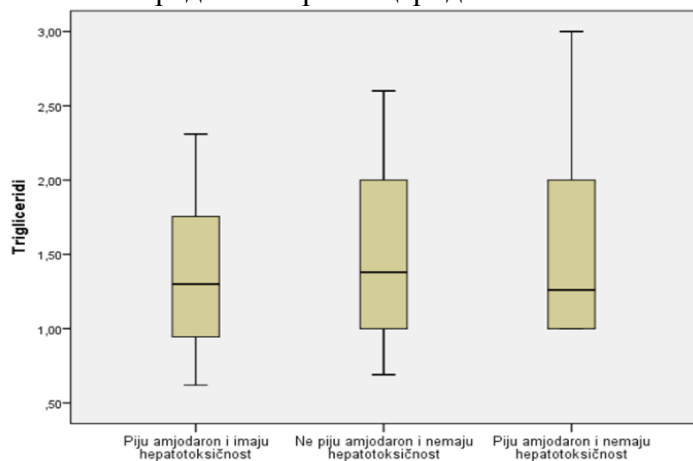


Није постојала статистички значајна разлика у медијанама триглицерида између испитиваних група (hi -квадрат=0,936; $p=0,626$) (Табела 44; Слика 46).

Табела 44. Вредности триглицерида испитаника по испитиваним групама

триглицериди	\bar{x}	sd	med	min	max	p-вредност
A ⁺ X ⁺	1,5	0,9	1,3	0,6	4,3	0,011
A ⁻ X ⁻	1,8	1,6	1,4	0,7	8,0	
A ⁺ X ⁻	2,1	1,7	1,3	1,0	7,4	

Слика 46. Вредности триглицерида испитаника по испитиваним групама

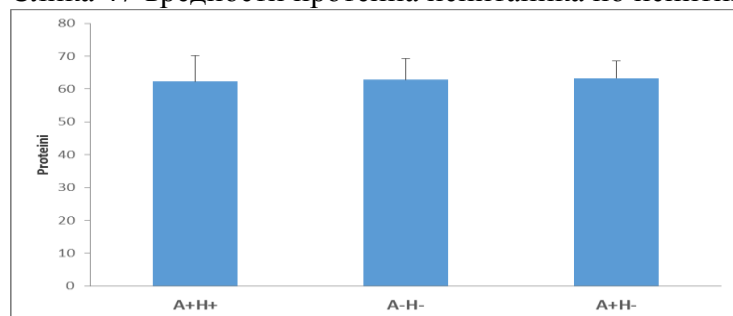


Није постојала статистички значајна разлика у просечним вредностима протеина између испитиваних група ($F=0,101$; $p=0,904$) (Табела 45; Слика 47).

Табела 45. Вредности протеина испитаника по испитиваним групама

протеини	\bar{x}	sd	med	min	max	p-вредност
A ⁺ X ⁺	62,3	7,8	62,0	40,0	77,0	0,904
A ⁻ X ⁻	62,8	6,5	62,0	50,0	74,0	
A ⁺ X ⁻	63,3	5,2	65,0	50,0	70,0	

Слика 47-вредности протеина испитаника по испитиваним групама

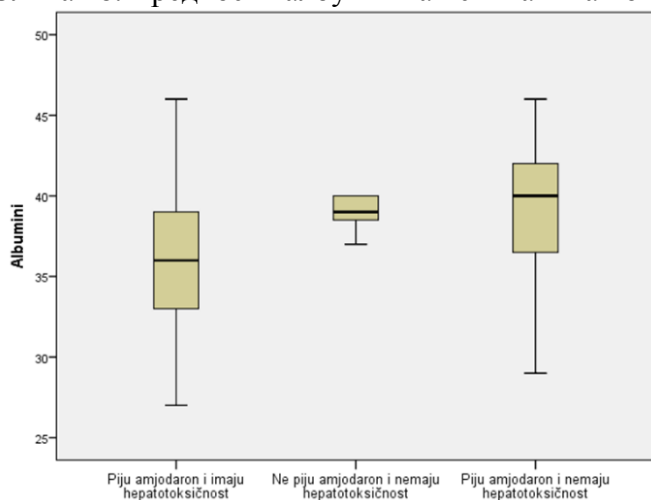


Постојала је статистички значајна разлика у медијанама албумина између испитиваних група (hi -квадрат=9,337; $p=0,009$). Постојала је статистички значајна разлика између испитаника са A^+X^+ у односу на испитанике са A^-X^- ($p=0,013$) и A^+X^+ у односу на A^+X^- ($p=0,010$). Није постојала статистички значајна разлика између испитаника са A^-X^- у односу на испитанике са A^+X^- ($p=0,452$) (Табела 46; Слика 48).

Табела 46. Вредности албумина испитаника по испитиваним групама

албумини	\bar{x}	sd	med	min	max	p-вредност
A^+X^+	35,8	4,6	36,0	27,0	46,0	0,009
A^-X^-	38,8	4,8	39,0	25,0	49,0	
A^+X^-	39,3	4,8	40,0	29,0	46,0	

Слика 48. Вредности албумина испитаника по испитиваним групама

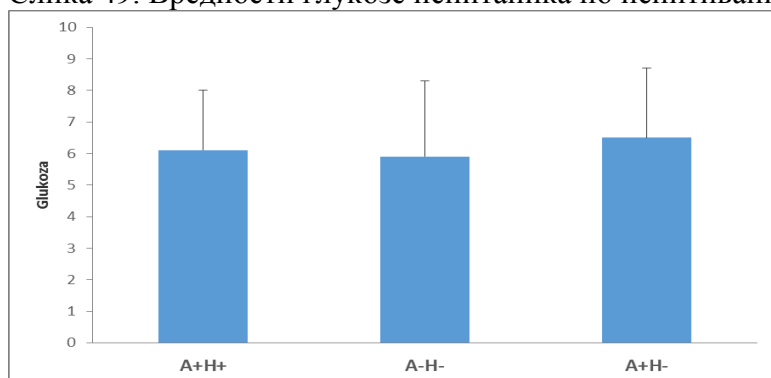


Није постојала статистички значајна разлика у просечним вредностима глукозе између испитиваних група ($F=0,455$; $p=0,636$) (Табела 47; Слика 49).

Табела 47. Вредности глукозе испитаника по испитиваним групама

глукоза	\bar{x}	sd	med	min	max	p-вредност
A^+X^+	6,1	1,9	5,9	2,3	11,4	0,636
A^-X^-	5,9	2,4	5,8	2,0	13,0	
A^+X^-	6,5	2,2	5,8	4,0	13,0	

Слика 49. Вредности глукозе испитаника по испитиваним групама

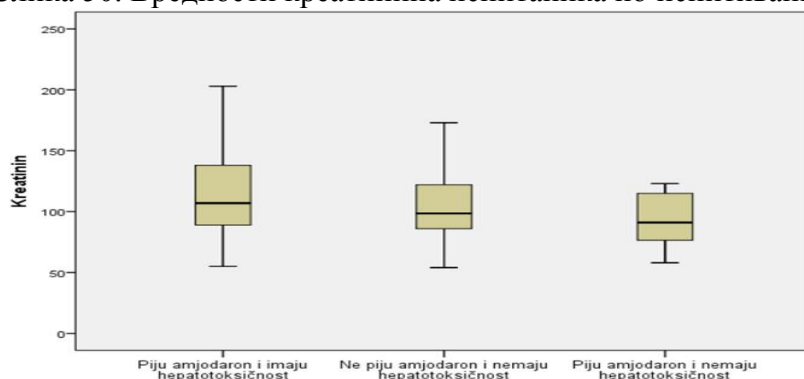


Није постојала статистички значајна разлика у медијанама креатинина између испитиваних група ($\chi^2=2,679$; $p=0,262$)(Табела 48; Слика 50).

Табела 48. Вредности креатинин испитаника по испитиваним групама

креатинин	\bar{x}	sd	med	min	max	p-вредност
A ⁺ X ⁺	117,7	43,7	107,0	55,0	213,0	
A ⁻ X ⁻	105,9	38,0	98,5	29,0	227,0	0,009
A ⁺ X ⁻	101,9	41,6	91,0	58,0	220,0	

Слика 50. Вредности креатинина испитаника по испитиваним групама

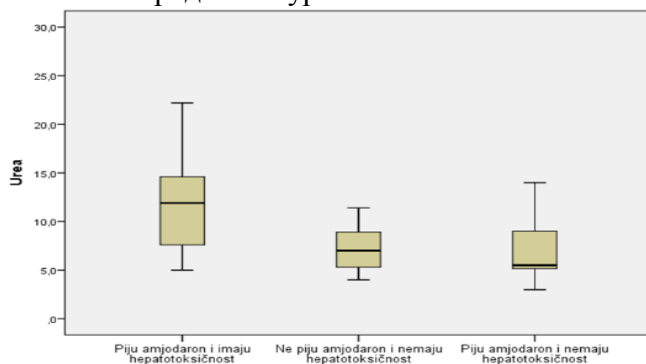


Постојала је статистички значајна разлика у медијанама урее између испитиваних група ($\chi^2=13,595$; $p=0,001$). Постојала је статистички значајна разлика између испитаника са A⁺X⁺ у односу на испитанике са A⁻X⁻ ($p=0,008$) и A⁺X⁺ у односу на A⁺X⁻ ($p=0,001$). Није постојала статистички значајна разлика између испитаника са A⁻X⁻ у односу на испитанике са A⁺X⁻ ($p=0,367$) (Табела 49; Слика 51).

Табела 49. Вредности уреје испитаника по испитиваним групама

уреа	\bar{x}	sd	med	min	max	p-вредност
A ⁺ X ⁺	11,9	5,6	11,9	5,0	27,1	0,001
A ⁻ X ⁻	11,8	17,9	7,0	4,0	95,0	
A ⁺ X ⁻	7,1	3,0	5,5	3,0	14,0	

Слика 51. Вредности уреје испитаника по испитиваним групама

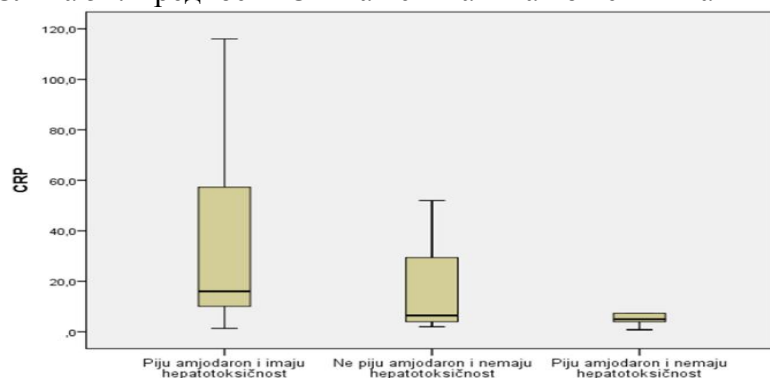


Постојала је статистички значајна разлика у медијанама CRP-а између испитиваних група (χ^2 -квадрат=7,577; $p=0,023$). Статистички значајна разлика постојала је између испитаника са A⁺X⁺ и A⁺X⁻ ($p=0,008$), док није постојала статистички значајна разлика између испитаника са A⁺X⁺ у односу на испитанике са A⁻X⁻ ($p=0,066$) и A⁻X⁻ у односу на A⁺X⁻ ($p=0,392$)(Табела 50;Слика 52).

Табела 50. Вредности CRP-а испитаника по испитиваним групама

CRP	\bar{x}	sd	med	min	max	p-вредност
A ⁺ X ⁺	36,9	42,9	16,0	1,3	176,0	0,023
A ⁻ X ⁻	17,7	20,2	6,5	2,0	83,0	
A ⁺ X ⁻	16,8	27,8	5,0	0,8	107,0	

Слика 52. Вредности CRP-а испитаника по испитиваним групама

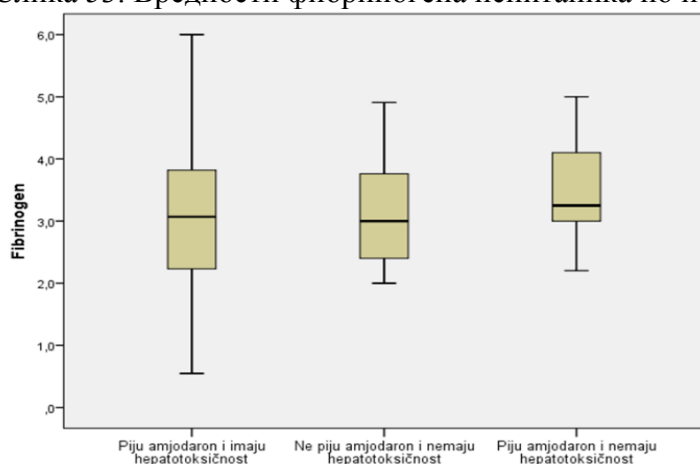


Није постојала статистички значајна разлика у медијанама фибриногена између испитиваних група (hi -квадрат=4,032; $p=0,133$) (Табела 51;Слика 53).

Табела 51. Вредности фибриногена испитаника по испитиваним групама

фибриногена	\bar{x}	sd	med	min	max	p-вредност
A ⁺ X ⁺	3,2	1,6	3,1	0,5	7,7	0,122
A ⁻ X ⁻	3,4	1,5	3,0	2,0	7,8	
A ⁺ X ⁻	3,8	1,3	3,3	2,2	8,0	

Слика 53. Вредности фибриногена испитаника по испитиваним групама

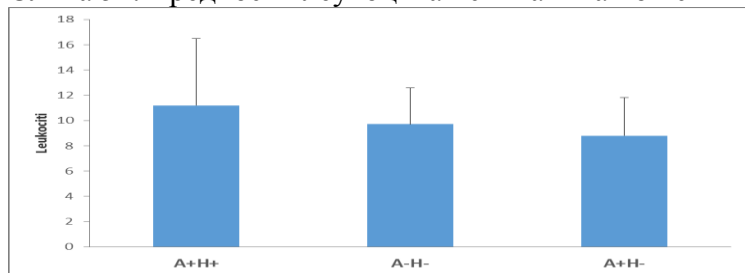


Није постојала статистички значајна разлика у просечним вредностима леукоцита између испитиваних група ($F=2,150$; $p=0,124$) (Табела 52:Слика 54).

Табела 52. Вредности леукоцита испитаника по испитиваним групама

леукоцити	\bar{x}	sd	med	min	max	p-вредност
A ⁺ X ⁺	11,2	5,3	10,6	5,0	28,2	0,124
A ⁻ X ⁻	9,7	2,9	9,6	4,1	15,0	
A ⁺ X ⁻	8,8	3,0	8,7	4,5	14,2	

Слика 54. Вредности леукоцита испитаника по испитиваним групама

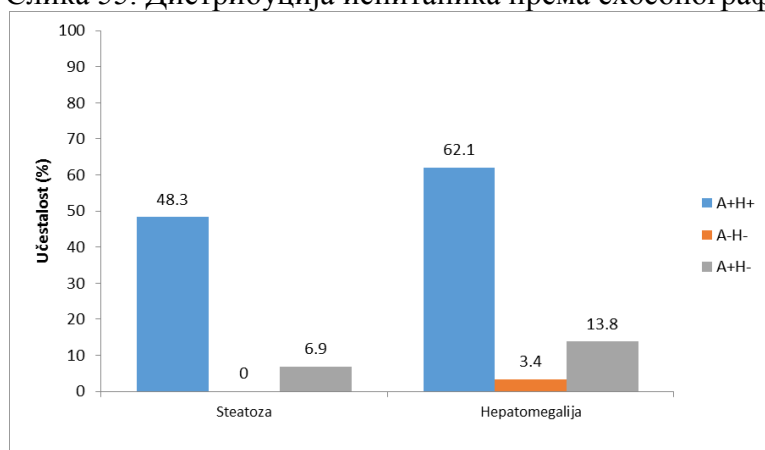


Стеатозу је имало 48,3% испитаника са A^+X^+ , ниједан 0,0% са A^-X^- и 6,9% A^+X^- , што је статистички значајна разлика (hi-квадрат тест=26,345; $p<0,001$). Хепатомегалију имало је 62,1% испитаника са A^+X^+ , 3,4% са A^-X^- и 13,8% A^+X^- , што је статистички значајна разлика (hi-квадрат тест=29,197; $p<0,001$) (Табела 53 ; Слика 55).

Табела 53. Дистрибуција испитаника према ехосонографском налазу абдомена

Варијабле	A^+X^+		A^-X^-		A^+X^-		p-вредност
	n	%	n	%	n	%	
Стеатоза	14	48,3	0	0,0	2	6,9	<0,001
Хепатомегалија	18	62,1	1	3,4	4	13,8	<0,001

Слика 55. Дистрибуција испитаника према ехосонографском налазу абдомена



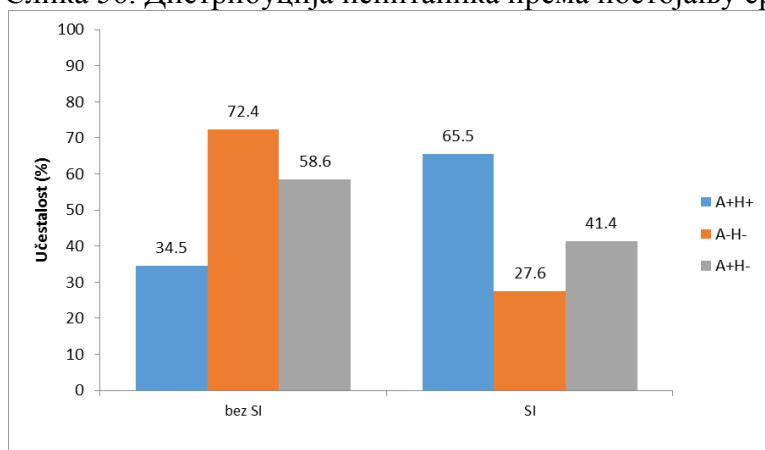
SI је имало 65,5% испитаника са A^+X^+ , 27,6% са A^-X^- и 41,4% A^+X^- , што је статистички значајна разлика (hi-квадрат тест=8,644; $p=0,013$) (Табела 54; Слика 56).

Табела 54. Дистрибуција испитаника према постојању срчане инсуфицијенције

SI	A^+X^+		A^-X^-		A^+X^-		p-вредност
	n	%	n	%	n	%	
не	10	34,5	21	72,4	17	58,6	
да	19	65,5	8	27,6	12	41,4	0,013
Укупно	29	100,0	29	100,0	29	100,0	

SI-срчана инсуфицијенција

Слика 56. Дистрибуција испитаника према постојању срчане инсуфицијенције

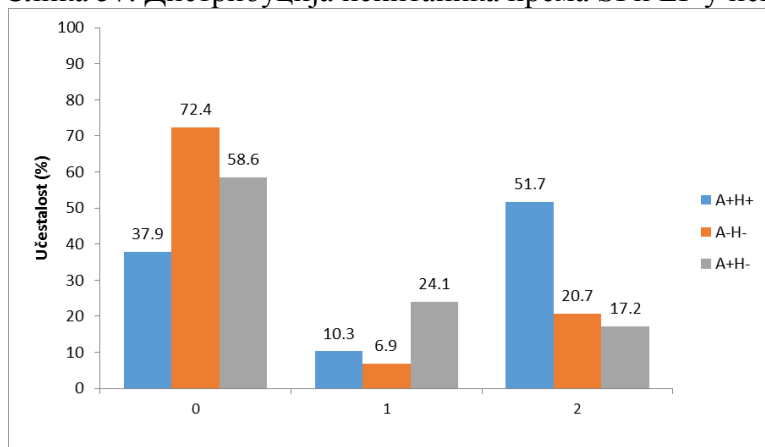


Испитаници са A^+X^+ најчешће су имали SI са $EF \leq 45\%$ (51,7%), док су испитаници са A^-X^- и A^+X^- најчешће били без SI (72,4% према 58,6%, респективно), што је статистички значајна разлика (Fisherov тест тачне вероватноће; $p=0,012$) (Табела 55; Слика 57).

Табела 55. Дистрибуција испитаника према SI и EF у испитиваним групама

SI EF	A^+X^+		A^-X^-		A^+X^-		p-вредност
	n	%	n	%	n	%	
0	11	37,9	21	72,4	17	58,6	0,012
1	3	10,3	2	6,9	7	24,1	
2	15	51,7	6	20,7	5	17,2	
Укупно	29	100,0	29	100,0	29	100,0	

Слика 57. Дистрибуција испитаника према SI и EF у испитиваним групама

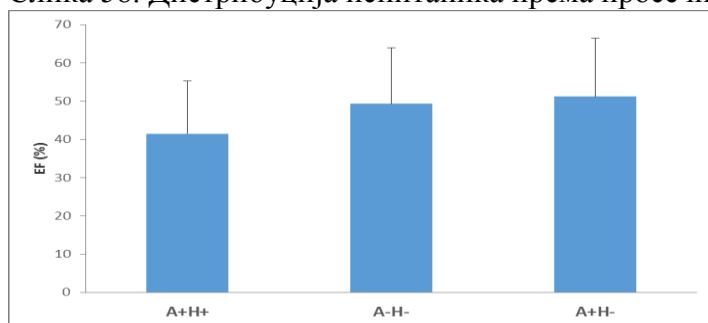


Није постојала статистички значајна разлика у просечним вредностима EF између испитиваних група ($F=2,649$; $p=0,080$)(Табела 56 ; Слика58).

Табела 56. Дистрибуција испитаника према просечној EF

EF	\bar{x}	sd	med	min	max	p-вредност
A ⁺ X ⁺	41,5	13,8	40,0	24,0	77,0	0,080
A ⁻ X ⁻	49,3	14,6	52,0	20,0	70,0	
A ⁺ X ⁻	51,2	15,2	45,0	27,0	77,0	

Слика 58. Дистрибуција испитаника према просечној EF



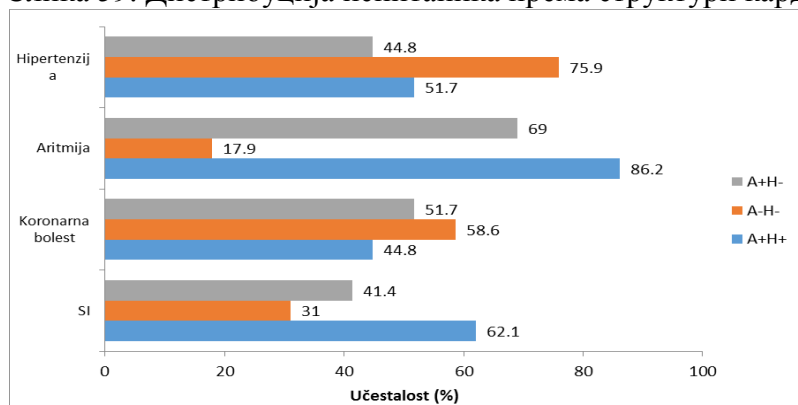
SI је имало 62,1% испитаника са A⁺X⁺, 31,0% са A⁻X⁻ и 41,4% са A⁺X⁻, што није статистички значајна разлика (hi-квадрат тест=5,856; $p=0,054$). Коронарну болест је имало 44,8% испитаника са A⁺X⁺, 58,6% са A⁻X⁻ и 51,7% са A⁺X⁻, што није статистички значајна разлика (hi-квадрат тест=1,105; $p=0,576$). Аритмије је имало 86,2% испитаника са A⁺X⁺, 17,9% са A⁻X⁻ и 69,0% A⁺X⁻, што је статистички значајна разлика (hi-квадрат тест=29,452; $p<0,001$). Хипертензију је имало 51,7% испитаника са A⁺X⁺, 75,9% са A⁻X⁻ и 44,8% са A⁺X⁻, што је статистички значајна разлика (hi-квадрат тест=6,302; $p=0,043$) (Табела 57; Слика 59).

Табела 57. Дистрибуција испитаника према структури кардиоваскуларних болести

Обољења	A ⁺ X ⁺		A ⁻ X ⁻		A ⁺ X ⁻		p-вредност
	n	%	n	%	n	%	
SI	18	62,1	9	31,0	12	41,4	0,054
Хипертензија	13	44,8	17	58,6	15	51,7	0,576
Коронарна болест	25	86,2	5	17,9	20	69,0	<0,001
Аритмија	15	51,7	22	75,9	13	44,8	0,043

SI-срчана инсуфицијенција

Слика 59. Дистрибуција испитаника према структури кардиоваскуларних болести

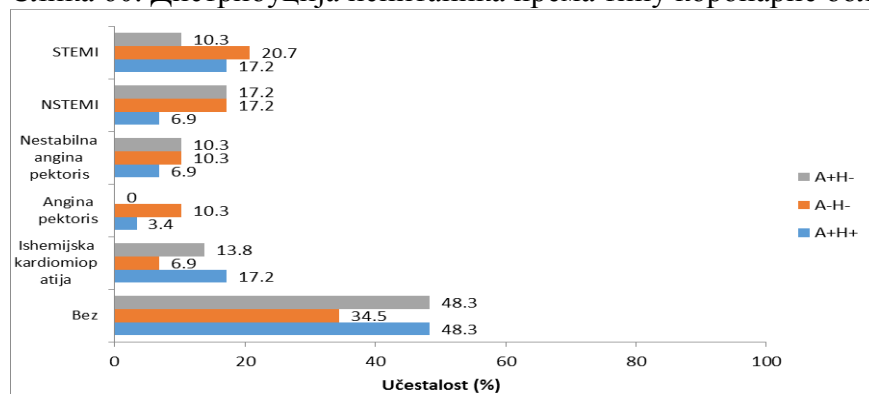


Све групе испитаника су најчешће биле без коронарних болести. Не постоји статистички значајна разлика у учесталости типа коронарне болести између испитиваних група (Fisherov тест тачне вероватноће; $p=0,640$)(Табела 58;Слика 60).

Табела 58. Дистрибуција испитаника према типу коронарне болести

Тип коронарне болести	A ⁺ X ⁺		A ⁻ X ⁻		A ⁺ X ⁻		p-вредност
	n	%	n	%	n	%	
Без	14	48,3	10	34,5	14	48,3	0,640
Ишемијска кардиомиопатија	5	17,2	2	6,9	4	13,8	
Ангина пекторис	1	3,4	3	10,3	0	0,0	
Нестабилна ангина пекторис	2	6,9	3	10,3	3	10,3	
NSTEMI	2	6,9	5	17,2	5	17,2	
STEMI	5	17,2	6	20,7	3	10,3	
Укупно	29	100,0	29	100,0	29	100,0	

Слика 60. Дистрибуција испитаника према типу коронарне болести

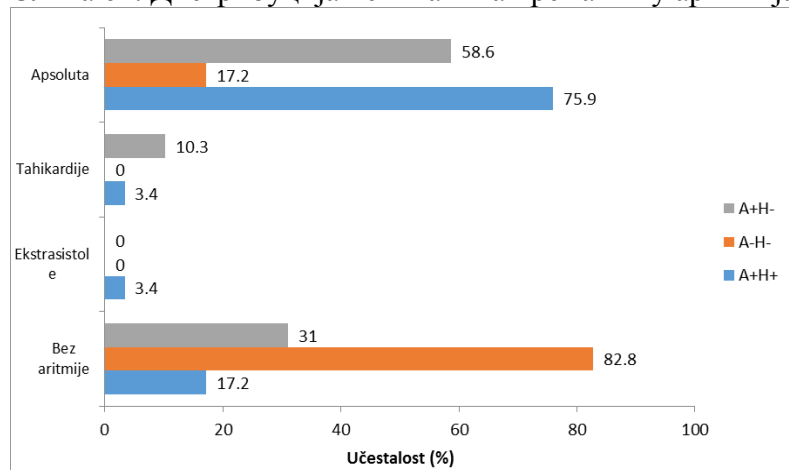


Испитаници са A^+X^+ и A^+X^- најчешће су имали апсолуту (75,9% према 58,6%, респективно), док су испитаници са A^-X^- најчешће били без аритмије (82,8%), што је статистички значајна разлика (Fisherov тест тачне вероватноће; $p < 0,001$) (Табела 59; Слика 61).

Табела 59. Дистрибуција испитаника према типу аритмија

Аритмија	A^+X^+		A^-X^-		A^+X^-		p- вредност
	n	%	n	%	n	%	
Без аритмије	5	17,2	24	82,8	9	31,0	<0,001
Екстрасистоле	1	3,4	0	0,0	0	0,0	
Тахикардије	1	3,4	0	0,0	3	10,3	
Апсолута	22	75,9	5	17,2	17	58,6	
Укупно	29	100,0	29	100,0	29	100,0	

Слика 61. Дистрибуција испитаника према типу аритмија

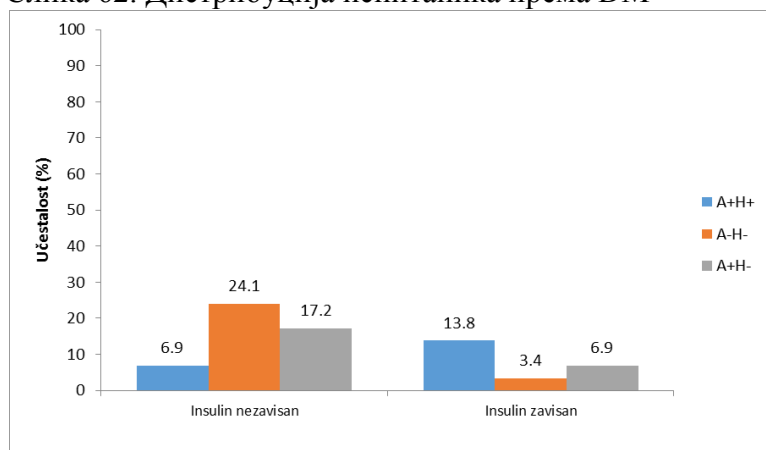


Инсулин независан ДМ имало је 13,8% испитаника са A^+X^+ , 3,4% са A^-X^- и 6,9% са A^+X^- , што није статистички значајна разлика (Fisherov тест тачне вероватноће; $p=0,236$). Инсулин зависан ДМ имало је 13,8% испитаника са A^+X^+ , 3,4% са A^-X^- и 6,9% са A^+X^- , што није статистички значајна разлика (Fisherov тест тачне вероватноће; $p=0,492$) (Табела 60; Слика 62).

Табела 60. Дистрибуција испитаника према DM

DM	A ⁺ X ⁺		A ⁻ X ⁻		A ⁺ X ⁻		p- вредност
	n	%	n	%	n	%	
Инсулин независан	2	6,9	7	24,1	5	17,2	0,236
Инсулин зависан	4	13,8	1	3,4	2	6,9	0,492

Слика 62. Дистрибуција испитаника према DM



Табела 61. Најчешће коришћени лекови у студијским групама (изузев амјодарона)

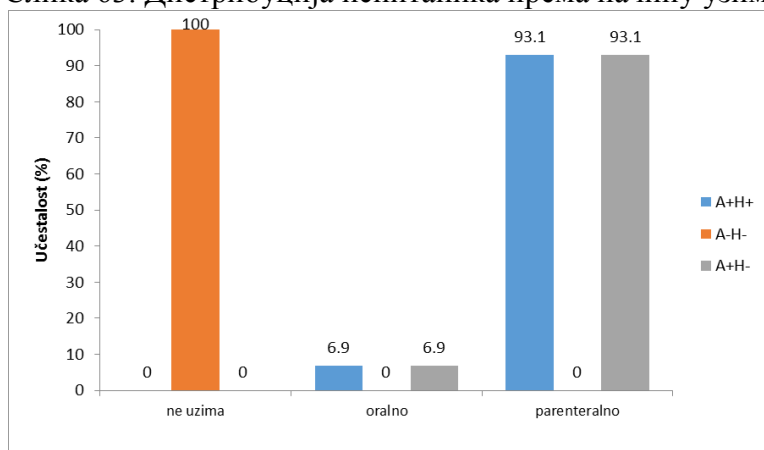
Лекови	A ⁺ X ⁺		A ⁻ X ⁻		A ⁺ X ⁻		p- вредност
	n	%	n	%	n	%	
Блокатори H ₂ рецептора	8	27,6	3	10,3	6	20,7	0,249
Инхибитори протонске пумпе	21	72,4	21	72,4	11	37,9	0,008
метформин	1	3,4	4	13,8	5	17,2	0,326
Деривати сулфонамида	0	0,0	0	0,0	0	0,0	NA
Еноксапарин-Na	16	55,2	11	37,9	13	44,8	0,415
Ацетилсалицилна киселина	17	58,6	21	72,4	17	58,6	0,453
Клопидогрел	14	48,3	15	51,7	7	24,1	0,067
Органски нитрати	12	41,4	13	44,8	12	41,4	0,954
Триметазидин	8	27,6	7	24,1	7	24,1	0,941
Диуретици хенлеове петље	22	75,9	11	37,9	13	44,8	0,009
Спиринолактон	7	24,1	3	10,3	5	17,2	0,380
Селективни бета блокатори	20	69,0	13	44,8	17	58,6	0,176
Дихидропиридици	4	13,8	3	10,3	2	6,9	0,905
АСЕинхибитори	14	48,3	19	65,5	16	55,2	0,412
Аторвастатин	12	41,4	19	65,5	12	41,4	0,105
Бензодиазепини	2	6,9	5	17,2	7	24,1	0,236
Ксантини	12	41,4	4	13,8	7	24,1	0,055
Други хепатотоксични лек	24	82,8	17	58,6	12	41,4	0,005

Дистрибуција начина примене амјодарона приказана је у табели 62 (Слика 63).

Табела 62. Дистрибуција испитаника према начину узимања амјодарона

Аритмија	A ⁺ X ⁺		A ⁻ X ⁻		A ⁺ X ⁻		p-вредност
	n	%	n	%	n	%	
не узима	0	0,0	29	100,0	0	0,0	NA
орално	2	6,9	0	0,0	2	6,9	
парентерално	27	93,1	0	0,0	27	93,1	
Укупно	29	100,0	29	100,0	29	100,0	

Слика 63. Дистрибуција испитаника према начину узимања амјодарона

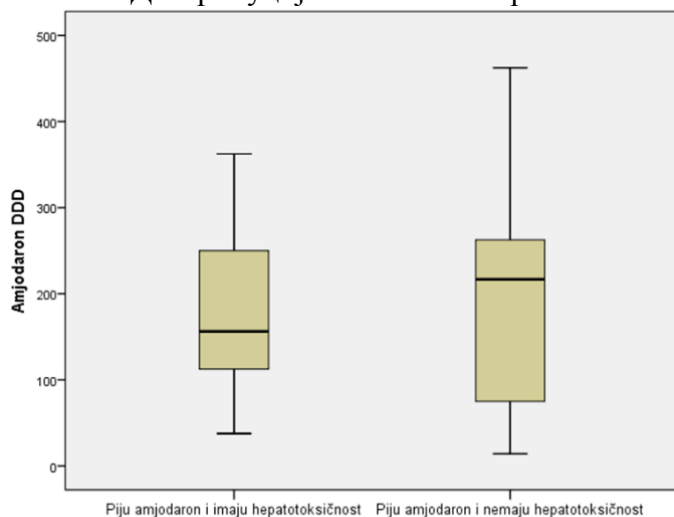


Не постоји статистички значајна разлика у медијанама DDD амјодарона између испитиваних група (U=415,0; p=0,932) (Табела 63;Слика 64)

Табела 63. Дистрибуција испитаника према DDD амјодарона

Amjodaron DDD	\bar{x}	sd	med	min	max	p-вредност
A ⁺ X ⁺	195,5	130,8	156,3	37,5	625,0	0,932
A ⁺ X ⁻	212,9	171,8	216,7	14,1	687,5	

Слика 64. Дистрибуција испитаника према DDD амјодарона

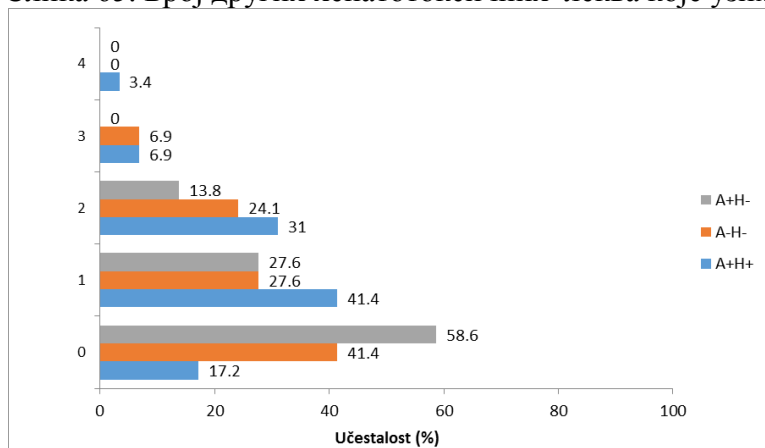


Постоји статистички значајна разлика у броју других хепатотоксичних лекова ($\chi^2=10,963$; $p=0,004$). Статистички значајна разлика постоји између испитаника са A^+X^+ у односу на испитанике са A^+X^- ($p=0,001$), док не постоји статистички значајна разлика између испитаника са A^+X^+ у односу на испитанике са A^-X^- ($p=0,111$), као ни између A^-X^- и A^+X^- ($p=0,103$) (Табела 64 ; Слика 65).

Табела 64. Број других хепатотоксичних лекова које узимају испитаници по групама

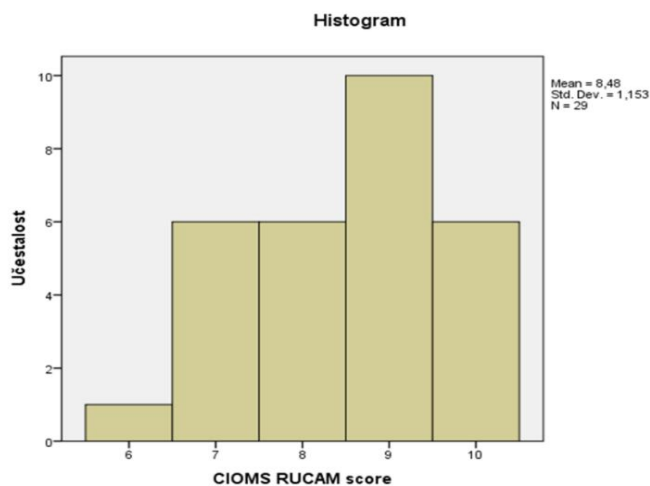
Број других хепатотоксичних лекова	A^+X^+		A^-X^-		A^+X^-		p-вредност
	n	%	n	%	n	%	
0	5	17,2	12	41,4	17	58,6	0,004
1	12	41,4	8	27,6	8	27,6	
2	9	31,0	7	24,1	4	13,8	
3	2	6,9	2	6,9	0	0,0	
4	1	3,4	0	0,0	0	0,0	
Укупно	29	100,0	29	100,0	29	100,0	

Слика 65. Број других хепатотоксичних лекова које узимају испитаници по групама



Код испитаника A⁺X⁺ просечна вредност CIOMS RUCAM скорa износи 8,48±1,2. Најнижа вредност износи 6 а максимална 10 (Слика 66).

Слика 66. Процена CIOMS RUCAM скорa за групу случај

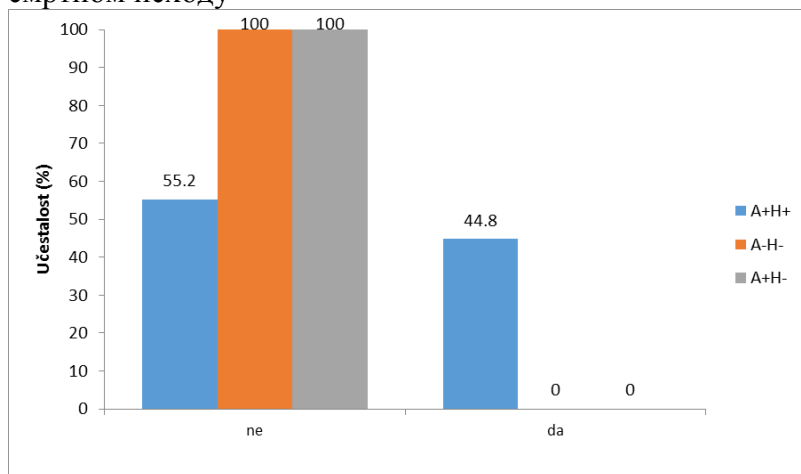


Постоји статистички значајна разлика у учесталости симптоматске хепатотоксичности између испитиваних група (Fisherov тест тачне вероватноће; p<0,001) (Табела 65; Слика 67).

Табела 65. Дистрибуција испитаника према симптоматској хепатотоксичности и смртном исходу

Симптоматска хепатотоксичност	A ⁺ X ⁺		A ⁻ X ⁻		A ⁺ X ⁻		p-вредност
	n	%	n	%	n	%	
не	16	55,2	29	100,0	29	100,0	
да	13	44,8	0	0,0	0	0,0	<0,001
Укупно	29	100,0	29	100,0	29	100,0	

Слика 67. Дистрибуција испитаника према симптоматској хепатотоксичности и смртном исходу

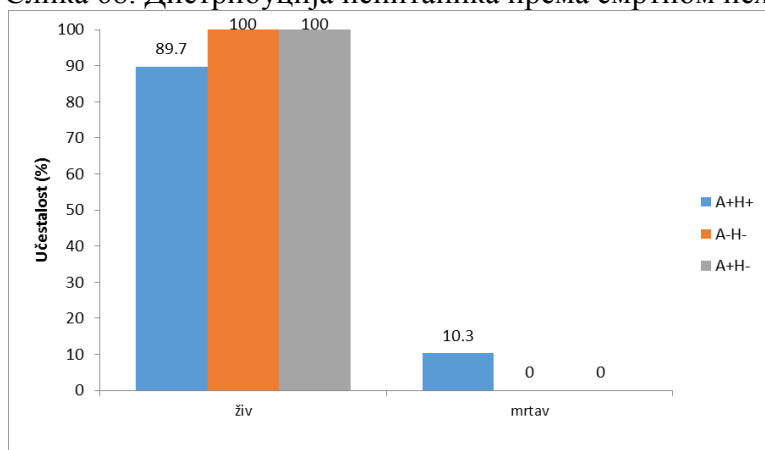


Не постоји статистички значајна разлика у учесталости исхода између испитиваних група (Fisherov тест тачне вероватноће; $p=0,103$) (Табела 66; Слика 68).

Табела 66. Дистрибуција испитаника према смртном исходу

Морталитет	A ⁺ X ⁺		A ⁻ X ⁻		A ⁺ X ⁻		p-вредност
	n	%	n	%	n	%	
жив	26	89,7	29	100,0	29	100,0	
мртав	3	10,3	0	0,0	0	0,0	0,103
Укупно	29	100,0	29	100,0	29	100,0	

Слика 68. Дистрибуција испитаника према смртном исходу

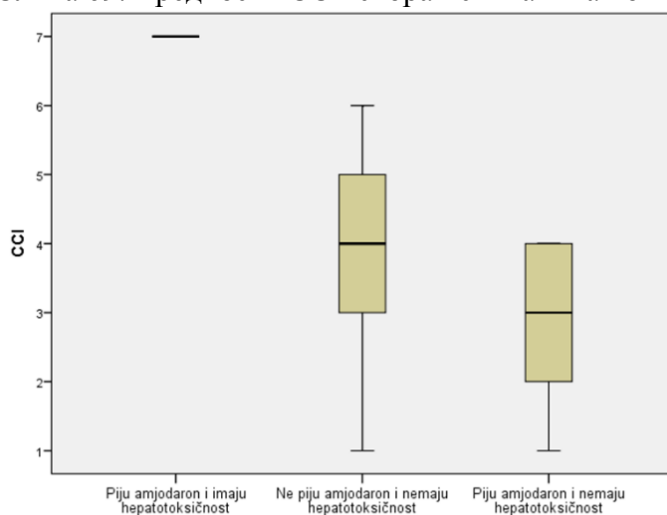


Постоји статистички значајна разлика у медијанама CCI скора између испитиваних група (hi-квадрат=59,840; $p < 0,001$). Статистички значајна разлика постоји између испитаника са A+X+ у односу на испитанике са A-X- ($p < 0,001$) и A+X- ($p < 0,001$), као и између испитаника са A-X⁻ и A⁺X⁻ ($p = 0,077$) (Табела 67; Слика 69).

Табела 67. Вредности CCI скора испитаника по испитиваним групама

CCI	\bar{x}	sd	med	min	max	p-вредност
A ⁺ H ⁺	6,8	0,6	7,0	5,0	7,0	
A ⁻ H ⁻	3,6	1,3	4,0	1,0	6,0	<0,001
A ⁺ H ⁻	3,0	1,1	3,0	1,0	4,0	

Слика 69. Вредности CCI скора испитаника по испитиваним групама

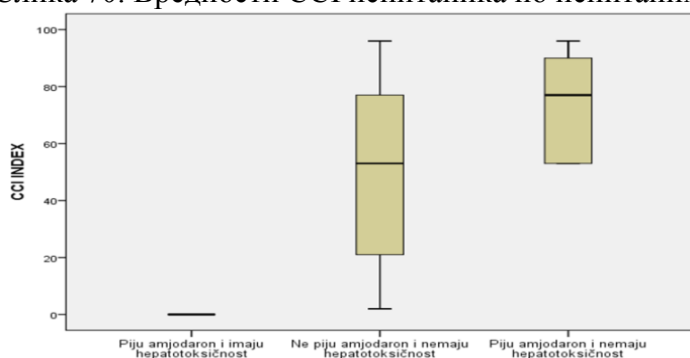


Постоји статистички значајна разлика у медијанама ССИ индекса између испитиваних група (hi -квадрат=59,824; $p < 0,001$). Статистички значајна разлика постоји између испитаника са A^+X^+ у односу на испитанике са A^-X^- ($p < 0,001$) и A^+X^- ($p < 0,001$), као и између испитаника са A^-X^- и A^+X^- ($p = 0,068$) (Табела 68; Слика 69).

Табела 68. Вредности ССИ испитаника по испитаним групама

CCI INDEX	\bar{x}	sd	med	min	max	p-вредност
A^+X^+	1,7	5,4	0,0	0,0	21,0	
A^-X^-	57,5	27,9	53,0	2,0	96,0	<0,001
A^+X^-	71,4	17,7	77,0	53,0	96,0	

Слика 70. Вредности ССИ испитаника по испитаним групама



4.2.2 Анализа SOD2 генотипова

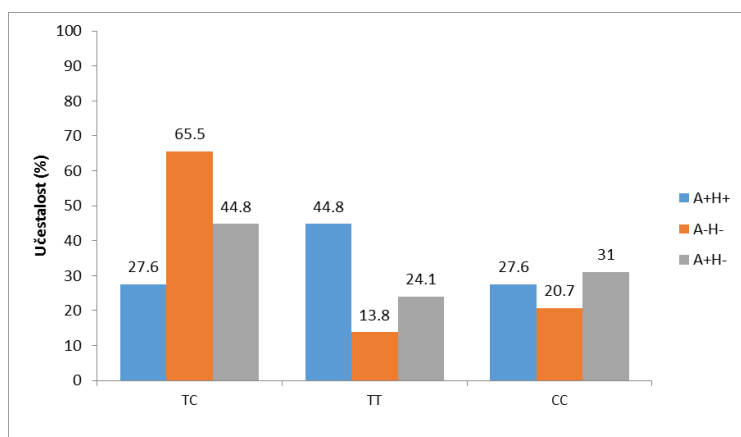
Постоји статистички значајна разлика у учесталости генотипа између испитиваних група (hi -квадрат=10,409; $p = 0,034$) (Табела 69; Слика 71)

Табела 69. Дистрибуција генотипа испитаника по испитиваним групама

Генотип	A^+X^+		A^-X^-		A^+X^-		p-вредност
	n	%	n	%	n	%	
ТС	8	27,6	19	65,5	13	44,8	0,034
ТТ	13	44,8	4	13,8	7	24,1	
СС	8	27,6	6	20,7	9	31,0	
Укупно	29	100,0	29	100,0	29	100,0	

СС је хомозигот мутиран; ТТ је хомозигот нормалан; СТ хетерозигот, носилац мутације.

Слика 71. Дистрибуција генотипа испитаника по испитиваним групама

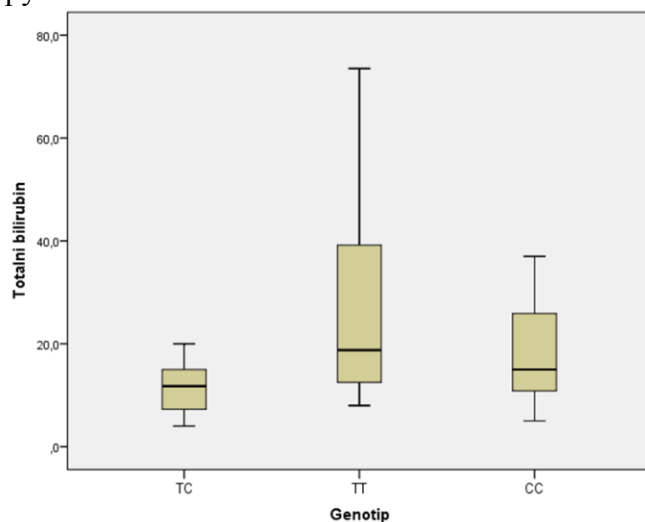


Постоји статистички значајна разлика у медијанама укупног билирубина између испитиваних група ($\chi^2=10,635$; $p=0,005$). Статистички значајна разлика постоји између TC и TT ($p=0,001$), док не постоји између TC и CC ($p=0,102$), као ни између TT и CC ($p=0,154$) (Табела 70; Слика 72).

Табела 70. Вредности укупног билирубина испитаника у различити, испитиваним групама

генотип	\bar{x}	sd	med	min	max	p-вредност
TC	15,3	13,0	11,8	4,0	68,0	0,005
TT	28,3	20,5	18,8	8,0	73,5	
CC	19,3	12,8	15,0	5,0	56,0	

Слика 72. Вредности укупног билирубина испитаника у различити, испитиваним групама

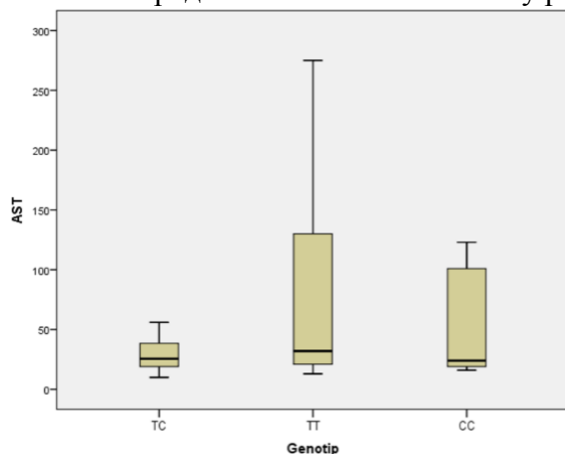


Не постоји статистички значајна разлика у медијанама AST између испитиваних група (hi-квадрат=2,592; p=0,274) (Табела 71;Слика 73).

Табела 71. Вредности AST испитаника у различитим, испитиваним групама

Генотип	\bar{x}	sd	med	min	max	p-вредност
TC	15,3	13,0	11,8	4,0	68,0	0,274
TT	28,3	20,5	18,8	8,0	73,5	
CC	19,3	12,8	15,0	5,0	56,0	

Слика 73. Вредности AST испитаника у различитим, испитиваним групама

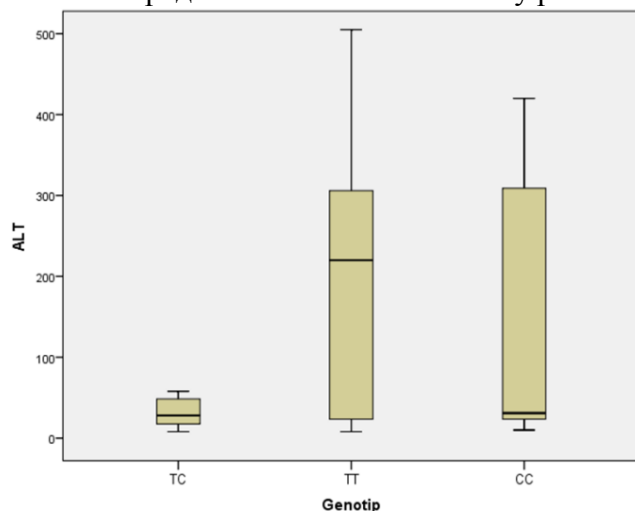


Постоји статистички значајна разлика у медијанама ALT између испитиваних група (hi-квадрат=6,698; p=0,035).Статистички значајна разлика постоји између TC и TT (p=0,020), док не постоји између TC и CC (p=0,057), као ни између TT и CC (p=0,733) (Табела 72; Слика 74).

Табела 72. Вредности ALT испитаника у различитим, испитиваним групама

Генотип	\bar{x}	sd	med	min	max	p-вредност
TC	81,9	131,5	28,0	8,0	669,0	0,035
TT	437,0	1158,0	220,0	8,0	5748,0	
CC	234,4	419,1	31,0	10,0	1753,0	

Слика74. Вредности ALT испитаника у различитим, испитиваним групама



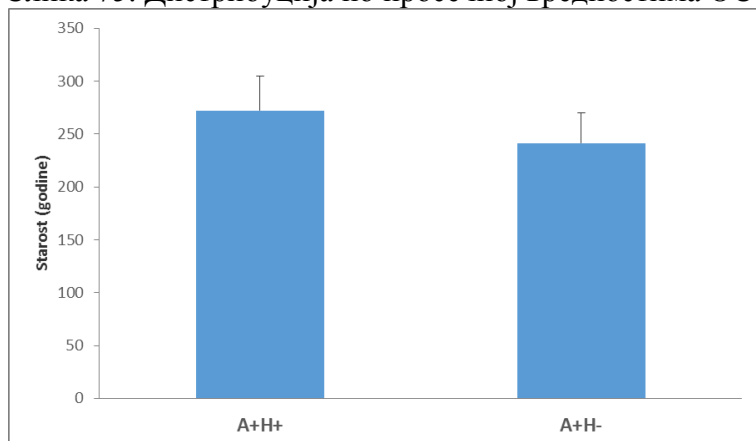
4.2.3 Дијагностичке перформансе теста ОТС-а и жучних киселина

Постоји статистички значајна разлика у просечној вредностима ОТС-а између испитиваних група ($t=3,800$; $p<0,001$) (Табела 73; Слика75).

Табела 73. Дистрибуција по просечној вредностима ОТС-а у испитиваним групама

ОТС	\bar{x}	sd	med	min	max	p-вредност
A ⁺ X ⁺	272,2	32,7	272,9	182,5	312,5	<0,001
A ⁺ X ⁻	241,4	28,8	242,7	193,0	300,5	

Слика 75. Дистрибуција по просечној вредностима ОСТ-а у испитиваним групама

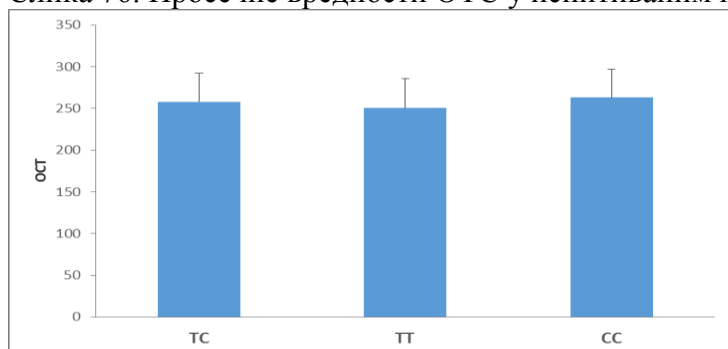


Не постоји статистички значајна разлика у просечној вредности ОТС-а између испитиваних група ($F=0,623$; $p=0,540$) (Табела 72; Слика 76).

Табела 74. Просечне вредности ОТС у испитиваним групама

ОТС	\bar{x}	sd	med	min	max	p-вредност
ТС	257,8	34,6	259,1	199,4	312,5	0,540
ТТ	250,5	35,1	250,2	182,5	305,4	
СС	263,0	33,6	269,7	193,0	309,6	

Слика 76. Просечне вредности ОТС у испитиваним групама

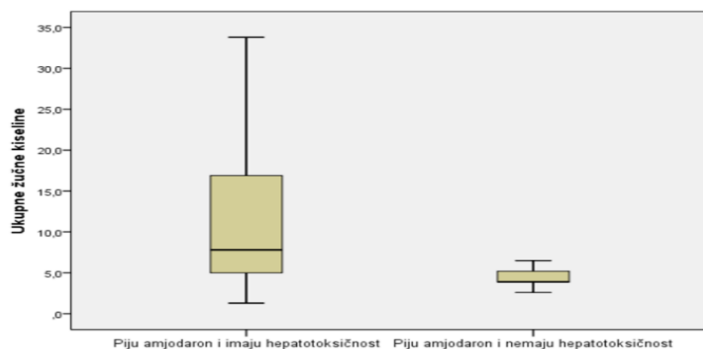


Постоји статистички значајна разлика у медијанама укупних жучних киселина између A^+X^+ и A^+X^- ($p=0,004$). (Табела 75; Слика 77).

Табела 75. Просечна вредност жучних киселина по испитиваним групама

Укупне жучне киселине	\bar{x}	sd	med	min	max	p-вредност
A^+X^+	11,9	10,2	7,8	1,3	41,6	0,004
A^+X^-	5,7	4,2	3,9	2,6	20,8	

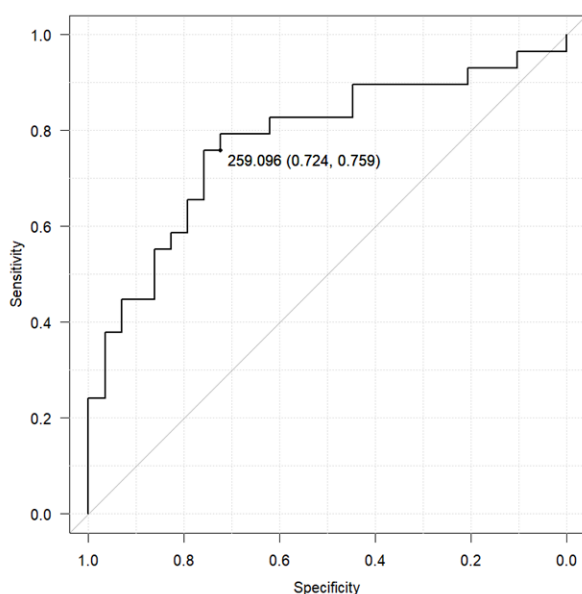
Слика 77. Просечна вредност жучних киселина по испитиваним групама



4.2.3.1. ROC OTC и хепатотоцелуларно оштећење

Оптимална вредност прага OTC за детекцију хепатотоцелуларног оштећења износи 259,1. Површина испод криве OTC износи 0,78 (95% ЦИ 0,65 – 0,90). За задату вредност прага од 259,1 оцене тачности OTC у детекцији хепатотоцелуларног оштећења износе: $S_n = 76\%$ и $S_p = 72\%$. Оптимална cut off вредност износи 259,1 и израчуната је на основу критеријума да је збир сензитивности и специфичности максималан. (Слика 78).

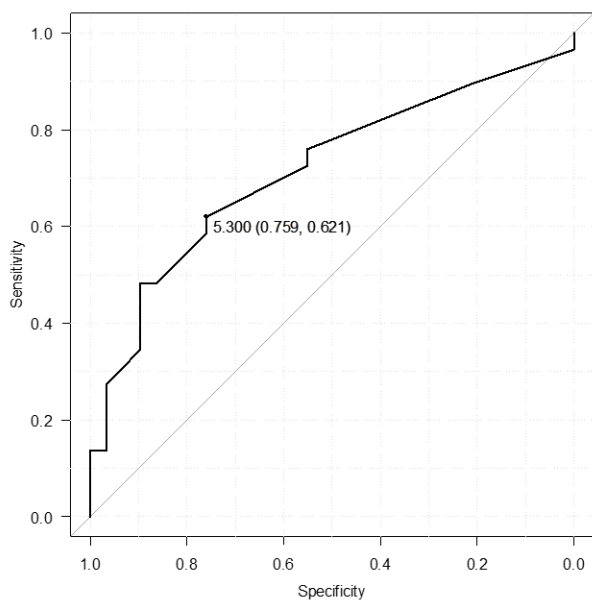
Слика 78. ROC OTC и хепатотоцелуларно оштећење



4.2.3.2. ROC укупне жучне киселине и холестатско/мешано оштећење

Оптимална вредност прага укупних жучних киселина код испитаника који пију амјодарон за детекцију холестатског/мешаног оштећења износи 5,3. Површина испод криве укупних жучних киселина износи 0,72 (95% ЦИ 0,58 – 0,85). За задату вредност прага од 5,3 оцене тачности укупних жучних киселина у детекцији хепатотоцелуларног оштећења износе: $S_n = 62\%$ и $S_p = 76\%$, Оптимална cut off вредност износи 5,3, и израчуната је на основу критеријума да је збир сензитивности и специфичности максималан (Слика 79).

Слика 79. ROC укупне жучне киселине і холестатско/мешано оштећење



5.0. ДИСКУСИЈА

5.1. РЕТРОСПЕКТИВНА СТУДИЈА

Кардиолошки пацијенти представљају популацију која је врло склона развоју оштећења јетре, јер они имају бројне карактеристике које су, у основи, фактори ризика за лезију јетре. Јетра добија око 25% минутног волумена срца тако да било која кардиоваскуларна болест која значајно смањује артеријску перфузију и срчано преоптерећење може да узрокује пратећу хипоксију ткива јетре и знаке конгестивне хепатопатије. Ови фактори ризика могу да буду, на пример, било који узрок попуштања десног срца, укључујући констриктивни перикардитис, трикуспидну регургитацију, митралну стенозу, кардиомиопатију и *cor pulmonale*¹⁴⁵. Додатно, лекари често прописују бројне лекове пацијентима који пате од кардиоваскуларних болести, посебно у хоспиталним условима, а неки од тих лекова имају мању или већу способност да доведу до оштећења јетре. Исто тако, честа примена дијагностичких и терапијских васкуларних процедура (кардиохирургија, перкутана коронарна интервенција) и медицинских уређаја (интра-аортна балон пумпа, пејсмејкери, радиофреквентна аблација) које прати често прописивање лекова за које се зна да могу да имају нежељене ефекте на јетру (антилипимици, антикоагуланси, аналгетици) повећава ризик за клинички значајно оштећење јетре. Препознавање специфичних фактора ризика за DILI код кардиолошких болесника је важан клинички задатак. Тако да фактори везани за пацијента могу бити подељени на две групе: генетске (полиморфизам или мутације гена који кодирају ензиме преко којих се лек метаболише или транспортне протеине) и не-генетске (старост, пол, придружене соматске болести, трудноћа, алкохол, пушење, гојазност)¹⁴⁶. Уопштено, DILI је у новије време препознат као један од главних проблема фармаковигиланце. Његова инциденца у развијеним земљама на годишњем нивоу је значајна и представља главни разлог за повлачење лека са тржишта, као и престанка терапије из безбедоносних разлога, што за последицу има значајне економске губитке¹⁴⁷. Кардиолошки лекови као што су амјодарон, хидралазин, метилдопа, статини (аторвастатин, симвастатин), кинидин, тиклопидин, као и неки лекови који се често примењују код хоспитализованих кардиолошких пацијената са придруженим коморбидитетима као што су антибиотици (амоксицилин са клавуланском киселином, нитрофурантоин, сулфаметоксазол и триметоприм, сулфонамиди), лекови против гихта (алопуринол) и нестероидни антиинфламаторни лекови (диклофен, ибупрофен, нимесулид) су сврстани у групу лекова који најчешће

доведе до оштећења јетре¹⁴⁸. Други лекови који се често прописују овим пацијентима су понекад повезани са оштећењем јетре. На пример, од свих нежељених дејстава која се јављају услед примене еноксапарина, на оштећење јетре отпада око 4%¹⁴⁹. Резултати нашег истраживања показали су да су повремени унос алкохола, гојазност, придружени значајни коморбидитети и прописивање амјодарона, еноксапарина и аторвастатина независни предиктори оштећења јетре код хоспитализованих кардиолошких пацијената. Поред тога, утврдили смо у којој мери најчешће прописивани лекови утичу на развој хепатотоксичности код пацијената на кардиолошком одељењу, међу којима највећи ризик има амјодарон. Такође смо утврдили значајну повезаност употребе лекова и оштећења јетре, што је на оваквој студијској популацији до сада мало проучавано у релевантним студијама.

Конзумирање алкохола пре хоспитализације представљало је најзначајнији независни фактор ризика за хепатотоксичност код испитаника, упркос чињеници да је клинички манифестна алкохолна болест била елиминишући критеријум. Значи, испитани пацијенти били су особе које су конзумирале алкохол врло ретко, нередовно или у малим количинама, али који, у тренутку када су укључени у ово истраживање, нису имали ни симптоматско ни асимптоматско оштећење јетре. Јединствене карактеристике хоспитализованих кардиолошких пацијената (нпр. хипотензија, хепатична исхемија, конгестија јетре, хепатоксични кардиоваскуларни лекови) највероватније додатно потенцирају добро познате механизме оштећења јетре алкохолом, чак иако је конзумиран у занемарљиво малим количинама пре хоспитализације¹⁵⁰⁻¹⁵².

Велики број пацијената који су учествовали у нашем истраживању имали су и гојазност и ултразвучно верификовану масну јетру, што је указивало на постојање неалкохолне масне болести јетре, која није проузрокована конзумирањем алкохола. На располагању нисмо имали податке о патохистолошком налазу ткива јетре наше студијске популације, а документација у историји болести најчешће не садржи податке неопходне за процену висцерлног (централног) типа гојазности (нпр. обим струка) који је најчешће удружен са оштећењем јетре¹⁵³. Међутим, бројне претходно објављене студије су показале јаку повезаност неалкохолне масне јетре узроковане гојазношћу и коронарне болести срца, касније се испоставило, честог обољења наше испитиване популације¹⁵⁴⁻¹⁵⁷.

Пацијенти са великим бројем коморбидитета, што је процењено ССИ скором, су имали значајно већи ризик за оштећење јетре, независно од других фактора. Неколико кардиоваскуларних болести било је повезано са пацијентима из групе случај у

универзитетној логистичкој регресији; међутим, одлучили смо да укључимо варијабле два главна кардиолошка обољења (коронарна болест, срчано попуштање) као и друга стања која су повезана са атеросклерозом и метаболичким дисбалансом (периферна васкуларна болест, кардиоваскуларни акцидент, транзиторни исхемијски атак, хемиплегија, дијабетес) у сложен систем процене како бисмо елиминисали збуњујуће факторе (индикацијска пристрасност) и повећали перформансе модела за детекцију DILI-ја (Табела 76).

Табела 76. Модел мултиваријантне логистичке регресија са хепатотоксичношћу као зависном варијаблом

Независна варијабла	В	р	OR	95% интервал поверења	
				Доња граница	Горња граница
Алкохол	4,569	<0,001	96,47	28,95	321,43
Пушење	0,653	0,121	1,92	0,84	4,38
Нутритивни статус	1,024	0,023	2,78	1,15	6,71
CCI	0,639	<0,001	1,89	1,53	2,34
Амјодарон	1,309	<0,001	3,70	1,82	7,53
Метформин	-2,000	0,003	0,14	0,04	0,51
Еноксапарин.На	1,192	<0,001	3,29	1,79	6,05
Диуретици Хенлеове петље	0,036	0,916	1,04	0,53	2,03
Аторвастатин	0,982	0,006	2,67	1,33	5,38

На пример, конгестивна срчана инсуфицијанција је чест узрок акутног застоја јетре код хоспитализованих пацијентата¹⁵⁸. Претходне студије су потврдиле да већи CCI скор повећава ризик за смртни исход, али повезаност са акутним токсичним оштећењем јетре је мало испитивана, бар код пацијента на кардиолошком одељењу¹⁵⁹. Тако да наши резултати представљају новину у овој области, и треба спроводити даља истраживања у циљу њихове потврде и валидације.

Наше истраживање је показало да су три лека, амјодарон, еноксапарин и аторвастатин показали чврсту повезаност са новонасталим, акутним оштећењем јетре. Фармаколошки профили лекова као и прикупљено свеобухватно знање о улози лекова уопште, потврђују ове резултате за различите типове оштећења јетре¹⁶⁰. Велики број фактора, евидентних код хоспитализованих испитаника са унапредовалим кардиоваскуларним обољењем и/или оних са ургентним кардиолошким стањем, међусобно се преплићу, што прејудицира хепатотоксичност узроковану лековима. На

пример, нестабилна ангина пекторис доводи до погоршања већ постојеће аритмије или до настанка нових поремећаја у раду срца, што захтева интензивирање медикаментозне терапије тј. повећано дозирање лекова. Заиста, прописивање амјодарона је узроковало прописивање других бројних лекова са хепатотосичним дејством.

Наше истраживање ни на који начин не настоји да дискриминише дејство две формулације амјодарона, али неки резултати до којих смо дошли као и подаци из референтне литературе (нпр. кратак период хоспитализације пре појаве оштећења јетре, веће дневне дозе лека, значајне разлике у начину примене лека између две групе испитаника, познате чињенице везане за могућу хепатотоксичност медикамента при парентералној примени (нпр. полисорбат 80), чешћи хепатоцелуларни тип оштећења) индиректно указују на то да је парентерално дозирање представљало примарни фактор ризика^{10,161}.

Наше истраживање је показало да су еноксапарин и аторвастатин такође имали позитивну и значајну повезаност са хепатотоксичношћу у нашој студији, до чега смо дошли поређењем са применом ових лекова у контролног групи. Еноксапарин може довести до повећања нивоа трансаминаза јетре и, у неким случајевима, може довести до токсичног хепатитиса због привремене некрозе хепатоцита, што се дешава обично једну недељу након почетка третмана по дозно-зависном режиму^{149,162-164}. Аторвастатин је имао добро познат хепатотоксични потенцијал, који се испољавао различитим спектром клиничких манифестација, од асимптоматског повећања ензима јетре до леком узрокованог хепатитиса који се јављао у различитим периодима од почетка примене лека¹⁴⁸. Прописивање нижих доза (мањих од 40 mg дневно), одложено деловање и редукција бројних других ризични фактора могу да смање магнитуду повезаности употребе аторвастатина и лезије јетре у поређењу са друга два лека.

Основна ограничења наше студије највећим делом проистичу из опсервационог дизајна, студије типа случај-контрола. Осим тога, многи важни подаци, неопходни за прецизније одређивање типа и временског опсега лезије јетре недостају у медицинској документацији (нпр. патолошка анализа ткива јетре, високо-специфични биомаркери). Без обзира на чињеницу што наша студија обухвата податке везане за стотине пацијената, изгледа да је тај узорак био довољан за откривање само главних детерминанти акутног хепатичког оштећења. У оквиру анализе, уочили смо велики број повезаности између потенцијалних фактора ризика, али највећи број њих није био укључен у крајњи модел логистичке регресије због претпостављених статистичких ограничења и/или клиничких разлога (нпр. збуњивање, колинаерност). На пример, чини се да су гојазност и срчана декомпензација, који захтевају интензивирање

медикаментозне терапије, пре прикривали повезаност фактора као што су пушење и употреба диуретика (готово искључиво фуросемида) него што су били изазвани њиховим директним хепатотоксичним дејством¹⁶⁵.

Резултат до кога смо дошли, да метформин има независно и протективно дејство, указује на то да је било оправдано искључити из коначне верзије модела логистичке регресије већину фактора чије је директно дејство на ткиво јетре нејасно. Постоје и ректи прикази случајева хепатотоксичности узроковане метформином код људи, али је инциденца оваквих случајева врло ниска, посебно ако се узме у обзир широка примена овог лека^{166,167}. У ствари, може се рећи да прави утицај метформина на оштећења јетре није познат а сва досадашња испитивања, како на анималним моделима тако и на људима у клиничком условима, показала су да он има хепатопротективно дејство¹⁶⁸⁻¹⁷¹. Изгледа да је укључивање лека који има директно супротно дејство у односу на остале факторе ризика нешто што би у клиничкој пракси имало реалистичан приступ. Узимајући у обзир већ наведене чињенице, као и вредности параметара модела, сматрамо да су резултати до којих смо дошли прецизни и клинички значајни.

Главни фактори који су повезани са акутним оштећењем јетре код пацијената хоспитализованих на кардиолошком одељењу у институцијама терцијарне здравствене заштите су конституционалне карактеристике и навике пацијента (повремени унос алкохола, гојазност, СС1 скор) и лекови (амјодарон, еноксапарин, аторвастатин) за које се зна да имају хепатотоксични потенцијал. Врста и тежина примарног кардиоваскуларног обољења или постојање коморбидитета повећава ризик за оштећење јетре, углавном удружено са осталим факторима ризика са којима су заједнички деловали. Даља истарживања која се фокусирају на индивидуалне факторе су оправдана како би се што боље дефинисао њихов утицај на различите субпопулације кардиолошких пацијената.

5.2. ПРОСПЕКТИВНА СТУДИЈА

5.2.1. Генотип SOD2

Ова студија је показала значајну повезаност између SOD2 Val16Ala генотипа и амјодароном индуковане хепатотоксичности у поулацији српских пацијената. Генотип који је добијен као предиспонирајући за хепатотоксичност био је ТТ (Val/Val).

У овој студији смо истраживали функционални полиморфизам SOD2 гена који доводи до повећаног стварања H_2O_2 , да бисмо утврдили потенцијалну повезаност између повећаног стварања ROS и настанка DILI-ја узрокованог амјодароном. Продукција слободних кисеоничних радикала у повећаним количинама би могла да буде главни разлог за лезију јетре узроковану леком. SOD2 представља главни стуб антиоксидативне одбране у митохондријама јетре. Ово је потврђено и чињеницом да SOD2 knockout мишеви нису могли да преживе дуго након рођења¹⁷². С друге стране, хетерозиготни SOD2 дефицијентни мишеви су били способни да преживе, али су били знатно склонији оштећењу јетре ксенобиотицима због повећаног оксидативног стреса у митохондријама¹⁷³. Показано је да SOD2 има најзначајнију улогу у одржавању мембранског потенцијала митохондрија јетре¹⁷⁴. Дефицит SOD2 ће довести до накупљања слободних радикала са последичним оштећењем мембране митохондрија и сукцесивном апоптозом ћелије¹⁷⁵.

Функционални полиморфизам rs4880 у SOD2 гену је одређен инкорпорацијом аминокиселине валин у кодон 16 за Т алел, односно инкорпорацијом аланина за С алел. SOD2 протеин који садржи аланин се слободно транспортује у митохондријални матрикс, док се форма која садржи валин налази у унутрашњем слоју митохондријалне мембране. Експериментална истраживања Suttona и сарадника су показала да носиоци Т алела производе ниже концентрације SOD2 протеина у митохондријама¹⁷⁶. Многе студије указују на улогу Т алела у целуларном оштећењу у условима повећаног оксидативног стреса¹⁷⁷. С друге стране, Sutton и сарадници су спровели студију у којој су мерили нивое овог ензима у хуманој популацији и пронашли су да носиоци СТ или ТТ генотипа имају 33% већу ензимску активност у поређењу са индивидуалцима са СС генотипом¹⁷⁸. Ова контроверза у наведеној литератури би могла бити објашњена етничким и алиментарним разликама, пошто се зна да храна богата антиоксидансима може да анулира штетне ефекте слободних радикала¹⁷⁹.

По нашем сазнању, ово је прва студија која има за циљ да истражи повезаност генетског полиморфизма SOD2 и DILI код српских пацијената лечених амјодароном.

Наше истраживање је показало да је оштећење јетре узроковано леком статистички значајно веће код особа које су носиоци TT алела. Пронашли смо да носиоци SOD2 Val/Val (T/T) генотипа имају повећан ризик за развој хепатотоксичности узорковане амјодароном, тј. за развој сва три подтипа: како за развој хепатоцелуларног тако и за развој холестатског и/или мешаног DILI-ја узрокованог амјодароном. Ово може бити случај због смањеног нивоа функционалног SOD2 ензима, услед његовог заробљавања у унутрашњи слој митохондријалне мембране. Такође смо утврдили да ли постоји и каква је веза између вредности укупног билирубина, AST, ALT и ОТС-а у различитим групама генотипа. Пошто постоји статистички значајна разлика у медијанама укупног билирубина испитиваних група (класичан маркер холестатског оштећења јетре (hi -квadrat=10,635; $p=0,005$)) и у медијанама ALT-а (класичан маркер хепатоцелуларног оштећења (hi -квadrat=6,698; $p=0,035$)) а највеће средње вредности поменутих маркера и медијана су забележене код испитаника са Wild type Val/Val(T/T) генотипом за SOD2, из чега проистиче још једна потврда да је Wild type Val/Val(T/T) генотипом за SOD2 фактор ризика а да су варијантни алели протективни фактор за нашу испитивану популацију.

Овај резултат није у сагласности са претходном студијом Huanga и сарадника, који су пронашли да су генотипови SOD2 Ala/Ala и Ala/Val повећали ризик за развој DILI-а у тајванској популацији⁶⁵.

У приказу Lucene и сарадника⁶⁸ показано је да је хепатотоксичност већа код носилаца С алела међу пацијентима леченим кардиоваскуларним агенсима, али то истраживање није укључило амјодарон као инкриминишући лек, тако да се наши резултати могу повезати са применом лека. Један од разлога за добијање другачијег резултата лежи у чињеници да су наши пацијенти били искључиво кардиолошки, са свим својим карактеристикама које прате ову популацију пацијената, лечени на Клиници за кардиологију и да су примали палету лекова у којој доминирају специфични кардиолошки лекови, међу којима водећу улогу има амјодарон и то пре свега парентерална формулација овог лека. Сви DILI случајеви у нашој кохорти били су амјодаром–индуковани, док у претходним истраживањима таквих пацијената готово и да није било. Те из наведеног проистиче да генетска подложност за развој DILI-ја може бити повезана са групом лекова која се примењује и са њиховим карактеристикама које су укључене у развој повреде јетре, тј. са амјодароном који доминира у овој популацији пацијената. Познато је да се амјодарон накупља у ћелијама и да се његова токсичност повећава са продуженом употребом¹⁸⁰. Могуће је да неки од његових метаболита оштећују митохондрије, чинећи их тако подложнијим за

оштећење. Још једно могуће објашњење за већу инциденцу DILI-ја је повећана продукција проинфламаторних цитокина код носилаца TT алела¹⁸¹. Проинфламаторни медијатори могу да доведу до оштећења јетре услед апаптозе.

Разлог за добијање оваквог резултата може да буде и величина нашег узорка која је прорачуната на основу пилот студије пресека спроведене на Клиници за кардиологију и на основу података о учесталости нормалног алела SOD2 и његове варијанте (rs4880) у 11 досадашњих студија (www.pharmgkb.org). Могући узрок може да буде и генотип за SOD2 наше студијске популације, популације пацијената која се лечи и гравитира ка референтној терцијарној здравственој установи централне и западне Србије.

У закључку, пацијенти који су развили оштећење јетре узроковано амјодароном су имали већу учесталост T алела SOD2 полиморфизма. Требало би спроводити додатне студије на великом броју пацијената како би се показало да ли полиморфизам SOD2 може да буде предиктивни фактор за DILI узрокован амјодароном код Срба.

5.2.2. ОТС и жучне киселине

До сада ни у једном раду се није испитивао DILI узрокован амјодароном који је верификован ОТС-ом и укупним жучним киселинама. Упоредили смо групу случај A^+X^+ и њој мечовану контролу A^+X^- . Такође смо упоредили однос између ОТС-а и ALT-а (као раног и најсензитивнијег класичног лабораторијског маркера лезије јетре) са резултатима претходних студија. Истовремено смо испитивали ОТС и укупне жучне киселине и на основу њихових вредности диференцирали смо тип оштећења у групи случај уз помоћ ROC криве сензитивности и специфичности. У нашем истраживању је добијена оптимална cut off вредност за ОТС (маркер хепатоцелуларног оштећења) 259,1 и израчуната је на основу критеријума да је збир сензитивности и специфичности максималан, а оптимална cut off вредност за жучне киселине (маркер холестатског оштећења) 5,3, израчуната по истом принципу. Сви случајеви који су имали вредност ОТС-а 259,1 или већу имали су хепатоцелуларну компоненту оштећења јетре, док су они који су имали вредност за укупне жучне киселине 5,3 и више имали су холестатски и/или мешани тип оштећења (ако је та вредност била удружена са вредношћу оптималне cut off вредности ОТС (259,1) и више). У нашем истраживању у групи случај било је 9 случајева са хепатоцелуларним оштећењем, 7 са холестатским и 13 са мешовитим.

Из резултата проистиче да постоји статистички значајна разлика у просечним вредностима OTC ($t=3,800$; $p<0,001$) и медијанама укупних жучних киселина ($p=0,004$) између A^+X^+ и A^+X^- . У нашем истраживању је снижен однос OTC/ALT у односу на претходна истраживања где се одржава висок однос између поменутих маркера. Разлог за то је тај што је у нашој студији испитивана акутна лезија јетре, код које је вредност OTC -а висока само у тренутку оштећења и убрзо затим пада тј. приближава се референтној вредности због кратког полуживота OTC -а, док се скок ALT касније бележи али се повећане вредности знатно дуже одржавају од OTC -а. Претходни аутори су забележили висок однос између OTC -а и ALT -а јер су испитивали однос у хроничним болестима јетре, где постоји дуготрајно, континуирано оштећење хепатоцита, па је OTC хронично повишен а самим тим и поменути однос. У нашој студији пацијентима је узоркована крв не кад се оштећење десило већ када је лабораторијски верификовано троструким порастом ALT -а у односу на његову референтну вредност. Мањи скок OTC -а у нашем истраживању у односу на друге студије у које су укључивани пацијенти са хроничним болестима јетре може да нам укаже на диференцијално-дијагностичко разликовање акутних од хроничних болести јетре при верификованом скоку ALT -а^{140,182}.

OTC је маркер који је осетљивији за рано препознавање оштећења јетре од трансминаза, јер брзина појаве у циркулацији не зависи само од отпуштања маркера из хепатоцита већ зависи од клиренса тј. самих карактеристика маркера који условљавају клиренс пре него од његове локализације (раније се сматрало да су трансминазе осетљивије јер се налазе у цитосолу па се пре ослобађају из ћелија). Такође, OTC је маркер који је специфичнији за оштећење јетре него серумске трансминазе јер њихове вредности могу да буду повећане и код болести срца и код болести мишића, док ексклузивна локализација OTC -а у јетри чини овај ензим јединственим маркером за оштећење јетре.

6.0. ЗАКЉУЧАК:

Сходно постављеним циљевима студије, а на основу добијених резултата истраживања, изведени су следећи закључци:

1. Кардиолошки пацијенти хоспитализовани на Клиници за кардиологију представљају популацију пацијената коју одликују многе карактеристике које су у суштини фактори ризика за лезију јетре, посебно лекови, поједине социо-демографске карактеристике и коморбидитети код лечених болесника, при чему је утицај амјодарона значајан, доминантан у односу на друге лекове и независан од других чинилаца.
2. Конзумирање алкохола нередовно или у малим количинама пре хоспитализације представљало је најзначајнији независни фактор ризика за хепатотоксичност код испитаника лечених на кардиолошком одељењу КЦ Крагујевац.
3. Статистички значајно већи број пацијената су били пушачи у групи случај у односу на њима мечоване контроле, што указује да је пушење препознато као статистички значајан фактори ризика за лезију јетре.
4. Велики број пацијената који су учествовали у нашем истраживању имали су и гојазност и ултразвучно верификовану масну јетру, што је указивало на постојање неалкохолне масне болести јетре, која није проузрокована конзумирањем алкохола већ је чврсто повезана са прекомерном телесном тежином.
5. Врста и тежина примарног кардиоваскуларног обољења као што је коронарна болест, аритмија апсолута или постојање коморбидитета, повећава ризик за оштећење јетре, углавном удружено са осталим присутним факторима ризика на Клиници за кардиологију.
6. Пацијенти са великим бројем коморбидитета, што је процењено ССИ скором, су имали значајно већи ризик за оштећење јетре, независно од других фактора ризика.
7. Наше истраживање је показало да су три лека, амјодарон, еноксапарин и аторвастатин показали чврсту повезаност са новонасталим, акутним оштећењем јетре.
- 8 Резултати нашег истраживања показују да је примена парентералне формулације амјодарона представљала примарни ризик за лезију јетре.
9. Метформин је у нашем истраживању показао независно и протективно дејство на јетру.
10. Процена узрочности лека за оштећење јетре у групи случај коришћењем CIOMS/RUCAM скоринг система је додатно потврдила налазе.

11. У популацији пацијената лечених на кардиолошком одељењу КЦ Крагујевац, Србија забележена хепатотоксичност удружена са употребом амјодарона много је чешће повезана са Wild type Val/Val (T/T) SOD2 немутираним генотипом, док је варијантни алел Ala/Ala (CC) и/или Ala/Val (TC) SOD2 препознат као протективни чинилац за DILI узрокован амјодароном

12. На основу ROC криве сензитивности и специфичности, конструисане на основу вредности ОТС-а и жучних киселина испитаника могуће је диференцирати тип оштећења јетре (хепатоцелуларно, холестатско, мешовито оштећење)

СКРАЋЕНИЦЕ

SOD2- superoxide dismutase 2	PT – prothrombin time
DEA- desethylamiodarone	INR – international normalized ratio
SA – sinoatrial	GGT – gamma-glutamyl transferase
AV – atrioventricular	OTC- ornithine carbamoyl transferase
VT- ventricular tachycardia	GIT – gastrointestinal tract
WPW-Wolff-Parkinson-White	NAD(P) – nicotinamide adenine dinucleotide (phosphate)
PSVT- paroxysmal supraventricular tachycardia	DDD - defined daily dose
ICD- implantable cardiac defibrillator	AST – aspartate aminotransferase
EF- ejection fraction	TBA- total bile acids
AF-atrial fibrillation	ELISA – enzyme-linked immunosorbent assay
DILI- drug -induced liver injury	ДНК – дезоксирибонуклеинска киселина
CABG- Coronary Artery Bypass Grafting	ATC – anatomical therapeutic chemical classification system
OAK-oral anticoagulants	ЕКГ – електрокардиографија
NSAIL-non steroidal anti inflammatory	proBNP – pro Brain natriuremic peptide
HIV – human imunodeficiency virus	CT – computerised tomography
САД – Сједињене америчке државе	MSCT – multi-slice computed tomography
CNS – Cental nervous system	MRI – magnetic resonance imaging
RUCAM - Roussel Uclaf Causality Assessment Method	ERCP – endoscopic retrograde cholangiopancreatography
CIOMS/RUCAM score- Council for International Organizations of Medical Scientists/ Roussel Uclaf Causality Assessment Method score	КЦ – клинички центар
GPX- glutathione peroxidase	ROC – Receiver operating chaacteristic
DRESS – drug reaction with eosinophilia and systemic symptoms	SD – standard deviation
EB – Epstein Barr	ОМГ – остеомускуларна грађа
ALT – alanine aminotransferase	STEMI- st elevation myocardial infarction
ALP – alkaline phosphatase	NSTEMI- non st elevation myocardial infarction
ULN – upper limit of normal	SI – срчана инсуфицијенција
M&V – Maria & Vitorino	DM – diabetes mellitus
CDS – clinical dignostic scale	CCI- charlson comorbidity index
DLST-dlst drug lymphocyte stimulation test	ACE – angiotensin convertng enzyme
DILIN – drug induced liver injury network	LDH – lactate dehydrogenase
LTT – lymphocyte transformation test	CPK – creatine phosphokinase
LMT - leukocyte migration test	CRP – C reactive prot
TNF – tumor necrosis factor	
FDA - food and drug association	

7.0. ЛИТЕРАТУРА:

1. Goldschlager N, Epstein AE, Naccarelli GV, Olshansky B, Singh B, Collard HR, et al. A practical guide for clinicians who treat patients with amiodarone. *Heart Rhythm* 2007; 4(9):1250–1259.
2. Nasser M, Larsen TR, Waanbah B, Sidiqi I, McCullough PA. Hyperacute drug-induced hepatitis with intravenous amiodarone: case report and review of the literature. *Drug Healthc Patient Saf* 2013; 5:191-98.
3. Unić-Stojanović D, Babić S, Jović M, Radak Đ. Terapija postoperativne atrijalne fibrilacije. *Medicinska istraživanja* 2012; 46(2):16–24.
4. Rhodes A, Eastwood JB, Smith SA. Early acute hepatitis with parenteral amiodarone: a toxic effect of the vehicle? *Gut* 1993; 34(4):565–566.
5. Kažić T, Ostojić M. *Klinička kardiovaskularna farmokologija*. 5 izdanje. Beograd: Integra; 2009.
6. American Heart Association. 2005 American Heart Association Guidelines for Cardiopulmonary Resuscitation and Emergency Cardiovascular Care Part 7.3: Management of Symptomatic Bradycardia and Tachycardia. *Circulation* 2005;112:IV-67–IV-77. DOI: 10.1161/CIRCULATIONAHA.105.166558
7. Roy D, Talajic M, Dorian P, Connolly S, Eisenberg MJ, Green M, et al. Amiodarone to prevent recurrence of atrial fibrillation. Canadian Trial of Atrial Fibrillation Investigators. *N Engl J Med* 2000; 342(13): 913-920.
8. Goldschlager N, Epstein AE, Naccarelli G, Olshansky B, Singh B. Practical guidelines for clinicians who treat patients with amiodarone. Practice Guidelines Subcommittee, North American Society of Pacing and Electrophysiology. *Arch Intern Med* 2000; 160(12):1741–1748.
9. Slavik RS. Intravenous amiodarone for acute pharmacological conversion of atrial fibrillation in the emergency department. *CJEM* 2002; 4(6):414-20.
10. Lahbabi M, Aqodad N, Ibrahim A, Lahlou M, Aqodad H. Acute hepatitis secondary to parenteral amiodarone does not preclude subsequent oral therapy. *World J Hepatol* 2012; 4(6):196-98.
11. Souney PF, Cooper WD, Cushing DJ. PM101: intravenous amiodarone formulation changes can improve medication safety. *Expert Opin Drug Saf* 2010; 9(2):319–333.
12. Guarnieri T, Nolan S, Gottlieb SO, Dudek A, Lowry DR. Intravenous amiodarone for the prevention of atrial fibrillation after open heart surgery: the Amiodarone Reduction in Coronary Heart (ARCH) trial. *J Am Coll Cardiol* 1999;34(2): 343-347.

13. Puli SR, Fraley MA, Puli V, Kuperman AB, Alpert MA. Hepatic cirrhosis caused by low-dose oral amiodarone therapy. *Am J Med Sci* 2005; 330(5):257-61.
14. Aravanis C. Acute thrombophlebitis due to IV use of amiodarone. *Chest* 1982; 82(4): 515–516.
15. Scheiman MM, Levine JH, Cannom DS, Friehling T, Kopelman HA, Chilson DA, et al. Dose-ranging study of intravenous amiodarone in patients with life-threatening ventricular tachyarrhythmias. The intravenous amiodarone multicenter investigators group. *Circulation* 1995; 92(11): 3264-72.
16. Levine JH, Massumi A, Scheinman MM, Winkle RA, Platia EV, Chilson DA, et al. Intravenous amiodarone for recurrent sustained hypotensive ventricular tachyarrhythmias. Intravenous Amiodarone Multicenter Trial Group. *J Am Coll Cardiol* 1996; 27(1): 67-75.
17. Chang CC, Petrelli M, Tomashefski Jr JF, McCullough AJ. Severe intrahepatic cholestasis caused by amiodarone toxicity after withdrawal of the drug: a case report and review of the literature. *Arch Pathol Lab Med* 1999; 123(3):251-56.
18. Gluck N, Fried M, Porat R. Acute amiodarone liver toxicity likely due to ischemic hepatitis. *Isr Med Assoc J* 2011; 13(12):748–752.
19. Van Herendael H, Dorian P. Amiodarone for the treatment and prevention of ventricular fibrillation and ventricular tachycardia. *Vasc Health Risk Manag* 2010; 6: 465-72.
20. Vorperian VR, Havighurst TC, Miller S, January CT. Adverse effects of low dose amiodarone: a meta-analysis. *Journal of the American College of Cardiology* 1997; 30(3): 791-798.
21. Hashmi A, Keswani NR, Kim S, Graham DY. Hepatic dysfunction in patients receiving intravenous amiodarone. *Southern medical journal* 2016; 109(2):83.
22. Santangeli P, Di Biase L, Burkhardt JD, Bai R, Mohanty P, Pump A, Natale A. Examining the safety of amiodarone. *Expert Opin Drug Saf* 2012; 11(2): 191-214.
23. Vučelić B. *Gastroenterologija i hepatologija*. Zagreb: Medicinska naklada; 2002.
24. Kukavica D. Antituberculous -induced liver dysfunction. *Pneumon* 2004; 41: 59-63.
25. González Galilea A, García Sánchez MV, la Mata García M, Miño Fugarolas G. Early-onset acute toxic hepatitis induced by intravenous amiodarone administration. *Gastroenterol Hepatol* 2002; 25(6): 392-4.
26. Andrade RJ, Lucena MI, Fernández MC, Vega JL, García-Cortés M, Casado M, et al. Cholestatic hepatitis related to use of irbesartan: a case report and a literature review of angi-

- otensin II antagonist- associated hepatotoxicity. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2002; 14(8): 887-90.
27. Braun JS, Geiger R, Wehner H, Schaffer S, Berger M. Hepatitis caused by antidepressive therapy with maprotiline and opipramol. *Pharmacopsychiatry* 1998; 31(4): 152-5.
28. Lucena MI, Carvajal A, Andrade RJ, Velasco A. Antidepressant-induced hepatotoxicity. *Expert Opin Drug Saf* 2003; 2(3): 249-62.
29. Chalasani N, Fontana RJ, Bonkovsky H L, Watkins PB, Davern T, Serrano J, et al. Causes, clinical features, and outcomes from a prospective study of drug-induced liver injury in the United States. *Gastroenterology* 2008 ; 135(6): 1924–34.
30. Pollmacher T, Haack M, Schuld A, Kraus T, Hinze-Selch D. Effects of antipsychotic drugs on cytokine networks. *J Psychiatr Res* 2000;34(6):369-82.
31. Hoek J, Pastorino J. Ethanol, oxidative stress and cytokine-induced liver cell injury. *Alcohol* 2002; 27(1): 63-8.
32. DeSanty KP, Amabile CM. Antidepressant-induced liver injury. *Ann Pharmacother* 2007; 41(7):1201-11.
33. Meier Y, Cavallaro M, Roos M, Pauli-Magnus C, Folkers G, Meier PJ, Fattinger K. Incidence of drug-induced liver injury in medical inpatients. *Eur J Clin Pharmacol* 2005; 61(2): 135-43.
34. Björnsson E, Olsson R. Suspected drug-induced liver fatalities reported to the WHO database. *Dig Liver Dis* 2006; 38(1): 33-8.
35. Andrade RJ, Lucena MI, Fernández MC, Pelaez G, Pachkoria K, García-Ruiz E, et al. Drug-induced liver injury: an analysis of 461 incidences submitted to the Spanish registry over a 10-year period. *Gastroenterology* 2005; 129(2): 512-521.
36. Motola D, Vargiu A, Leone R, Cocci A, Salvo F, Ros B, et al. Hepatic adverse drug reactions: a case/non-case study in Italy. *Eur J Clin Pharmacol* 2007; 63(1): 73-79.
37. Wai CT, Tan BH, Chan CL, Sutedja DS, Lee YM, Khor C, Lim SG. Drug-induced liver injury at an Asian center: a prospective study. *Liver Int* 2007; 27(4): 465-474
38. Vuppalanchi R, Liangpunsakul S, Chalasani N. Etiology of new-onset jaundice: how often is it caused by idiosyncratic drug-induced liver injury in the United States?. *Am J Gastroenterol* 2007; 102(3): 558-562.
39. Sgro C, Clinard F, Ouazir K, Chanay H, Allard C, Guilleminet C, et al. Incidence of drug-induced hepatic injuries: a French population-based study. *Hepatology* 2002; 36(2): 451–455.

40. De Valle MB, Av Klinteberg V, Alem N, Olsson R, Björnsson E. Drug-induced liver injury in a Swedish University hospital out-patient hepatology clinic. *Aliment Pharmacol Ther* 2006; 24(8): 1187-1195.
41. Regev A. Drug-induced liver injury and drug development: industry perspective. *Semin Liver Dis* 2014;34(2): 227-39.
42. Björnsson E. Review article: drug-induced liver injury in clinical practice. *Aliment Pharmacol Ther* 2010;32(1): 3-13.
43. Lee WM, Senior JR. Recognizing drug-induced liver injury: current problems, possible solutions. *Toxicol Pathol* 2005;33(1): 155-64.
44. Lee WM. Drug-induced hepatotoxicity. *N Engl J Med* 2003;349(5): 474-85.
45. Chang CY, Schiano TD. Review article: drug hepatotoxicity. *Aliment Pharmacol Ther* 2007; 25(10): 1135–1151.
46. Andrade RJ, Robles M, Fernández-Castañer A, López-Ortega S, López-Vega MC, Lucena MI. Assessment of drug-induced hepatotoxicity in clinical practice: a challenge for gastroenterologists. *World J Gastroenterol* 2007;13(3): 329-40.
47. Lucena MI, Garcia-Cortes M, Cueto R, Lopez-Duran J, Andrade RJ. Assessment of drug-induced liver injury in clinical practice. *Fundam Clin Pharmacol* 2008; 22(2):141-58.
48. Teschke R, Schwarzenboeck A, Hennermann KH. Causality assessment in hepatotoxicity by drugs and dietary supplements. *Br J Clin Pharmacol* 2008; 66 (6): 758–766.
49. Andrade RJ, Robles M, Ortiz N, Lucena MI. Rechallenge in hepatotoxicity: proof of concept or therapeutic accident?. *Rev Esp Enferm Dig* 2008;100(5): 255-8.
50. Hussaini SH, Farrington EA. Idiosyncratic drug-induced liver injury: an overview. *Expert Opin Drug Saf* 2007; 6(6): 673–84.
51. Teschke R, Wolff A, Frenzel C, Schwarzenboeck A, Schulze J, Eickhoff A. Drug and herb induced liver injury: Council for International Organizations of Medical Sciences scale for causality assessment. *World J Hepatol* 2014; 6(1): 17-32.
52. Ostapowicz G, Fontana RJ, Schiødt FV, Larson A, Davern TJ, Han SH, et al. Results of a prospective study of acute liver failure at 17 tertiary care centers in the United States. *Ann Intern Med* 2002; 137(12): 947–54.
53. Miljkovic MM, Dobric S, Dragojevic-Simic V. Consistency between causality assessments obtained with two scales and their agreement with clinical judgments in hepatotoxicity. *Pharmacoepidemiol Drug Saf* 2011; 20(3): 272-285.

54. Danan G. Causality assessment of drug-induced liver injury. Hepatology Working Group. *J Hepatol* 1988; 7(1): 132-136.
55. Tujios S, Fontana RJ. Mechanisms of drug-induced liver injury: from bedside to bench. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 2011;8(4):202-11.
56. Rivkees SA. 63 Years and 715 days to the “boxed warning”: unmasking of the propylthiouracil problem. *Int J Pediatr Endocrinol* 2010; 2010.pii: 658267
57. Koch L. Therapy: propylthiouracil use associated with severe hepatotoxicity in children. *Nat Rev Endocrinol* 2010; 6(8): 416.
58. Strader DB, Navarro VJ, Seeff LB. Hepatotoxicity of herbal preparation. In: Boyer TD, Mann M, Sanyal AJ (eds). *Zakim & Boyer's Hepatology*, 6th edn. Philadelphia, PA: W.B. Saunders; 2012. p. 462 – 75.
59. Lewis JH. Drug-induced liver injury throughout the drug development life cycle: where we have been, where are we now, and where we are headed. Perspectives of a clinical hepatologist. *Pharm Med* 2013; 27(3): 165 – 91.
60. Kaplowitz N, De Leve LD. *Drug-Induced Liver Disease*. 3rd edn. Waltham MA: Academic press; 2013.
61. Lucena MI, Andrade RJ, Fernández MC, Pachkoria K, Pelaez G, Durán JA, et al. Determinants of the clinical expression of amoxicillin-clavulanate hepatotoxicity: a prospective series from Spain. *Hepatology* 2006; 44(4): 850-856.
62. Maddrey WC. Drug-induced hepatotoxicity: 2005. *J Clin Gastroenterol* 2005; 39(4 Suppl 2): S83-S89.
63. Russo MW, Galanko JA, Shrestha R, Fried MW, Watkins P. Liver transplantation for acute liver failure from drug induced liver injury in the United States. *Liver Transpl* 2004; 10(8): 1018-1023.
64. Shapiro MA, Lewis JH. Causality assessment of drug-induced hepatotoxicity: promises and pitfalls. *Clin Liver Dis* 2007; 11(3): 477-505.
65. Huang YS, Su WJ, Huang YH, Chen CY, Chang FY, Lin HC, Lee SD. Genetic polymorphisms of manganese superoxide dismutase, NAD(P)H:quinone oxidoreductase, glutathione S-transferase M1 and T1, and the susceptibility to drug-induced liver injury. *J Hepatol* 2007; 47(1): 128-134.
66. Huang YS, Chern HD, Su WJ, Wu JC, Chang SC, Chiang CH, Chang FY, Lee SD. Cytochrome P450 2E1 genotype and the susceptibility to antituberculosis drug-induced hepatitis. *Hepatology* 2003; 37(4): 924-930.

67. Stewart JD, Horvath R, Baruffini E, Ferrero I, Bulst S, Watkins PB, et al. Polymerase γ gene POLG determines the risk of sodium valproate-induced liver toxicity. *Hepatology* 2010; 52(5): 1791–1796.
68. Lucena MI, García-Martín E, Andrade RJ, Martínez C, Stephens C, Ruiz JD, et al. Mitochondrial superoxide dismutase and glutathione peroxidase in idiosyncratic drug-induced liver injury. *Hepatology* 2010; 52(1): 303–312.
69. Lammert C, Einarsson S, Saha C, Niklasson A, Bjornsson E, Chalasani N. Relationship between daily dose of oral medications and idiosyncratic drug-induced liver injury: search for signals. *Hepatology* 2008; 47(6): 2003-2009.
70. Lee BH, Koh WJ, Choi MS, Suh GY, Chung MP, Kim H, Kwon OJ. Inactive hepatitis B surface antigen carrier state and hepatotoxicity during antituberculosis chemotherapy. *Chest* 2005; 127(4): 1304-1311.
71. Núñez M. Hepatotoxicity of antiretrovirals: incidence, mechanisms and management. *J Hepatol* 2006; 44(1 Suppl): S132-S139.
72. Tarantino G, Conca P, Basile V, Gentile A, Capone D, Polichetti G, Leo E. A prospective study of acute drug-induced liver injury in patients suffering from non-alcoholic fatty liver disease. *Hepatol Res* 2007; 37(6): 410-415.
73. Larson AM, Polson J, Fontana RJ, Davern TJ, Lalani E, Hynan LS, et al. Acetaminophen - induced acute liver failure: results of a United States multicenter, prospective study. *Hepatology* 2005; 42(6): 1364–1372.
74. Giannini EG, Testa R, Savarino V. Liver enzyme alteration: a guide for clinicians. *CMAJ* 2005; 172 (3): 367–379.
75. Navarro VJ, Senior JR. Drug-related hepatotoxicity. *N Engl J Med* 2006; 354 (7): 731–739.
76. Holt MP, Ju C. Mechanisms of drug-induced liver injury. *AAPS J* 2006; 8(1): E48–E54.
77. Chalasani NP, Hayashi PH, Bonkovsky HL, Navarro VJ, Lee WM, Fontana RJ, et al. ACG Clinical Guideline: the diagnosis and management of idiosyncratic drug-induced liver injury. *Am J Gastroenterol* 2014;109(7):950-66.
78. Norris W, Paredes AH, Lewis JH. Drug-induced liver injury in 2007. *Curr Opin Gastroenterol* 2008; 24(3): 287-297.
79. Carey EJ, Vargas HE, Douglas DD, Balan V, Byrne TJ, Harrison ME, Rakela J. Inpatient admissions for drug-induced liver injury: results from a single center. *Dig Dis Sci* 2008; 53(7): 1977-1982.

80. Norris S. Drug- and toxin-induced liver disease. In: Bacon BR, O'Grady JG, Kinkhabwala M, Schilsky ML. *Comprehensive clinical hepatology*. 2nd ed. St. Louis: Mosby, 2006: 497–516.
81. Danan G, Benichou C. Causality assessment of adverse reactions to drugs: I. A novel method based on the conclusions of international consensus meetings: application to drug-induced liver injuries. *J Clin Epidemiol* 1993;46(11): 1323-30.
82. Bénichou C. Criteria of drug-induced liver disorders. Report of an international consensus meeting. *J Hepatol* 1990; 11(2): 272-276.
83. Aithal GP, Watkins PB, Andrade RJ, Larrey D, Molokhia M, Takikawa H, et al. Case definition and phenotype standardization in drug-induced liver injury. *Clin Pharmacol Ther* 2011; 89(6): 806-815.
84. Benichou C, Danan G. A new method for drug causality assessment: RUCAM. In: Benichou C, ed. *Adverse drug reactions. A practical guide to diagnosis and management*. Chichester: John Wiley & Sons Ltd 1994; 277–287.
85. Andrade RJ, Lucena MI, Kaplowitz N, García-Muñoz B, Borraz Y, Pachkoria K, et al. Outcome of acute idiosyncratic drug-induced liver injury: Long-term follow-up in a hepatotoxicity registry. *Hepatology* 2006; 44(6): 1581-1588.
86. Chitturi S, Farrell GC. Drug-induced liver disease. In: Schiff ER, Sorrell MF, Maddrey WC. *Schiff's diseases of the liver*. 9th ed. Tokyo: Lippincott Williams & Wilkins, 2003: 1059–1127.
87. Naranjo CA, Busto U, Sellers EM, Sandor P, Ruiz I, Roberts EA, et al. A method for estimating the probability of adverse drug reactions. *Clin Pharmacol Ther* 1981;30(2): 239-45.
88. García-Cortés M, Lucena MI, Pachkoria K, Borraz Y, Hidalgo R, Andrade RJ, et al. Evaluation of Naranjo adverse drug reactions probability scale in causality assessment of drug-induced liver injury. *Aliment Pharmacol Ther* 2008;27(9): 780-9.
89. Maria VA , Victorino RM . Development and validation of a clinical scale for the diagnosis of drug-induced hepatitis. *Hepatology* 1997; 26(3): 664 – 9 .
90. Aithal GP, Rawlins MD, Day CP. Clinical diagnostic scale: a useful tool in the evaluation of suspected hepatotoxic adverse drug reactions. *J Hepatol* 2000; 33(6): 949-952.
91. Lucena MI, Camargo R, Andrade RJ, Perez-Sanchez CJ, Sanchez de la Cuesta F. Comparison of two clinical scales for causality assessment in hepatotoxicity. *Hepatology* 2001; 33(1):123–130.

92. Kaplowitz N. Causality assessment versus guilt-by association in drug hepatotoxicity. *Hepatology* 2001; 33(1): 308-310.
93. Watanabe M, Shibuya A. Validity study of a new diagnostic scale for drug-induced liver injury in Japan – comparison with two previous scales. *Hepatol Res* 2004;30(3):148-154.
94. Arimone Y, Miremont-Salamé G, Haramburu F, Molimard M, Moore N, Fourrier-Réglat A, Bégaud B. Inter-expert agreement of seven criteria in causality assessment of adverse drug reactions. *Br J Clin Pharmacol* 2007; 64(4): 482-288.
95. Miljkovic MM, Dobric S, Dragojevic-Simic V. Accuracy and reproducibility of two scales in causality assessment of unexpected hepatotoxicity. *J Clin Pharm Ther* 2012; 37(2): 196-203.
96. Galan MV, Potts JA, Silverman AL, Gordon SC. The burden of acute nonfulminant drug-induced hepatitis in a United States tertiary referral center. *J Clin Gastroenterol* 2005;39(1): 64–67.
97. Fontana RJ, Seeff LB, Andrade RJ, Björnsson E, Day CP, Serrano J, Hoofnagle JH. Standardization of nomenclature and causality assessment in drug - induced liver injury: summary of a clinical research workshop. *Hepatology* 2010; 52(2): 730–742.
98. Agarwal VK, McHutchison JG, Hoofnagle JH; Drug-Induced Liver Injury Network. Important elements for the diagnosis of drug-induced liver injury. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2010; 8(5): 463–470.
99. Lewis JH, Larrey D, Olsson R, Lee WM, Frison L, Keisu M. Utility of the Roussel Uclaf Causality Assessment Method (RUCAM) to analyze the hepatic findings in a clinical trial program: evaluation of the direct thrombin inhibitor ximelagatran. *Int J Clin Pharmacol Ther* 2008; 46(7): 327-39.
100. Rockey DC, Seeff LB, Rochon J, Freston J, Chalasani N, Bonacini M, et al. Causality assessment in drug-induced liver injury using a structured expert opinion process: comparison to the Roussel-Uclaf causality assessment method. *Hepatology* 2010; 5(6): 2117–2126.
101. Rochon J, Protiva P, Seeff L, Fontana RJ, Liangpunsakul S, Watkins PB, et al. Reliability of the Roussel Uclaf Causality Assessment Method for assessing causality in drug-induced liver injury. *Hepatology* 2008; 48(4): 1175–1183.
102. Papay JI, Clines D, Rafi R, Yuen N, Britt SD, Walsh JS, Hunt CM. Drug-induced liver injury following positive drug rechallenge. *Regul Toxicol Pharmacol* 2009; 54(1): 84–90.
103. Pichler WJ, Tilch J. The lymphocyte transformation test in the diagnosis of drug hypersensitivity. *Allergy* 2004; 59(8): 809–820.

104. Takikawa H, Takamori Y, Kumagi T, Onji M, Watanabe M, Shibuya A, et al. Assessment of 287 Japanese cases of drug induced liver injury by the diagnostic scale of the International Consensus Meeting. *Hepatol Res* 2003; 27(3): 192-195.
105. Merk HF. Diagnosis of drug hypersensitivity: lymphocyte transformation test and cytokines. *Toxicology* 2005; 209(2): 217–220.
106. Usui K, Oda Y, Kubota R, Negishi K, Uno K, Tsunematsu S, et al. Clinical application of the leukocyte migration test and new diagnostic criteria for identifying causative agents in patients with drug-induced liver injury. *Hepatogastroenterology* 2007; 54(78): 1752-1757.
107. Murata H, Shimizu Y, Okada K, Higuchi K, Watanabe A. Detection and analysis of intracytoplasmic cytokines in peripheral blood mononuclear cells in patients with drug-induced liver injury. *J Hepatol* 2003; 38(5): 573-582.
108. Lee WM. Drug-induced hepatotoxicity. *N Engl J Med* 1995; 333(17): 1118-1127.
109. Kaplowitz N, De Leve LD. *Drug-induced liver disease*, 1sted. New York: Informa Healthcare, 2003: 227-242 109.
110. Zimmerman HJ. *Hepatotoxicity: The adverse effects of drugs and other chemicals on the liver*. 2nd ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 1999: 428-433
111. Vuppalanchi R, Teal E, Chalasani N. Patients with elevated baseline liver enzymes do not have higher frequency of hepatotoxicity from lovastatin than those with normal baseline liver enzymes. *Am J Med Sci* 2005; 329(2): 62-65
112. Babatin M, Lee SS, Pollak PT. Amiodarone hepatotoxicity. *Curr Vasc Pharmacol* 2008; 6(3): 228-236.
113. Rao U, Agarwal A. Amiodarone-induced acute hepatotoxicity. *Eur J Clin Pharmacol* 2012; 68: 449-50.
114. Ben Chaabane N, Hellara O, Safer L, Melki W, Bdioui F, Zakhama A, Saffar H. Cirrhosis with increased density of the liver: amiodarone-induced hepatotoxicity. *Tunis Med* 2012; 90: 487-8.
115. Chan AL, Hsieh HJ, Hsieh YA, Lin SJ. Fatal amiodarone-induced hepatotoxicity: a case report and literature review. *Int J Clin Pharmacol Ther* 2008; 46: 96-101.
116. Krijt J, Sokolová J, Ješina P, Dvořáková L, Řeboun M, Brennerová K, et al. Activity of the liver enzyme ornithine carbamoyltransferase (OTC) in blood: LC-MS/MS assay for non-invasive diagnosis of ornithine carbamoyltransferase deficiency. *Clin Chem Lab Med* 2017; 55(8): 1168-1177.

117. Pellicoro A, Faber KN. Review article: The function and regulation of proteins involved in bile salt biosynthesis and transport. *Aliment Pharmacol Ther* 2007;26 Suppl 2:149-60.
118. Hylemon PB, Zhou H, Pandak WM, Ren S, Gil G, Dent P. Bile acids as regulatory molecules. *J Lipid Res* 2009;50(8):1509-20.
119. Trauner M, Claudel T, Fickert P, Moustafa T, Wagner M. Bile acids as regulators of hepatic lipid and glucose metabolism. *Dig Dis* 2010;28(1):220-4.
120. Cataldi A, Gonella D, Robutti N, Siri M, Buonocore S, Odetti P. Hepatotoxicity after intravenous amiodarone. *Aging Clin Exp Res* 2008; 20(6): 593-6.
121. Serviddio G, Bellanti F, Giudetti AM, Gnoni GV, Capitanio N, Tamborra R, et al. Mitochondrial oxidativestress and respiratory chain dysfunction account for liver toxicity during amiodarone but not dronedarone administration. *Free Radic Biol Med* 2011;51(12): 2234-42.
122. Zaeemzadeh N, Hemmati A, Arzi A, Jalali M, Rashidi I. Protective Effect of Caffeic Acid Phenethyl Ester (CAPE) on Amiodarone-Induced Pulmonary Fibrosis in Rat. *Iran J Pharm Res* 2011;10(2):321-8.
123. Trivier JM, Pommery N, Lhermitte M. Antioxidant defence capacity modulation of two human cell lines by amiodarone and desethylamiodarone. *Toxicol In Vitro* 1997;11(3):209-16.
124. Pollak PT, Shafer SL. Use of population modeling to define rational monitoring of amiodarone hepatic effects. *Clin Pharmacol Ther* 2004; 75(4): 342-351.
125. Kim SH, Kim SH, Lee JH, Lee BH, Yoon HJ, Shin DH, et al. Superoxide dismutase gene (SOD1, SOD2, and SOD3) polymorphisms and antituberculosis drug-induced hepatitis. *Allergy Asthma Immunol Res* 2015; 7(1): 88-91.
126. Geng R, Chen Z, Zhao X, Qiu L, Liu X, Liu R, et al. Oxidative stress-related genetic polymorphisms are associated with the prognosis of metastatic gastric cancer patients treated with epirubicin, oxaliplatin and 5-fluorouracil combination chemotherapy. *PLoS One* 2014;9(12):e116027.
127. Bissell DM, Gores GJ, Laskin DL, Hoofnagle JH. Drug-induced liver injury: mechanisms and test systems. *Hepatology* 2001; 33(4): 1009–1013.
128. Bryant AE 3rd, Dreifuss FE. Valproic acid hepatic fatalities. III. U.S. experience since 1986. *Neurology* 1996; 46(2): 465–469.

129. 143. McKenzie R, Fried MW, Sallie R, Conjeevaram H, Di Bisceglie AM, Park Y, et al. Hepatic failure and lactic acidosis due to fialuridine (FIAU), an investigational nucleoside analogue for chronic hepatitis B. *N Engl J Med* 1995; 333(17): 1099–1105.
130. Mattar W, Juliar B, Gradus-Pizlo I, Kwo PY. Amiodarone hepatotoxicity in the context of the metabolic syndrome and right-sided heart failure. *J Gastrointest Liver Dis* 2009; 18(4): 419-423.
131. Kum LC, Chan WW, Hui HH, Wong GW, Ho SS, Sanderson JE, et al. Prevalence of amiodarone-related hepatotoxicity in 720 Chinese patients with or without baseline liver dysfunction. *Clin Cardiol* 2006; 29(7): 295-299.
132. Simon JB, Manley PN, Brien JF, Armstrong PW. Amiodarone hepatotoxicity simulating alcoholic liver disease. *N Engl J Med* 1984; 311(3): 167-172.
133. Lewis JH, Mullick F, Ishak KG, Ranard RC, Ragsdale B, Perse RM, et al. Histopathologic analysis of suspected amiodarone hepatotoxicity. *Hum Pathol* 1990; 21(1): 59-67.
134. Lewis JH, Ranard RC, Caruso A, Jackson LK, Mullick F, Ishak KG, et al. Amiodarone hepatotoxicity: prevalence and clinicopathologic correlations among 104 patients. *Hepatology* 1989; 9(5): 679-685.
135. Pollak PT, Bouillon T, Shafer SL. Population pharmacokinetics of long-term oral amiodarone therapy. *Clin Pharmacol Ther* 2000; 67(6): 642-652.
136. Rätz Bravo AE, Drewe J, Schlienger RG, Krähenbühl S, Pargger H, Ummenhofer W. Hepatotoxicity during rapid intravenous loading with amiodarone: description of three cases and review of the literature. *Crit Care Med*. 2005; 33(1):128–134.
137. Huang X, Yang Y, Zhu J, Gao X, Wang G, Tan H, et al. Clinical applications and acute hepatotoxicity of intravenous amiodarone. *J Int Med Res* 2009; 37(6):1928–1936.
138. Pye M, Northcote RJ, Cobbe SM. Acute hepatitis after parenteral amiodarone administration. *Br Heart J* 1988; 59(6):690–691.
139. Douros A, Bronder E, Andersohn F, Klimpel A, Thomae M, Sarganas G, Kreutz R, Garbe E. Drug-induced liver injury: results from the hospital-based Berlin Case-Control Surveillance Study. *Br J Clin Pharmacol* 2015;79(6):988-99. doi: 10.1111/bcp.12565.
140. Tokushige K, Hashimoto E, Noto H, Yatsuji S, Tobari M, Torii N, et al. Clinical significance of serum ornithine carbamoyltransferase in patients with non-alcoholic steatohepatitis. *Hepatol Res* 2009;39(9):939–43. doi: 10.1111/j.1872-034X.2009.00530.x.

141. Lalisang TJ. Serum bile acid: an alternative liver function marker in the obstructive jaundice patient. *Acta Med Indones* 2012; 44(3): 233-8.
142. Pachkoria K, Lucena MI, Ruiz-Cabello F, Crespo E, Cabello MR, Andrade RJ, et al. Genetic polymorphisms of CYP2C9 and CYP2C19 are not related to drug-induced idiosyncratic liver injury (DILI). *Br J Pharmacol* 2007; 150: 808-815.
143. de Abajo FJ, Montero D, Madurga M, García Rodríguez LA. Acute and clinically relevant drug-induced liver injury: a population based case-control study. *Br J Clin Pharmacol* 2004;58(1):71-80.
144. Dupont WD, Plummer WD Jr. Power and sample size calculations. A review and computer program. *Control Clin Trials* 1990;11(2):116-28.
145. Moller S, Bernardi M. Interactions of the heart and the liver. *Eur Heart J* 2013; 34(36): 2804-11.
146. Yu YC, Mao YM, Chen CW, Chen JJ, Chen J, Cong WM, et al. CSH guidelines for the diagnosis and treatment of drug-induced liver injury. *Hepatol Int* 2017; 11(3): 221-41.
147. Kullak-Ublick GA, Andrade RJ, Merz M, End P, Benesic A, Gerbes AL, et al. Drug-induced liver injury: recent advances in diagnosis and risk assessment. *Gut* 2017; 66(6): 1154-64.
148. Björnsson ES. Hepatotoxicity by drugs: the most common implicated agents. *Int J Mol Sci* 2016; 17(2): 224.
149. Hahn KJ, Morales SJ, Lewis JH. Enoxaparin-induced liver injury: case report and review of the literature and FDA Adverse Event Reporting System (FAERS). *Drug Saf Case Rep* 2015; 2(1): 17.
150. Massey LV, Juliane IB, Ritzenthaler RJ, Arteel EG. Potential role of the gut/liver/lung axis in alcohol-induced tissue pathology. *Biomolecules* 2015; 5(4): 2477-503.
151. European Association For The Study Of The Liver. EASL clinical practical guidelines: management of alcoholic liver disease. *J Hepatol* 2012; 57(2): 399-420.
152. Bertholet N, Winter MR, Cheng DM, Samet JH, Saitz R. How accurate are blood (or breath) tests for identifying self-reported heavy drinking among people with alcohol dependence?. *Alcohol Alcoholism* 2014; 49(4): 423-9.
153. Marchesini G, Moscatiello S, Di Domizio S, Forlani G. Obesity-associated liver disease. *J Clin Endocrinol Metab* 2008; 93 11 Suppl 1: 74-80.

154. Massart, J, Begriche K, Moreau C, Fromenty B. Role of nonalcoholic fatty liver disease as risk factor for drug-induced hepatotoxicity. *J Clin Transl Res* 2017; 3(1 Suppl): 212.
155. Targher G, Bertolini L, Poli F, Rodella S, Scala L, Tessari R, et al. Nonalcoholic fatty liver disease and risk of future cardiovascular events among type 2 diabetic patients. *Diabetes* 2005; 54(2): 3541-6.
156. Ioannou GN, Weiss NS, Boyko EJ, Mozaffarian D, Lee SP. Elevated serum alanine aminotransferase activity and calculated risk of coronary heart disease in the United States. *Hepatology* 2006; 43(5): 1145-51.
157. Targher G, Arcaro G. Non-alcoholic fatty liver disease and increased risk of cardiovascular disease. *Atherosclerosis* 2007; 191(2): 235-40.
158. Tapper EB, Sengupta N, Bonder A. The incidence and outcomes of ischemic hepatitis: a systematic review with meta-analysis. *Am J Med* 2015; 128(12): 1314-21.
159. Yurkovich M, Avina-Zubieta JA, Thomas J, Gorenchtein M, Lacaille D. A systematic review identifies valid comorbidity indices derived from administrative health data. *J Clin Epidemiol* 2015; 68(1): 3-14.
160. Reuben A, Koch DG, Lee WM. Drug-induced acute liver failure: results of a U.S. multicenter, prospective study. *Hepatology* 2010; 52(6): 2065-76.
161. Jaiswal P, Attar BM, Yap JE, Devani K, Jaiswal R, Wang Y, Szykarek R, Patel D, Demetria M. Acute liver failure with amiodarone infusion: A case report and systematic review. *J Clin Pharm Ther* 2018; 43(1): 129-33.
162. Hui CK, Yuen MF, Ng IOL, Tsang KW, Fong GC, Lai CL. Low molecular weight heparin-induced liver toxicity. *J Clin Pharmacol* 2001; 41(6): 691-4.
163. Arora N, Goldhaber SZ. Anticoagulants and transaminase elevation. *Circulation* 2006; 113(15): e698-e702.
164. Harrill AH, Roach J, Fier I, Eaddy JS, Kurtz CL, Antoine DJ, et al. The effects of heparins on the liver: application of mechanistic serum biomarkers in a randomized study in healthy volunteers. *Clin Pharmacol Ther* 2012; 92(2): 214-20.
165. Wild SH, Byrne CD. ABC of obesity: risk factors for diabetes and coronary heart disease. *BMJ* 2006; 333(7576): 1009-11.
166. Zheng, J, Woo SL, Huu X, Botchlett, R., Chen, L., Huo, Y, et al. Metformin and metabolic diseases: a focus on hepatic aspects. *Front Med* 2015; 9(2): 173-86.

167. Firneisz G. Non-alcoholic fatty liver disease and type 2 diabetes mellitus: the liver disease of our age?. *World J Gastroenterol* 2014; 20(27): 9072-89.
168. Saeedi Saravi SS, Hasanvand A, Shahkarami K, Dehpour AR. The protective potential of metformin against acetaminophen-induced hepatotoxicity in BALB/C mice. *Pharm Biol* 2016; 54(12): 2830-7.
169. Ling S, Shan Q, Liu P, Feng T, Zhang X, Xiang P, et al. Metformin ameliorates arsenic trioxide hepatotoxicity via inhibiting mitochondrial complex I. *Cell Death Dis* 2017; 8(11): e3159.
170. Tan S, Vollmar N, Benson S, Sowa JP, Bechmann LP, Gerken G, et al. Liver injury indicating fatty liver but not serologic NASH marker improves under metformin treatment in polycystic ovary syndrome. *Int J Endocrinol* 2015; 2015: 254169.
171. Crowley MJ, Diamantidis CJ, McDuffie JR, Cameron CB, Stanifer JW, Mock CK, et al. Clinical outcomes of metformin use in populations with chronic kidney disease, congestive heart failure, or chronic liver disease: a systematic review. *Ann Intern Med* 2017; 166(3): 191-200.
172. Lebovitz RM, Zhang H, Vogel H, Cartwright J Jr, Dionne L, Lu N, et al. Neurodegeneration, myocardial injury, and perinatal death in mitochondrial superoxide dismutase-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996;93(18):9782-7.
173. Williams MD, Van Remmen H, Conrad CC, Huang TT, Epstein CJ, Richardson A. Increased oxidative damage is correlated to altered mitochondrial function in heterozygous manganese superoxide dismutase knockout mice. *J Biol Chem* 1998; 273(43):28510-5.
174. Mäntymaa P, Siitonen T, Guttorm T, Säily M, Kinnula V, Savolainen ER, Koistinen P. Induction of mitochondrial manganese superoxide dismutase confers resistance to apoptosis in acute myeloblastic leukaemia cells exposed to etoposide. *Br J Haematol* 2000;108(3):574-81.
175. Huang P, Feng L, Oldham EA, Keating MJ, Plunkett W. Superoxide dismutase as a target for the selective killing of cancer cells. *Nature*. 2000; 407(6802):390-5.
176. Sutton A, Khoury H, Prip-Buus C, Cepanec C, Pessayre D, Degoul F. The Ala16Val genetic dimorphism modulates the import of human manganese superoxide dismutase into rat liver mitochondria. *Pharmacogenetics* 2003; 13(3):145–57.
177. Akimoto AK, Miranda-Vilela AL, Alves PC, Pereira LC, Lordelo GS, Hiragi Cde O, et al. Evaluation of gene polymorphisms in exercise-induced oxidative stress and damage. *Free Radic Res* 2010;44(3):322-31. doi: 10.3109/10715760903494176.

178. Sutton A, Imbert A, Igoudjil A, Descatoire V, Cazanave S, Pessayre D, Degoul F. The manganese superoxide dismutase Ala16Val dimorphism modulates both mitochondrial import and mRNA stability. *Pharmacogenet Genomics* 2005;15(5):311-9.
179. Caple F, Williams EA, Spiers A, Tyson J, Burtle B, Daly AK, et al. Inter-individual variation in DNA damage and base excision repair in young, healthy non-smokers: effects of dietary supplementation and genotype. *Br J Nutr* 2010;103(11):1585-93. doi: 10.1017/S0007114509993540.
180. Sampson KJ, Kass RS. Antiarrhythmic drugs. In, Brunton LL, Chabner BA, Knollman BC, eds. *Goodman & Gilman's the pharmacological basis of therapeutics*. 12th ed. New York: McGraw-Hill, 2011, pp. 815-48).
181. Montano MA, da Cruz IB, Duarte MM, Krewer Cda C, da Rocha MI, Mânica-Cattani MF, et al. Inflammatory cytokines in vitro production are associated with Ala16Val superoxide dismutase gene polymorphism of peripheral blood mononuclear cells. *Cytokine* 2012;60(1):30-3. doi: 10.1016/j.cyto.2012.05.022.
182. Murayama H, Fukuda Y, Tsunekawa S, Ikemoto M, Nagata A. Ratio of serum ornithine carbamoyltransferase to alanine aminotransferase as a potent indicator for hepatocellular carcinoma. *Clin Biochem* 2007;40(13-14):1077-80.

БИОГРАФИЈА

Др Јован Јовановић је рођен 19.01.1987. године у Београду, општина Савски венац, Република Србија. Основну школу и Прву нишку гимназију „Стеван Сремац“ природно-математички смер, завршио је као носилац дипломе „Вук Караџић“. Медицински факултет Универзитета у Крагујевцу је уписао школске 2006/2007. године (основне студије медицине, доктор медицине), а на истом је дипломирао 19.07.2012. (време студирања 5 година и девет месеци) године у Крагујевцу, као најбољи дипломац генерације са просечном оценом 9,71. Након дипломирања обавио је приправнички лекарски стаж и положио стручни испит за доктора медицине. Докторске академске студије уписао је школске 2012/2013. године на Факултету медицинских наука, Универзитета у Крагујевцу, изборно подручје Клиничка и експериментална интерна медицина, а усмени докторски испит је положио 01.10.2014. године. У априлу 2015. године пријавио је докторску тезу под називом: „Клиничка и генетска анализа хепатотоксичности узроковане амјодароном код хоспитализованих пацијената“. Специјализацију из области медицине, Интерна медицина уписао је 20.01.2015. године и тренутно похађа пету годину специјализације. Почев од 01.08.2017. године запослен у сталном радном односу, као лекар на специјализацији у Клиници за кардиологију КЦ Крагујевац.

Као први аутор има објављен један рад у целини на енглеском језику, из теме и са резултатима који су саставни део докторске дисертације у часопису на SCI листи и четири рада у целини на енглеском језику као аутор и коаутор, објављена у часопису на SCI листи, чиме је у потпуности испунио услов за одбрану завршене докторске дисертације.

БИБЛИОГРАФИЈА

1. **Jovanović J**, Milovanović D, Sazdanović P, Sazdanović M, Radovanovic M, Novkovic Lj, Zdravković V, Zdravković N, Simić I, Ruzić Zecević D and Janković M: FACTORS PROFILE FOR LIVER DAMAGE IN CARDIAC INPATIENTS. Vojnosanitetski preglod 2018; Online First October, 2018. DOI: <https://doi.org/10.2298/VSP180702171J>.
2. Jeremić , Kocić S, Vulović M, Sazdanović M, Sazdanović P, Jovanović B, **Jovanović J**, Milanović Z, Đonović N, Simović A, Parezanović Ilić K, Maliković A, Toševski J and Živković- Mačužić I. ANTHROPOMETRIC STUDY OF THE FAXIAL INDEX IN POPULATION OF CENTRAL SERBIA. Archive of Biological Sciences 2013; 65(3):1163-8.
3. Sazdanović M, Mitrović S, Živanović-Mačužić I, Jeremić D, Tanasković I, Milosavljević Z, Maliković A, Ognjanović N, Sazdanović P, Jovanović B, **Jovanović J**, Todorović M, and Toševski J. SEXUAL DIMORPHISM OF MEDIUM-SIZED NEURONS WITH SPINES IN HUMAN NUCLEUS ACCUMBENS. Archive of Biological Sciences 2013; 65 (3): 1149-55.
4. Ognjanović N, Jeremić D, Živanović-Mačužić I, Sazdanović M, Sazdanović P, Tanasković I, **Jovanović J**, Popović R, Vojinović R, Milošević B, Stojadinović D, Toševski J and Vulović M. MDSC ANGIOGRAPHY OF ANATOMICAL VARIATION OF THE COELIAC TRUNK AND SUPERIOR MESENTERIC ARTERY. Archive of Biological Sciences 2014; 66(1): 233-40.
5. **Jovanović J**, Jeremić D, Jovanović B, Vulović M, Sazdanović P, Sazdanović M, Ognjanović N, Stojadinović D, Jeremić K, Marković N and Živanović-Mačužić I. NASAL MORPHOLOGICAL CHARACTERISTICS OF SERBIAN POPULATION. Archive of Biological Sciences 2014; 66(1): 227-32.
6. Đorđević M, Đorđević G, Jovanović B and **Jovanović J**. ANAMNESTIC AND POPULATION CHARACTERISTICS OF THE BREECH DELIVERIES IN SUMADIJA REGION. Acta Medica Medianae 2008; 47(2):44-48.
7. Jovanović B, **Jovanović J** and Đorđević M. UTICAJ POJEDINIHIH FAKTORA NA AKTIVNOST ENZIMA. Sanamed 2008; 3: 49-53.

ПРИЛОГ

КЉУЧНА ДОКУМЕНТАЦИЈСКА ИНФОРМАТИКА

**УНИВЕРЗИТЕТ У КРАГУЈЕВЦУ
ФАКУЛТЕТ МЕДИЦИНСКИХ НАУКА У КРАГУЈЕВЦУ**

Редни број - РБ:

Идентификациони број - ИБР:

Тип документације - ТД: Монографска документација

Тип записа - ТЗ: Текстуални штампани материјал

Врста рада - ВР: Докторска дисертација

Аутор - АУ: Јован Јовановић

Ментор/коментор - МН: проф. др Драган Миловановић

Наслов рада - НР: Клиничка и генетска анализа хепатотоксичности узроковане амјодароном код хоспитализованих пацијената

Језик публикације - ЈП: српски/ ћирилица

Језик извода - ЈИ: српски/ енглески

Земља публикавања - ЗП: Република Србија

Уже географско подручје - УГП: Централна Србија

Година - ГО: 2019. година

Издавач - ИЗ: Ауторски репринт

Место и адреса - МС: 34 000 Крагујевац, Светозара Марковића 69, Република Србија

Физичи опис рада - ФО: 128 страница 79 слика 76 табела

Научна област - УДК: Медицина

Научна дисциплина - ДИ: кардиологија

Предметна одредница/ кључне речи - ПО: хепатотоксичност, амјодарон, биолошки маркери, супероксид дизмутаза, фактори ризика, прогностички значај

Чува се - ЧУ: У библиотеци Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу

Важна напомена- МН:

Извод - ИД: Акутна хепатотоксичност је један од највећих проблема фармаковигиланце. Дијагноза овог нежељеног дејства би требало да се заснива на клиничким критеријумима али и на детекцији специфичних биомаркера хепатоцелуларног и/или холестатског оштећења. Неколико студија је доказало повезаност токсичних ефеката амјодарона и активности супероксид дизмутаза (SOD). Истраживање ће се спровести у два дела. Један ће бити проспективна контролисана студија, дизајнирана према кохорти болесника који имају хепатотоксичност и примају амјодарон и други, који ће обухватити ретроспективно прикупљање података и последичну анализу са два опсервациона дизајна, студије типа „случај-контрола“ (појава хепатотоксичности) и кохортне студије (изложеност фактору ризика-амјодарону). Истраживање ће бити спроведено у Клиници за кардиологију, према етичким принципима научно-истраживачког рада. Ретроспективну популацију ће чинити пацијенти који су лечени у клиници у протеклих десет година. Подаци ће бити прикупљени увидом у историје болести. За проспективну, контролисану студију користитиће се узорци крви болесника који се лече на клиници, одређиваће се биомаркери хепатотоксичног оштећења и генетски полиморфизам SOD2. Током проспективне, контролисане студије користиће се детаљни подаци неинвазивне клиничке дијагностике која је од значаја за варијабле истраживања. Статистичка анализа прикупљених података ће обухватити прорачун величине узорка и статистичку обраду. Примарне независне варијабле су: присуство Val16Ala полиморфизма (rs4880) SOD2, у проспективној студији и узимање амјодарона, у ретроспективној кохорти. Примарна зависна варијабла је присуство хепатотоксичности. С обзиром да су подаци у доступној литератури за дату популацију оскудни и контроверзни, резултати ће представљати оригинални допринос у области расветљавања механизма и значаја хепатотоксичности удружене са употребом амјодарона код хоспитализованих болесника.

Кључне речи: хепатотоксичност, амјодарон, биолошки маркери, супероксид дизмутаза, фактори ризика, прогностички значај

Датум прихватања теме од стране ННВ - ДП: 30.09.2015. г.

Датум одбране - ДО:

Чланови комисије - КО:

1. Проф. др Владимир Милорадовић, редовни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Интерна медицина, председник;
2. Проф. др Наташа Ђорђевић, ванредни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Фармакологија и токсикологија, члан;
3. Проф. др Биљана Радовановић Динић, ванредни професор Медицинског факултета Универзитета у Нишу за ужу научну област Интерна медицина, члан.

KEY WORDS DOCUMENTATION

UNIVERSITY OF KRAGUJEVAC FACULTY OF MEDICAL SCIENCES KRAGUJEVAC

Accession number - ANO:

Identification number - INO:

Documentation type - DT: Monographic publication

Type of record - TR: Textual printed material

Contents code - CC: Ph.D.Thesis

Author - AU: Jovan Jovanović

Menthor/co-mentor - MN: Professor Dragan Milovanović, M.D.Ph.D.

Title - TI: Clinical and genetic analysis of amiodarone induced hepatotoxicity of cardiac inpatients

Language of text - LT: Serbian/ Cyrillic

Language of abstract: Serbian/ English

Country of publication - CP: Republic of Serbia

Locality of publication - LP: Central Serbia

Publication year - PY: 2019

Publisher - PU: Author reprint

Publication place - PP: 34 000 Kragujevac, Svetozara Markovica 69, Republic of Serbia

Physical description - PD: 128 pages 79 figures 76 tables

Scientific field - SF: Medicine

Scientific discipline - SD: Cardiology

Subject/key words - SKW: hepatotoxicity, amiodarone, biomarkers, superoxide dismutase, risk factors, prognostic significance

UDCHolding data: Library of Faculty of medical sciences, University of Kragujevac, Republic of Serbia

Note - N:

Accepted by the Scientific Board on - ASB:

Acute hepatotoxicity represents nowadays one of the greatest problems in pharmacovigilance. The diagnosis of this adverse reaction should be based on clinical criteria as well as on the detection of specific biomarkers of hepatocellular and / or cholestatic damage. Several studies have demonstrated the correlation of toxic effects of amiodarone and the activity of superoxide dizmutase (SOD). The research will consist of two parts. One will be a prospective controlled study, designed according to the cohort of patients with hepatotoxicity and receiving amiodarone and the other, which will include retrospective data collection and consequent analysis with two observational designs, case-control study (hepatotoxicity) and cohort study (exposure to risk factor-amiodarone). The research will be conducted at the Clinic for Cardiology, according to the ethical principles of scientific research. The retrospective population will consist of

patients who have been treated in the Clinic for the past ten years. The data will be collected by screening the medical records of the patients. For a prospective, controlled study, blood samples of patients who are being hospitalized at the clinic will be used for determination of hepatotoxic lesion biomarkers and genetic polymorphism of SOD2. During the prospective, controlled study will be used detailed noninvasive clinical diagnostic data, which is important for the research variables. Statistical analysis of the collected data will include a sample size calculation and statistical processing. Primary independent variables are: presence of Val16Ala polymorphism (rs4880) SOD2 in prospective study and amiodarone administration in a retrospective cohort. The primary dependent variable is the presence of hepatotoxicity. Considering the fact the data in available literature for the given population are scarce and controversial, the results will be an original contribution to the field of clarification of the mechanism and significance of hepatotoxicity associated with the use of amiodarone in hospitalized patients.

Key words: hepatotoxicity, amiodarone, biomarkers, superoxide dismutase, risk factors, prognostic significance

Defended on - DE:

Thesis defended board (Degree/name/surname/title/faculty) - DB:

Thesis defended board (Degree/name/surname/title/faculty) – DB:

- 1. Full Professor, Vladimir Miloradović, M.D, Ph.D, Faculty of Medical Sciences, University of Kragujevac, Chairman;**
- 2. Associate Professor, Nataša Đorđević, M.D, Ph.D, Medical Faculty, University of Kragujevac, member;**
- 3. Associate Professor, Biljana Radovanović Dinić, M.D, Ph.D, Faculty of Medical Sciences, University of Niš, member.**

Образац 1.

ИЗЈАВА АУТОРА О ОРИГИНАЛНОСТИ ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ

Ја, _____ Јован Јовановић _____, изјављујем да докторска дисертација под насловом:

Клиничка и генетска анализа хепатотоксичности узроковане амјодароном код хоспитализованих пацијената

која је одбрањена на _____ Факултету медицинских наука,

Универзитета у Крагујевцу представља *оригинално ауторско дело* настало као резултат *сопственог истраживачког рада*.

Овом Изјавом такође потврђујем:

- да сам *једини аутор* наведене докторске дисертације,
- да у наведеној докторској дисертацији *нисам извршио/ла повреду* ауторског нити другог права интелектуалне својине других лица,
- да умножени примерак докторске дисертације у штампаној и електронској форми у чијем се прилогу налази ова Изјава садржи докторску дисертацију истоветну одбрањеној докторској дисертацији.

У _____ Крагујевцу _____, 2019 _____ године,

потпис аутора

Образац 2.

ИЗЈАВА АУТОРА О ИСКОРИШЋАВАЊУ ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ

Ја, _____ Јован Јовановић _____,

дозвољавам

не дозвољавам

Универзитетској библиотеци у Крагујевцу да начини два трајна умножена примерка у електронској форми докторске дисертације под насловом:

Клиничка и генетска анализа хепатотоксичности узроковане амјодароном код хоспитализованих пацијената

која је одбрањена на _____ Факултету медицинских наука _____

Универзитета у Крагујевцу, и то у целини, као и да по један примерак тако умножене докторске дисертације учини трајно доступним јавности путем дигиталног репозиторијума Универзитета у Крагујевцу и централног репозиторијума надлежног министарства, тако да припадници јавности могу начинити трајне умножене примерке у електронској форми наведене докторске дисертације путем *преузимања*.

Овом Изјавом такође

дозвољавам

не дозвољавам¹

¹ Уколико аутор изабере да не дозволи припадницима јавности да тако доступну докторску дисертацију користе под условима утврђеним једном од *Creative Commons* лиценци, то не искључује право припадника јавности да наведену докторску дисертацију користе у складу са одредбама Закона о ауторском и сродним правима.

припадницима јавности да тако доступну докторску дисертацију користе под условима утврђеним једном од следећих *Creative Commons* лиценци:

- 1) Ауторство
- 2) Ауторство - делити под истим условима
- 3) Ауторство - без прерада
- 4) Ауторство - некомерцијално
- 5) Ауторство - некомерцијално - делити под истим условима
- 6) Ауторство - некомерцијално - без прерада²

У Крагујевцу, 2019 године,

потпис аутора

² Молимо ауторе који су изабрали да дозволе припадницима јавности да тако доступну докторску дисертацију користе под условима утврђеним једном од *Creative Commons* лиценци да заокруже једну од понуђених лиценци. Детаљан садржај наведених лиценци доступан је на: <http://creativecommons.org.rs/>

Радови који су били услов за пријаву завршене докторске дисертације

Jovanović J, Milovanović D, Sazdanović P, Sazdanović M, Radovanovic M, Novkovic Lj, Zdravković V, Zdravković N, Simić I, Ruzić Zecević D and Janković M: FACTORS PROFILE FOR LIVER DAMAGE IN CARDIAC INPATIENTS. *Vojnosanitetski pregled* 2018; Online First October, 2018. DOI: <https://doi.org/10.2298/VSP180702171J>.



VOJNOSANITETSKI PREGLED

VOJNOMEDICINSKA AKADEMIJA

Crnotravska 17, 11 000 **Beograd, Srbija**

Tel/faks: +381 11 2669689

vsp@vma.mod.gov.rs

ACCEPTED MANUSCRIPT

Accepted manuscripts are the articles in press that have been peer reviewed and accepted for publication by the Editorial Board of the *Vojnosanitetski Pregled*. They have not yet been copy edited and/or formatted in the publication house style, and the text could still be changed before final publication.

Although accepted manuscripts do not yet have all bibliographic details available, they can already be cited using the year of online publication and the DOI, as follows: article title, the author(s), publication (year), the DOI.

Please cite this article **FACTORS PROFILE FOR LIVER DAMAGE IN CARDIAC INPATIENTS**

PROFIL FAKTORA RIZIKA ZA OŠTEĆENJE JETRE KOD KOD HOSPITALIZOVANIH KARDIOLOŠKIH BOLESNIKA

Authors Jovan Jovanović*, Dragan R. Milovanović†, Predrag Sazdanović†, Maja Sazdanović‡, Milan Radovanović†, Ljiljana Novković†, Vladimir Zdravković*, Nemanja Zdravković‡, Ivan Simić*, Dejana Ruzić Zecević† and Slobodan M. Janković†, Vojnosanitetski pregled (2018); Online First October, 2018.

UDC:

DOI: <https://doi.org/10.2298/VSP180702171J>

When the final article is assigned to volumes/issues of the Journal, the Article in Press version will be removed and the final version appear in the associated published volumes/issues of the Journal. The date the article was made available online first will be carried over.

FACTORS PROFILE FOR LIVER DAMAGE IN CARDIAC INPATIENTS

PROFIL FAKTORA RIZIKA ZA OŠTEĆENJE JETRE KOD KOD HOSPITALIZOVANIH KARDIOLOŠKIH BOLESNIKA

Jovan Jovanović*, **Dragan R. Milovanović†**, **Predrag Sazdanović‡**, **Maja Sazdanović‡**,
Milan Radovanović†, **Ljiljana Novković†**, **Vladimir Zdravković***, **Nemanja
Zdravković‡**, **Ivan Simić***, **Dejana Ruzić Zecević†** and **Slobodan M. Janković†**

*Clinic for Cardiology, Clinical Center “Kragujevac”, Kragujevac, Serbia

†Clinical Center “Kragujevac”, Faculty of Medical Sciences University of Kragujevac,
Kragujevac, Serbia

‡Faculty of Medical Sciences University of Kragujevac, Kragujevac, Serbia

Correspondence:

Jovan Jovanovic, M.D.

Clinic for Cardiology, Clinical Center “Kragujevac”,

Zmaj Jovina 30, 34000 Kragujevac, Serbia

Phone: *381 69 20 26 416

Fax: *381 34 370 073

E-mail: jovanovmejl1@gmail.com

Abstract

Background/Aim. Liver damage is not an infrequent occurrence in hospitalized cardiology patients, with potentially serious consequences. The aim of our study was to investigate the risk factor profile for liver damage in patients hospitalized from a deterioration of their acute or chronic cardiac illness. **Methods.** The study had observational case-control design with retrospective data collections from medical files of adult patients from tertiary care center. The cases (n=140) were subjects with novel liver injury (which emerged during hospital stay) and three control subjects were matched (age, date) for each case subject (n=420). The primary outcome was hepatotoxicity (present or absent) and independent variables were proposed risks. Statistical analysis included descriptive methods, hypothesis testing and univariable and multivariable binary logistic regression, with $p \leq 0.05$. **Results.** In the whole study population, there were 432 females (77.1%) and the mean age of patients was 64.1 years (SD=10.7, range 24-85). The most common illnesses were coronary heart disease (385 patients), hypertension (334) and arrhythmia (115). Mean value of Charlson Comorbidity Index (CCI) score was 3.8 (SD=1.7, 1-10) corresponding to estimated CCI 10-years survival rate of 54.4% (SD=33.5%). In the group of cases, 114 (81.4%) patients had hepatocellular, 9 (6.4%) cholestatic and 17 (12.2%) mixed type of hepatic injury. The factors independently associated with hepatotoxic event were previous occasional alcohol intake (odds ratio 96.47, 95% confidence interval 28.95-321.43, $p < 0.001$), amiodarone (3.70, 1.82-7.53, < 0.001), enoxaparin (3.29, 1.79-6.05, < 0.001), obesity (2.78, 1.15-6.71, 0.023), atorvastatin (2.67, 1.33-5.38, 0.006) and CCI total score (1.89, 1.53-2.34, < 0.001). **Conclusion.** Major factors associated with acute liver damage in patients hospitalized in cardiology ward of tertiary health care institution were patient's constitutional and habitual characteristics (occasional alcohol intake, obesity, CCI total score) and drugs with known hepatotoxic properties (amiodarone, enoxaparin, atorvastatin).

Key words:

amiodarone; hospitals; inpatients; liver; cardiovascular diseases; tertiary care centers; liver diseases; risk factors; chemical and drug induced liver injury.

Apstrakt

Uvod/Cilj. Oštećenje jetre nije retka pojava kod hospitalizovanih kardioloških bolesnika, sa potencijalno ozbiljnim posledicama. Cilj naše studije bio je ispitivanje profila faktora rizika za oštećenje jetre kod pacijenata koji su hospitalizovani zbog pogoršanja akutne ili hronične kardiološke bolesti. **Metode.** Studija je bila opservacionog dizajna, tipa slučaj-kontrola, uz retrospektivno prikupljanje podataka uvidom u istorije bolesti odraslih pacijenata lečenih u tercijarnoj zdravstvenoj ustanovi. Slučajevi (n=140) su bili pacijenti sa novonastalom povredom jetre (koja se razvila tokom hospitalizacije) i po tri kontrolna pacijenta (n=420) koji su se podudarali po godinama i datumu hospitalizacije su pridruženi svakom slučaju. Primarni ishod je bila hepatotoksičnost (simptomatska ili asimptomatska), a nezavisne varijable su bile predložene kao faktori rizika. Statistička analiza je uključivala deskriptivne metode, ispitivanje hipoteze i univarijantnu i multivarijantnu binarnu logističku regresiju, sa $p \leq 0.05$. **Rezultati.** Od ukupne studijske populacije bilo je 432 osobe ženskog pola (77.1%) a srednja vrednost godina pacijenata je bila 64.1 godina (SD=10.7,

opseg 24-85). Najčešće bolesti su bile koronarna bolest (385 pacijenata), hipertenzija (334) i aritmija (115). Srednja vrednost Charlson Comorbidity Indexa (CCI) je bila 3.8 (SD=1.7, 1-10) što je bilo u skladu sa procenjenim CCI 10ogodišnjim preživljavanjem od 54.4% (SD=33.5%). U grupi slučaj 114 (81.4%) pacijenata je imalo hepatocelularni tip, 9 (6.4%) holestatski tip a 17 (12.2%) mešoviti tip oštećenja jetre. Faktori koji su nezavisni prediktori hepatotoksičnog događaja su prethodna povremena konzumacija alkohola (OR 96.47, 95% interval poverenja 28.95-321.43, $p < 0.001$), amiodaron (3.70, 1.82-7.53, < 0.001), enoxaparin (3.29, 1.79-6.05, < 0.001), gojaznost (2.78, 1.15-6.71, 0.023), atorvastatin (2.67, 1.33-5.38, 0.006) i ukupni CCI skor (1.89, 1.53-2.34, < 0.001). **Zaključak:** Glavni faktori koji su povezani sa akutnim oštećenjem jetre kod pacijenata hospitalizovanih na kardiološkom odeljenju u institucijama tercijarne zdravstvene nege su konstitucionalne karakteristike i navike pacijenta (povremeni unos alkohola, gojaznost, CCI skor) i lekovi za koje se zna da imaju hepatotoksični potencijal (amiodaron, enoksaparin, atorvastatin).

Ključne reči:

amiodaron; bolnice; hospitalizovani bolesnici; jetra; kardiovaskularne bolesti; ustanove tercijarne zdravstvene zaštite; oboljenja jetre; faktori rizika; oštećenje jetre uzrokovano hemijskim agensima i lekovima.

Introduction

Cardiac patients represent a population that is very prone to developing manifestations of the liver damage because they have many characteristics which are, in essence, the risk factors for hepatic injury. The liver receives up to a quarter of cardiac output and any cardiovascular disease which causes significant reduction of arterial perfusion and increased cardiac preload could lead to concomitant hypoxia of hepatic tissue and features of congestive hepatopathy. Such risk factors could be, for example, any cause of right ventricular heart failure, including constrictive pericarditis, tricuspid regurgitation, mitral stenosis, cardiomyopathy, and cor pulmonale¹. In addition, physicians usually prescribe numerous drugs to patients suffering from cardiovascular disease, particularly within hospital settings and some of such pharmaceuticals have more or less the ability to induce liver injury. Recognizing particular risk factors for drug-induced hepatotoxicity in cardiac inpatients is an important clinical task. Such host factors can be divided into two groups: genetic (e.g. polymorphism or variant involving drug-metabolizing enzymes and transport proteins) and non-genetic (e.g. age, gender, concomitant somatic disease, pregnancy, alcohol, smoking, obesity)².

In general, drug-induced liver damage is nowadays recognized as one of the greatest problems in pharmacovigilance. Its incidence in developed countries on annual basis is significant, it is the major reason for drug withdrawal from the market as well as for stopping drug therapy due to safety issues and it causes important economic losses³. Cardiological drugs such as amiodarone, hydralazine, methyldopa, statins (atorvastatin, simvastatin), quinidine and ticlopidin as well as some other medicines frequently prescribed in hospitalized cardiac inpatients with associated comorbidity such as antibiotics (amoxicillin plus clavulanate, nitrofurantoin, sulfamethoxazole plus trimethoprim, sulfonamides), antigout agents (allopurinol) and non-steroidal anti-inflammatory drugs (diclofenac, ibuprofen, nimesulide) have been classified in the group of the pharmaceuticals with the most frequent reports of liver damage⁴. Other drugs, commonly

prescribed to these patients are sometimes associated with hepatic damage. For example, among all reports of adverse events associated with the use of enoxaparin in a pharmacovigilance database about 4% cases involve hepatic events⁵.

Although liver toxicity of amiodarone (which is among the main cardiological drugs with known hepatotoxic capacity) has been well described so far, additional research is needed for some features. Firstly, the mutual relationships of predisposing factors, which play synergistic role in the development of the amiodarone-induced hepatotoxicity, are still not completely understood. Drug-related (cumulative dose, pharmaceutical formulation, administration route), patient-dependent (age, gender, nutritional status, comorbidity, genetic polymorphism of metabolizing enzymes and target receptors) and treatment-associated issues (other hepatotoxic medications, adverse drug interactions) are examples of such factors^{2,6,7}.

Secondly, rare studies included exclusively cardiac inpatients and data in that subpopulation were rather limited⁸. Previous researchers examined hepatotoxicity caused by amiodarone in variety of ambulatory and/or inpatient groups including subjects with comorbid gastrointestinal, liver and other internal diseases^{9,10}. The patients primarily hospitalized from cardiovascular diseases have rather unique risk factor patterns for liver injury. Coronary heart disease, heart failure, coagulation disorders (e.g. unstable prothrombin time), inflammatory illnesses (e.g. bacterial endocarditis, myopericarditis), endocrine disturbances (e.g. thyrotoxic cardiac disease) and circulatory instability due to extreme bradycardia or tachyarrhythmias are some of circumstances highly predisposing the inpatients to organ-specific or systemic ischemia. Frequent use of diagnostic and therapeutic vascular procedures (cardiac surgery, percutaneous coronary interventions) and medical devices (e.g. intra-aortic balloon pump, pacemakers, cardiac ablation and electrostimulation equipment) as well as high prescription rate of drugs with possible hepatic adverse reactions (e.g. antilipemic drugs, anticoagulants, analgesics) add further risks for clinically-important liver damage.

Taking the above-mentioned facts into account, in this study we aimed to investigate the risk factor profile for liver injury in patients, which had been hospitalized due to a deterioration of their acute or chronic cardiac illness.

Methods

This research was based upon a retrospective data collection and observational case-control design, similar to other studies in the field^{10,11}. The study had been conducted in the Clinic of Cardiology, the Clinical Center “Kragujevac” in Kragujevac, Serbia. It complied with the ethical principles of the scientific research and it was approved by the Institutional Ethics Committee. The medical records of all patients treated at the institution throughout the period of four years (2011-2014) had been screened. The study cases were the subjects with novel liver injury, which emerged during the hospital stay (“the index day”) and three control subjects were randomly chosen for each case subject among the all patients from the ward that were matched with this case. The control subjects had no recorded signs of liver injury at admission nor until the index day. They had been matched with case patients for gender and age (5-year intervals), and taking into account the inclusion and exclusion criteria. The selection of patients had been performed successively in the described manner, until the estimated number of study subjects was fulfilled.

The case patient was included if he or she was male or female, 18 to 75 years old and had a hepatotoxic event during hospitalization which was identified as any of the following: a liver enzyme level increase more than three times above the upper limit of the reference values, a total bilirubin two times higher than the upper limit of the reference values and clinically manifested symptoms of the acute liver damage (pain under the right rib, nausea, feeling sick, vomiting, jaundice, hemorrhagic syndrome, abdominal pain, hepatomegaly). The exclusion criteria for both the case and the control subjects were the following: age younger than 18 or older than 75 years, confirmed diagnosis of either acute or chronic liver disease such as liver cirrhosis, Wilson's disease, porphyry, alpha-1 antitrypsin deficiency, hepatitis virus infection, primary biliary cirrhosis, primary sclerosing cholangitis, substance abuse, biliary calculosis, cholecystitis, pancreatitis, abdominal trauma, the increased values of aspartate aminotransferase (AST) at baseline, with an AST/ALT ratio >2 upon admission, increased values of alanine aminotransferase (ALT), gamma-glutamyltransferase (GGT), alkaline phosphatase (ALP), total bilirubin, direct bilirubin above the upper normal limits at admission and the decreased platelet counts below the lower normal limits at admission. AST/ALT ratio >2 was the exclusion criterion because it was considered highly suggestive for alcohol abuse and consequent patient's liver injury¹².

The probability of supposed drug-induced/associated liver damage was assessed using the CIOMS/RUCAM scale (Council for International Organizations of Medical Sciences/RousselUclaf Causality Assessment Method), a purposefully designed questionnaire aimed at evaluation of hepatotoxic effect of medications, herbal products and other xenobiotics. This questionnaire had already been used in numerous clinical studies as a valid method¹³. Drugs were classified according to the ATC (Anatomical Therapeutic Chemical) classification system used by the World Health Organization (http://www.whocc.no/atc_ddd_index) and the medication exposure was expressed as the number of defining daily doses (DDD) per 100 patient's days (PD) of hospitalization. We used Charlson Comorbidity Index (CCI) in order to assess the influence of patients' multiple comorbidities¹⁴. The composite score of CCI has been calculated with assessing age and existence of diabetes mellitus, liver disease, malignancy, AIDS, moderate to severe chronic kidney disease, chronic heart failure, myocardial infarction, chronic obstructive pulmonary disease, peripheral vascular disease, cerebrovascular accident or transitory ischemic attack, dementia, hemiplegia, connective tissue disease and peptic ulcer disease of study patients.

The primary dependent variable was the hepatotoxicity, expressed as a binary variable (present or absent). The primary independent variable was treatment with amiodarone, identified as the prescription of at least one of its oral or parenteral dose. There were numerous other secondary independent or confounding variables (e.g. route of amiodarone administration, number of DDD of amiodarone per 100 PD, type of cardiovascular disease, important comorbid illness, prescription of drugs with known hepatotoxic properties, particularly hypolipidemics, nonsteroidal anti-inflammatory drugs, antiepileptics and antibiotics, patients' socio-demographic characteristics, smoking, caffeine intake as well as use of dietary supplements, herbal remedies and other over-the-counter-preparations)^{15,16}.

We performed study sample calculation using the appropriate computer program, setting up the alpha error at 0.05 and the study power at 0.8 for dichotomous variable (χ^2 -test). The expected difference in the frequency of hepatotoxic-drug prescription rate

(amiodarone) relating to the presence of primary variable (liver injury) has been presumed based on a preliminary analysis of a small patient sample at the same institution (42.5% vs. 32.5%, odds ratio 1.49). The calculation with above-mentioned input parameters gave the total sample size of 280 case patients and 840 control subjects. However, we prespecified the interim analysis after the inclusion of the half of study subjects with the study-ending rule if the analysis confirmed the statistically significant difference in the amiodarone-exposure rate (e.g. significant odds ratio) between the study groups. Therefore, the final study sample included 560 cardiology inpatients.

Statistical analysis of collected data included the descriptive methods (measures of central tendency and variability, frequencies), the methods for hypothesis testing (Student's t-test or Man-Whitney U test, χ^2 -Chi-squared test, or Fisher's exact test) and the calculation of crude and adjusted odds ratios (with 95% confidence intervals) using univariable and multivariable binary logistic regression. The probability level of significance for observed differences between study groups for all statistical analysis had been established at 5% (0.05) or less.

Results

The study included 2,500 hospital files of the patients treated during the study period of four years in the Clinic of Cardiology, Clinical Center "Kragujevac", Kragujevac, Serbia. After the first assessment for eligibility, we excluded a total of 1,500 patient records due to the presence of the exclusion criteria. The final sample included 140 patients' files in the case group and 420 patients' records in the control group, after exclusion of non-matched control patients and subsequent identification of non-eligible criteria (Figure 1).

Most of the patients were females (432 of 560, 77.1%) and the mean age of patients in the whole study sample was 64.1 years (standard deviation – SD, 10.7 years, from 24 to 85 years). Obesity was not significantly represented in the study population because only 46 (8.2%) study patients of whole study population were obese. Morphological hepatic lesion, ultrasonographic verified as fatty liver or hepatomegaly were observed in 116 (20.7%) patients from the whole study population, while clinically symptomatic hepatotoxicity had 28 (20.0%) of case group patients.

Patients had been hospitalized due to cardiovascular illnesses, among which the most common was coronary heart disease, followed by hypertension, arrhythmia and heart failure. Myocardial infarction with ST-segment elevation (STEMI) was the most frequent diagnosis of all coronary heart diseases, followed by myocardial infarction without ST-segment elevation (non-STEMI), non-stable angina, stable angina and ischemic cardiomyopathy. Among the patients who had arrhythmia, atrial fibrillation was the most frequent reason for commencement of drug treatment, followed by tachycardia and extrasystoles. Of all patients who had heart failure, about the three quarter of the patients had ejection fraction (EF) >45% , while the others had heart failure with ejection fraction \leq 45%. The most common non-cardiovascular comorbid disorder was diabetes mellitus. Only a minority of patients consumed alcohol periodically, and majority were non-smokers. The mean value of Charlson Comorbidity Index (CCI) score in the whole study population was 3.8 (SD 1.7, from 1 to 10) with the estimated CCI 10-years survival rate of 54.4% (SD=33.5%).

The patients' characteristics and laboratory values in all the study subjects and in the patients within study subgroups are presented in tables 1 and 2, respectively. The

median of days of hospitalization was 4 days (range 1-45) and the mean value 6.0 (SD=5.6) for all patients in the study group. In the case group, the median of days of hospitalization was 7 (range 2-30) and the mean 7.7 (SD=5.0) while for the control group was 3 days (range 1-45) and the mean 5.4 (SD=5.7). Overall mortality rate was 4 (0.7%) in the group of all study patients, considering that no fatal outcome was observed in the control group.

The most frequently prescribed drug in the study population was acetylsalicylic acid, followed by the inhibitors of angiotensin-converting enzyme (ACE), selective beta blocking agents, clopidogrel, atorvastatin, proton pump inhibitors, organic nitrates, enoxaparin sodium, trimetazidine, high-ceiling diuretics, amiodarone, benzodiazepines, dihydropyridines, H₂ receptor antagonists, metformin, xanthines, spironolactone and sulphonylureas. Other drugs were prescribed in less than 5% of study patients and due to low frequency of the use, they had been excluded from further analysis.

The primary analysis of factors associated with liver injury was performed with hypothesis testing of differences of study variables between the case and control groups of study patients (table 1-3). In the case group, 114 patients (81.4%) had hepatocellular type of injury, 9 (6.4%) cholestatic and 17 (12.2%) mixed-type of hepatic injury. Numerous demographic and clinical characteristics, laboratory parameters and drugs were differently distributed between two study groups with statistical significance. Previous occasional alcohol intake and current obesity, type of arrhythmia and diabetes mellitus type 2, cholesterol and leukocytosis as well as amiodarone and enoxaparin had higher magnitude of association with liver injury within their risk-factor groups (table 1).

In the model of multivariable binary logistic regression among nine putative risk factors for hepatotoxicity, which we selected based on statistical significance, existing knowledge and clinical reasoning, six (alcohol intake, amiodarone, enoxaparin, obesity, atorvastatin, CCI score) had independent association with liver injury (table 4). The whole model (with all putative predictors) was statistically significant ($p < 0.001$). The whole model (with all putative predictors) was statistically significant ($p < 0.001$) with Cox & Snell R Square $p = 0.457$ and Hosmer-Lemeshow test $p = 0.279$. There was no significant multicollinearity between the predictors. The model was also stable after the introduction of the interaction of amiodarone and CCI score which was insignificant ($p = 0.251$). Alkaline phosphatase, creatine phosphokinase, creatine phosphokinase-MB, total serum proteins, C-reactive protein, cholesterol, white blood cell count were also statistically associated with liver injury within univariate binary logistic regression analysis, but the magnitudes of their odds ratios were very tiny and their lower confidence intervals touched the one and they were excluded from the model.

The analysis placed the drugs with possible hepatotoxic effects on the top among other risks for liver injury in hospitalized cardiac patients. Causal assessment of drug-associated liver injury in case group using CIOMS/RUCAM scoring scale additionally confirmed the findings. The average value of the total score in the patients of case group was 7.8 (SD 1.3, from 5.0 to 11.0). Out of 140 cases, in 39 (27.8%) patients the medicine causality was assessed as highly probable (CIOMS/RUCAM score ≥ 9), in 100 (71.4%) patients as probable (score 6-8) and in 1 (0.7%) patient as possible (score 3-5). Amiodarone had the highest prescription rate and the median of defined daily dose of amiodarone was 112.5 per 100 patients' hospital days (range 3.6-800). In the case group amiodarone utilization was 193.8 DDD per 100 patients' hospital days (range 8.3-412.5) and 75.0 DDD per 100 patients' hospital days (range 3.6-800.0) in the control group ($p < 0.001$). Amiodarone was administered parenterally, orally and via both routes in 44 (31.4%), 5

(3.6%) and 21 (15.0%) case study subjects and in 11 (2.6%), 45 (10.7%) and 10 (2.4%) control study subjects, respectively ($p < 0.001$).

Discussion

The result of our research showed that occasional alcohol intake, obesity, combined significant comorbidities and prescription of amiodarone, enoxaparin and atorvastatin were independently associated with liver injury in the hospitalized patients with cardiac diseases. In addition, we established the rank order for hepatotoxicity of commonly prescribed drug in patients of cardiology wards in which amiodarone represent the greatest risk. We also noted significant strength of the association of drug prescription and liver damage, which has been little studied so far for the investigated study population.

Pre-hospital alcohol intake was the most significant independent risk factor for hepatotoxicity in subjects of our study despite the fact that manifested alcoholism was an exclusion criterion. Therefore, the study patients were those who either consumed alcohol infrequently or in small quantities, but who, at the time of being included in the study, had neither symptomatic nor asymptomatic liver damage. Unique characteristics of hospitalized cardiac patients (e.g. hypotension, hepatic ischemia, liver congestion, hepatotoxic cardiovascular drugs) probably potentiate well-known hepatotoxic action of alcohol even if it had been consumed in minute quantities before hospital admission¹⁷⁻¹⁹.

In our study, many patients had both obesity and ultrasound findings of fatty liver, which suggested the presence of nonalcoholic fatty liver degeneration. We did not obtain pathological findings of patients' liver tissues and the hospital patients record usually does not include data necessary for evaluation of visceral (central) type of obesity (e.g. waist circumference) which is primarily associated with liver disease²⁰. However, numerous previous published studies provided the strong association of obesity-triggered nonalcoholic fatty liver degeneration and coronary heart disease, the later very prevalent in our study subjects²¹⁻²⁴.

Patients with a large number of comorbidities in our study, as assessed with CCI score, had significantly higher probability of liver injury, independently of other factors. Several cardiovascular conditions associated with case study subjects in univariate analyses; however, we decided to include variables of two main cardiac disorders (coronary heart disease, heart failure) as well as other condition related to atherosclerosis and metabolic disbalance (peripheral vascular disease, cardiovascular accident, transient ischemic attack, hemiplegia, diabetes) within the composite, co-morbidity assessment tool in order to decrease confounding by indication (indication bias) and increase the model performance for detecting drug-induced liver injury. For example, congestive heart failure is a common cause of acute liver injury in hospitalized patients²⁵. Previous studies confirmed that higher CCI scores did put the patient in increased mortality risk, but the association with acute hepatotoxic damage was little investigated, at least in patients treated in cardiology wards²⁶. Therefore, our findings could be considered a novelty in the field, which deserves further validation research.

Three drugs in patients of our study, amiodarone, enoxaparin and atorvastatin, were strongly associated with newly appeared, acute hepatic damage. The drug pharmacological profiles and accumulated, overall knowledge about the role of pharmaceuticals, in general, for various types of hepatic injuries support such results²⁷. Many patient-specific factors in subjects with advanced cardiovascular disease and/or cardiac emergencies admitted to

hospital mutually interplay, predisposing to drug induced hepatotoxicity. For example, unstable coronary heart disease causes worsening of existing arrhythmia or emergence of novel rhythm disorders which need escalation of drug treatment. Indeed, prescription of amiodarone led other, numerous drugs with hepatotoxic actions.

Our study was neither designed nor adequately powered to discriminate hepatotoxic action of two amiodarone formulations, but some issues in our results and literature data (e.g. short duration of hospital stay until the appearance of liver injury, higher defined daily doses, significant differences in route of use between study group, known facts about possible hepatotoxicity of pharmaceutical excipients in parenteral formulation) indirectly point suggest that parenteral administration was a primary risk factor^{28,29}.

Enoxaparin and atorvastatin had also positive and significant association with hepatotoxicity in our study in comparison with the use in control subjects. Enoxaparin could increase liver transaminase levels and, in some cases, may cause toxic hepatitis due to temporary necrosis of hepatocytes, usually around one week after the treatment initiation and in a dose-dependent manner³⁰⁻³³. Atorvastatin had well-known hepatotoxic potential, which could manifest with a wide range of clinical features, from asymptomatic increase of liver enzymes to drug-induced hepatitis in different periods from the time of treatment initiation³. Prescription of lower doses (not exceeding 40 mg daily), delayed action and contribution of numerous other strong risks could diminish the magnitude of association of atorvastatin use with liver injury in our study subjects in comparisons with other two drugs.

The limitations of our study are mainly inherited from its observational design, which well comprehends feature of case-control research. Many important data, necessary for better characterization of the type and time course of liver injury were missing in medical records (e.g. liver tissue pathology and higher-performance biomarkers). Although our study includes information from several hundreds of patients it seems that the final sample size was sufficiently powered to detect only the major determinates of acute hepatic damage. Even within our analysis we noted numerous significant associations of putative risks, but the majority of them were not included in the final regression model due to presumed statistical constraints and/or clinical reasoning (e.g. confounding, collinearity). For example, it seems that the associations of factors such as smoking and high-ceiling diuretics use (almost exclusively furosemide) had been confounded with obesity and decompensated heart failure requiring escalation of drug treatment, respectively, rather than caused by their direct hepatotoxic actions³⁴.

Our finding that metformin association takes independent and protective associations suggests that it was justifiable to exclude the majority of factors with doubtful direct influence on hepatic tissue from the final regression model. There are exceptional case reports of metformin-induced hepatotoxicity in humans, but the estimated incidence is extremely low, particularly considering the widespread use of this drug^{35,36}. In fact, true mechanism of hepatic damage due to metformin is unknown and evidence from both the animal models and the clinical settings clearly demonstrated its hepatoprotective effects, too³⁷⁻⁴⁰. It seems that the inclusion of a drug with the effects of direction opposite to other factors provide the approach more realistic to clinical practice. Taking into account the abovementioned facts as well as the values of parameter estimation of the model, we consider our results accurate and clinically significant.

Conclusion

Major factors associated with acute liver injury in patients hospitalized in cardiology ward of tertiary health care institution are patient's constitutional and habitual characteristics (occasional alcohol intake, obesity, CCI total score) and drugs (amiodarone, enoxaparin, atorvastatin) with known hepatotoxic capability. Type and severity of primary cardiovascular disease or comorbid condition increased the risk for liver injury primarily in synergy with other risks, jointly acting with of each other and/or other major hazards. Future studies focusing on individual factors are justified in order to better characterize their effects in different subpopulations of patients with particular cardiac illnesses.

CONFLICT OF INTEREST

There is no conflict of interest for any author.

Acknowledgements

The authors would like to thank the Faculty of Medical Sciences of the University of Kragujevac, Kragujevac, Serbia, for supporting the research with the Junior Project JP 09-12, as well as The Ministry of Education, Science and Technological Development of the Republic of Serbia, for supporting the research with the grant N°175007.

REFERENCES

1. *Moller S, Bernardi M.* Interactions of the heart and the liver. *Eur Heart J* 2013; 34(36): 2804-11.
2. *Yu YC, Mao YM, Chen CW, Chen JJ, Chen J, Cong WM, et al.* CSH guidelines for the diagnosis and treatment of drug-induced liver injury. *Hepatol Int* 2017; 11(3): 221-41.
3. *Kullak-Ublick GA, Andrade RJ, Merz M, End P, Benesic A, Gerbes AL, et al.* Drug-induced liver injury: recent advances in diagnosis and risk assessment. *Gut* 2017; 66(6): 1154-64.
4. *Björnsson ES.* Hepatotoxicity by drugs: the most common implicated agents. *Int J Mol Sci* 2016; 17(2): 224.
5. *Hahn KJ, Morales SJ, Lewis JH.* Enoxaparin-induced liver injury: case report and review of the literature and FDA Adverse Event Reporting System (FAERS). *Drug Saf Case Rep* 2015; 2(1): 17.
6. *Kim SH, Kim SH, Lee JH, Lee BH, Yoon HJ, Shin DH, et al.* Superoxide dismutase gene (SOD1, SOD2, and SOD3) polymorphisms and antituberculosis drug-induced hepatitis. *Allergy Asthma Immunol Res* 2015; 7(1): 88-91.
7. *Cataldi A, Gonella D, Robutti N, Siri M, Buonocore S, Odetti P.* Hepatotoxicity after intravenous amiodarone. *Aging Clin Exp Res* 2008; 20(6): 593-6.
8. *Diab OA, Kamel J, Abd-Elhamid AA.* Predictors of intravenous amiodarone induced liver injury. *The Egyptian Heart Journal* 2017; 69(1): 45-54.
9. *Haque T, Sasatomi E, Hayashi PH.* Drug-induced liver injury: pattern recognition and future directions. *Gut Liver* 2016; 10(1): 27-36.
10. *Gluck N, Fried M, Porat R.* Acute amiodarone liver toxicity likely due to ischemic hepatitis. *Isr Med Assoc J* 2011; 13(12): 748-52.

11. Douros A, Bronder E, Andersohn F, Klimpel A, Thomae M, Sarganas G, et al. Drug-induced liver injury: results from the hospital-based Berlin Case-Control Surveillance Study. *Br J Clin Pharmacol* 2014; 79(6): 988-99.
12. Nyblom H, Berggren U, Balldin J, Olsson R. High AST/ALT ratio may indicate advanced alcoholic liver disease rather than heavy drinking. *Alcohol Alcoholism* 2004; 39(4): 336-339.
13. Teschke R, Wolff A, Frenzel C, Schwarzenboeck A, Schulze J, Eickhoff A. Drug and herb induced liver injury: Council for International Organizations of Medical Sciences scale for causality assessment. *World J Hepatol* 2014; 6(1): 17-32.
14. Charlson ME, Pompei P, Ales KL, MacKenzie CR. A new method of classifying prognostic comorbidity in longitudinal studies: development and validation. *J Chronic Dis* 1987; 40(5): 373-83.
15. de Abajo FJ, Montero D, Madurga M, Rodríguez LAG. Acute and clinically relevant drug-induced liver injury: a population based case-control study. *Br J Clin Pharmacol*. 2004; 58(1): 71-80.
16. Pollak PT, Shafer SL. Use of population modeling to define rational monitoring of amiodarone hepatic effects. *Clin Pharmacol Ther* 2004; 75(4): 342-51.
17. Massey LV, Juliane IB, Ritzenthaler RJ, Arteel EG. Potential role of the gut/liver/lung axis in alcohol-induced tissue pathology. *Biomolecules* 2015; 5(4): 2477-503.
18. European Association For The Study Of The Liver. EASL clinical practical guidelines: management of alcoholic liver disease. *J Hepatol* 2012; 57(2): 399-420.
19. Bertholet N, Winter MR, Cheng DM, Samet JH, Saitz R. How accurate are blood (or breath) tests for identifying self-reported heavy drinking among people with alcohol dependence?. *Alcohol Alcoholism* 2014; 49(4): 423-9.
20. Marchesini G, Moscatiello S, Di Domizio S, Forlani G. Obesity-associated liver disease. *J Clin Endocrinol Metab* 2008; 93 11 Suppl 1: 74-80.
21. Massart, J, Begriche K, Moreau C, Fromenty B. Role of nonalcoholic fatty liver disease as risk factor for drug-induced hepatotoxicity. *J Clin Transl Res* 2017; 3(1 Suppl): 212.
22. Targher G, Bertolini L, Poli F, Rodella S, Scala L, Tessari R, et al. Nonalcoholic fatty liver disease and risk of future cardiovascular events among type 2 diabetic patients. *Diabetes* 2005; 54(2): 3541-6.
23. Ioannou GN, Weiss NS, Boyko EJ, Mozaffarian D, Lee SP. Elevated serum alanine aminotransferase activity and calculated risk of coronary heart disease in the United States. *Hepatology* 2006; 43(5): 1145-51.
24. Targher G, Arcaro G. Non-alcoholic fatty liver disease and increased risk of cardiovascular disease. *Atherosclerosis* 2007; 191(2): 235-40.
25. Tapper EB, Sengupta N, Bonder A. The incidence and outcomes of ischemic hepatitis: a systematic review with meta-analysis. *Am J Med* 2015; 128(12): 1314-21.
26. Yurkovich M, Avina-Zubieta JA, Thomas J, Gorenchtein M, Lacaille D. A systematic review identifies valid comorbidity indices derived from administrative health data. *J Clin Epidemiol* 2015; 68(1): 3-14.
27. Reuben A, Koch DG, Lee WM. Drug-induced acute liver failure: results of a U.S. multicenter, prospective study. *Hepatology* 2010; 52(6): 2065-76.
28. Jaiswal P, Attar BM, Yap JE, Devani K, Jaiswal R, Wang Y, Szykarek R, Patel D, Demetria M. Acute liver failure with amiodarone infusion: A case report and systematic review. *J Clin Pharm Ther* 2018; 43(1): 129-33.
29. Lahbabi M, Aqodad N, Ibrahimi A, Lahlou M. Acute hepatitis secondary to parenteral amiodarone does not preclude subsequent oral therapy. *World J Hepatol*. 2012; 4(6): 196-8.

30. *Hahn KJ, Morales SJ, Lewis JH.* Enoxaparin-induced liver injury: case report and review of the literature and FDA Adverse Event Reporting System (FAERS). *Drug Saf Case Rep* 2015; 2(1): 17.
31. *Hui CK, Yuen MF, Ng IOL, Tsang KW, Fong GC, Lai CL.* Low molecular weight heparin-induced liver toxicity. *J Clin Pharmacol* 2001; 41(6): 691-4.
32. *Arora N, Goldhaber SZ.* Anticoagulants and transaminase elevation. *Circulation* 2006; 113(15): e698-e702.
33. *Harrill AH, Roach J, Fier I, Eaddy JS, Kurtz CL, Antoine DJ, et al.* The effects of heparins on the liver: application of mechanistic serum biomarkers in a randomized study in healthy volunteers. *Clin Pharmacol Ther* 2012; 92(2): 214-20.
34. *Wild SH, Byrne CD.* ABC of obesity: risk factors for diabetes and coronary heart disease. *BMJ* 2006; 333(7576): 1009-11.
35. *Zheng, J, Woo SL, Huu X, Botchlett, R., Chen, L., Huo, Y, et al.* Metformin and metabolic diseases: a focus on hepatic aspects. *Front Med* 2015; 9(2): 173-86.
36. *Firneisz G.* Non-alcoholic fatty liver disease and type 2 diabetes mellitus: the liver disease of our age?. *World J Gastroenterol* 2014; 20(27): 9072-89.
37. *Saeedi Saravi SS, Hasanvand A, Shahkarami K, Dehpour AR.* The protective potential of metformin against acetaminophen-induced hepatotoxicity in BALB/C mice. *Pharm Biol* 2016; 54(12): 2830-7.
38. *Ling S, Shan Q, Liu P, Feng T, Zhang X, Xiang P, et al.* Metformin ameliorates arsenic trioxide hepatotoxicity via inhibiting mitochondrial complex I. *Cell Death Dis* 2017; 8(11): e3159.
39. *Tan S, Vollmar N, Benson S, Sowa JP, Bechmann LP, Gerken G, et al.* Liver injury indicating fatty liver but not serologic NASH marker improves under metformin treatment in polycystic ovary syndrome. *Int J Endocrinol* 2015; 2015: 254169.
40. *Crowley MJ, Diamantidis CJ, McDuffie JR, Cameron CB, Stanifer JW, Mock CK, et al.* Clinical outcomes of metformin use in populations with chronic kidney disease, congestive heart failure, or chronic liver disease: a systematic review. *Ann Intern Med* 2017; 166(3): 191-200.

Table 1

1. Demographic and clinical characteristics of study patients

Variable	Case group (n=140)	Control group (n=420)	p [*]
Gender (male)	32 (22.9)	96 (22.9)	1.000 [‡]
Age (years)	64.2±11.3	64.0±10.5	0.914 [§]
Obesity	25 (17.9)	21 (5.0)	<0.001 [‡]
Fatty liver	32 (22.9)	18 (4.3)	<0.001 [‡]
Hepatomegaly	36 (25.7)	20 (4.8)	<0.001 [‡]
Heart failure	32 (22.9)	62 (14.8)	0.026 [‡]
EF <45%	12 (8.6)	12 (2.9)	0.010 [‡]
Hypertension	79 (56.4)	255 (60.7)	0.371 [‡]
Coronary heart disease	108 (77.1)	277 (66.0)	0.013 [‡]
STEMI	68 (48.6)	107 (25.5)	<0.001 [‡]
non-STEMI	21(15.0)	52 (12.4)	0.425 [‡]
unstable angina	13 (9.3)	54 (12.9)	0.260 [‡]
stable angina	4 (2.9)	36 (8.6)	0.023 [‡]
Arrhythmia	47 (33.6)	68 (16.2)	<0.001 [‡]
atrial fibrillation	39 (27.9)	54 (12.9)	<0.001 [‡]
tachycardia	4 (2.9)	7 (1.7)	0.480 [§]
extrasystole	4 (2.9)	7 (1.7)	0.480 [§]
Diabetes mellitus type 1	11 (7.9)	68 (16.2)	0.014 [‡]
Diabetes mellitus type 2	25 (17.9)	46 (11.00)	0.033 [‡]
Alcohol intake [†]	73 (52.1)	4 (1.0)	<0.001 [‡]
Smoking habit	35 (25.0)	47 (11.2)	0.001 [‡]
CCI score (points)	4.9±1.5 (5, 1-10)	3.4±1.6 (3, 1-7)	<0.001 ^{**}
CCI estimated survival (percent)	32.0±30.2 (21, 0-96)	61.0±31.1 (77, 0-96)	<0.001 ^{**}
Time to the index day [‡]	4±3 (3, 1-14)	4±5 (2, 1-44)	<0.001 ^{**}
Hospital stay (days)	8±5 (7, 2-30)	5±6 (3, 1-45)	0.001 ^{**}

number represent the mean ± standard deviation (median, range) (continuous variables), and number (percent) of patients (frequencies), as appropriate; ^{*}-probability for difference between the values of case and control group; [†]-occasionally, not satisfying exclusion criteria (regular alcohol use was exclusion criterion, see methods); CCI- Charlson Comorbidity Index [‡]-(index day-day on which novel liver injury emerged during the hospital stay); EF- ejection fraction; STEMI- myocardial infarction with ST segment elevation; nonSTEMI- myocardial infarction without STsegment elevation; [‡]-Chi-squared test, [§]-T-test, [†]-Fisher's exact test, ^{**}-Mann-Whitney U test

Table 2

Laboratory parameters in patients of study groups (case-hepatotoxicity, control-without hepatotoxicity)

Variables	All patients (n=560)	Case group (n=140)	Control group (n=420)	p [*]
Alanine transaminase (U/L)	95±226 (24, 6-2760) (560)	305±382 (221, 150-2760) (140)	25±15 (20, 6-125) (420)	n.a. [†]
Aspartate transaminase (U/L)	98±463 (23, 9-8811) (560)	303±895 (129, 16-811) (140)	29±34 (20, 9-372) (420)	n.a. [†]
Gamma-glutamyltransferase (U/L)	38±64 (22, 5-858) (312)	45±41 (29, 7-224) (131)	33±76 (20, 5-858) (181)	<0.001 [‡]
Total bilirubin (µmol/l)	15±10 (12.3, 3-83) (560)	24±15 (20, 5.7-83) (140)	12±5 (11, 3-35.5) (420)	n.a. [†]
Alkaline phosphatase (U/l)	71±85 (56.5, 3.24-1185) (306)	91±126 (62, 31-1185) (128)	57±21 (55, 3-227) (178)	<0.001 [‡]
Lactate dehydrogenase (U/L)	452±233 (419, 13-1723) (294)	464±280 (449, 55-1723) (123)	442±192 (407, 13-1228) (171)	0.728 [‡]
Creatine phosphokinase (U/L)	505±1027 (118, 8.2-8030) (386)	885±1384 (289.5, 25-8030) (136)	299±686 (103, 8-5680) (250)	<0.001 [‡]
Creatine phosphokinase-MB (U/L)	84±310 (16.3, 3.4-3869) (381)	161±497 (31, 4-3869) (135)	42±94 (14.35, 3-908) (246)	<0.001 [‡]
Amylase (U/l)	70±56 (60, 4-603) (218)	63±44 (56, 4-404) (104)	75±65 (64, 16-603) (114)	0.036 [‡]
Troponin (ng/mL)	16.1±60.9 (0.95, 0.002-797) (234)	24.2±84.7 (2.49, 0-797) (102)	9.8±31.1 (0.3, 0-242) (132)	<0.001 [‡]
Proteins (g/L)	66±8 (361)	67±7 (129)	65±8 (232)	0.006 [‡]
Albumins (g/L)	40±6 (376)	39±6 (132)	40±6 (244)	0.526 [‡]
Fibrinogen (g/L)	4.2±7.3 (3.76, 0.54-127) (294)	3.8±1.4 (3.66, 0.5-11) (116)	4.6±9.3 (3.85, 1.48-127) (178)	0.352 [‡]
International normalized ratio (INR)	1.3±0.7 (1.083, 0.9-6) (326)	1.4±0.7 (1.1, 0.9-4.9) (117)	1.3±0.7 (1.08, 0.9-6) (209)	0.344 [‡]
C-reactive protein (mg/L)	22±36 (7, 0.2-256) (367)	31±40 (12.15, 1.3-196) (130)	17±32 (5.5, 0.2-256) (237)	<0.001 [‡]
Glucose (mmol/L)	6.4±2.5 (465)	6.7±2.6 (138)	6.2±2.4 (327)	0.067 [‡]
Cholesterol (mmol/L)	4.9±1.2 (425)	5.0±1.3 (133)	4.8±1.1 (292)	0.037 [‡]
Triglycerides (mmol/L)	1.8±1.0 (1.4, 0.5-7.4) (419)	1.8±1.0 (1.52, 0.66-6) (131)	1.7±1.0 (1.3, 0.5-7.4) (288)	0.092 [‡]
Urea (mmol/L)	7.7±8.3 (6.1, 1.9-145) (415)	7.5±3.8 (7, 2.4-24.5) (139)	7.8±9.6 (6, 1.9-145) (276)	0.073 [‡]
Creatinine (µmol/L)	100±45 (417)	100±36 (139)	99±49(278)	0.880 [‡]
Leukocytes (x10 ⁹ /L)	8.6±2.5 (409)	9.4±2.4 (136)	8.3±2.5 (273)	<0.001 [‡]
Platelets (x10 ⁹ /L)	219±64 (408)	213±61 (135)	222±64 (273)	0.122 [‡]

numbers represent the mean ± standard deviation (number of patients); and median (range) [‡]-probability for

difference between the values of case and control group; [†]-n.a. not applicable (testing was not done as the values above upper normal limits during the whole study period were an exclusion criterion for the control group); [‡]-Mann-Whitney U test; [‡]-T-test

Table 3**The most used drugs in patients of study groups case-hepatotoxicity, control-without hepatotoxicity)**

Variables	Case group (n=140)	Control group (n=420)	p [*]
H ₂ receptor antagonists	32 (22.9)	40 (9.5)	<0.001 [†]
Proton pump inhibitors	96 (68.6)	174 (41.4)	<0.001 [†]
Metformin	8 (5.7)	62 (14.8)	0.005 [†]
Sulphonylureas	7 (5.0)	33 (7.9)	0.256 [†]
Enoxaparin sodium	89 (63.6)	104 (24.8)	<0.001 [†]
Clopidogrel	105 (75.0)	225 (53.6)	<0.001 [†]
Acetylsalicylic acid	124 (88.6)	326 (77.6)	0.005 [†]
Amiodarone	70 (50)	66 (15.7)	<0.001 [†]
Organic nitrates	75 (53.6)	192 (45.7)	0.107 [†]
Trimetazidine	54 (38.6)	120 (28.6)	0.027 [†]
High-ceiling diuretics	62 (44.3)	108 (25.7)	<0.001 [†]
Spirolactone	16 (11.4)	44 (10.5)	0.752 [†]
Beta blocking agents, selective	93 (66.4)	256 (61.0)	0.247 [†]
Dihydropyridine derivatives	16 (11.4)	75 (17.9)	0.074 [†]
ACE inhibitors	97 (69.3)	253 (60.2)	0.055 [†]
Atorvastatin	105 (75.0)	222 (52.9)	<0.001 [†]
Benzodiazepine derivatives	31 (22.1)	87 (20.7)	0.720 [†]
Xanthines	25 (17.9)	42 (10.0)	0.013 [†]

number represent the number (percent) of patients (frequencies); * -probability for difference between the values of case and control group; † -Chi-squared test

Table 4

Factors significantly associated with liver injury after univariable and multivariable binary logistic regression analysis

Variable	Univariate logistic regression	Multivariate logistic regression
Obesity	4.13 (2.23-7.65), <0.001	2.78 (1.15-6.71), 0.023
Coronary heart disease	1.74 (1.12-2.71), 0.014	n.a.
Arrhythmia	2.62 (1.69-4.05), <0.001	n.a.
Heart failure (EF<45%)	1.71 (1.06-2.76), 0.028	n.a.
Diabetes mellitus type 1	0.44 (0.23-0.86), 0.016	n.a.
Diabetes mellitus type 2	1.77 (1.04-3.00), 0.035	n.a.
CCI total score	1.80 (1.58-2.07), <0.001	1.89 (1.53-2.34), <0.001
Occasional alcohol intake	113.31 (40.09-320.27), <0.001	96.47 (28.95-321.43), <0.001
Smoking	2.64 (1.62-4.31), <0.001	1.92 (0.84-4.38), 0.121
H ₂ receptor antagonists	2.82 (1.69-4.70), <0.001	n.a.
Proton pump inhibitors	3.08 (2.06-4.63), <0.001	n.a.
Metformin	0.35 (0.16-0.75), 0.007	0.14 (0.04-0.51), 0.003
Enoxaparin	5.30 (3.52-7.98), <0.001	3.29 (1.79-6.05), <0.001
Clopidogrel	2.60 (1.70-3.99), <0.001	n.a.
Acetylsalicylic acid	2.24 (1.26-3.95), 0.006	n.a.
Amiodarone	5.36 (3.51-8.19), <0.001	3.70 (1.82-7.53), <0.001
Trimetazidine	1.57 (1.05-2.34), 0.027	n.a.
High-ceiling diuretics	2.30 (1.54-3.42), <0.001	1.04 (0.53-2.03), 0.916
Atorvastatin	2.68 (1.74-4.10), <0.001	2.67 (1.33-5.38), 0.006
Xanthines	1.96 (1.14-3.35), 0.014	n.a.

Number of hepatotoxic drugs 1.77 (1.41-2.21) <0.001 n.a.

numbers represent odd ratios (OR), 95% confidence interval (CI) and probability (p), respectively; n.a. – not applicable (the variable was not included in the multivariable model)

FIGURE LEGEND

Figure 1. Study flow-chart.

Received on July 2, 2018.
Revised on September 15, 2018.
Revised on October 15, 2018.
Accepted on October 16, 2018.
Online First October, 2018.

PAPER ACCEPTED

ANAMNESTIČKO - POPULACIONE KARAKTERISTIKE KARLIČNIH POROĐAJA U ŠUMADIJSKOM OKRUGU

Momčilo Đorđević¹, Gordana Đorđević², Božidar Jovanović¹ i Jovan Jovanović¹

Pod karličnom prezentacijom podrazumeva se uzdužni položaj fetusa sa prednjačecom karlicom i ona se sreće kod 3-4% svih monofetalnih porođaja. Perinatalni morbiditet i mortalitet su signifikantno veći kod karličnog porođaja nego kod onih sa prednjačecom glavom.

Osnovni cilj istraživanja bio je da se ispita povezanost anamnestičko – populacionih karakteristika karličnih porođaja i porođaja glavom.

Studijsku grupu činile su 282 porodilje koje su imale karlični porođaj i 282 ispitanice u kontrolnoj grupi koje su imale porođaj sa prednjačecom glavicom ploda i koje su porođene na GAK Kragujevac.

Uzorak populacije porodilja koje su bile predmet proučavanja ove studije formiran je iz područja Šumadijskog regiona sa centralnim mestom i najvećim gradom u regionu Kragujevcem.

Raspodele verovatnoća prema zanimanju ili obrazovanju ispitanica slične su u obema grupama. Prosečna starost ispitanica u obema grupama je 26.8 godina. Signifikantno najveći broj porodilja iz obeju grupa nalazi se u životnom dobu između 20 i 29 godina, odnosno skoro 70%.

Sa signifikantno velikom verovatnoćom tok trudnoća u obema grupama bio je uredan (85%), bez održavanja. Signifikantno je češća prisutnost pridružene bolesti, posebno hipertenzije i dijabetesa kod porodilja iz karličnih porođaja u odnosu na porodilje sa porođajem sa prednjačecom glavicom ploda. *Acta Medica Medianae* 2008;47(2):44-48.

Ključne reči: *Populaciono-anamnestičke karakteristike, karlični porođaj, pridružene bolesti*

Ginekološko-akušerska klinika u Kragujevcu¹
Institut za javno zdravlje u Kragujevcu²

Kontakt: Momčilo Đorđević
Ginekološko-akušerska klinika
Zmaj Jovina 30
34000 Kragujevac, Srbija
Tel.: 034/ 345-230

Uvod

Pod karličnom prezentacijom podrazumeva se uzdužni položaj fetusa sa prednjačecom karlicom i ona se sreće kod 3-4% svih monofetalnih porođaja. Činioci koji predisponiraju karličnu prezentaciju, sem prematuriteta jesu: relaksacija uterusa velikim paritetom, višeploidne trudnoće, polihidramnion, oligoamnion, hidrocefalus, anencefalus, anomalije uterusa i tumori. Implantacija placente u fundusnom delu uterusa udružena je u 73% slučajeva sa karličnom prezentacijom. Ova povezanost ukazuje na to da je karlična prezentacija često uslovljena prostornim problemom u uterusu i da fetus zauzima stav koji mu je najkomfortniji u zavisnosti od aktivnosti samog fetusa (1).

Perinatalni morbiditet i mortalitet su signifikantno veći kod karličnog porođaja nego kod onih sa prednjačecom glavom (2).

U svetlu podatka da je porođaj sa karličnom prezentacijom praćen povećanom stopom

perinatalnog i maternalnog mortaliteta i morbiditeta u odnosu na porođaj kod stava zatkom, takav porođaj zahteva posebno pažljiv pristup u donošenju odluke o načinu vođenja. Rezultati mnogih istraživanja pokazali su višu stopu morbiditeta i mortaliteta novorođenčadi kod vaginalnog vođenja porođaja sa karličnom prezentacijom nego kod završavanja porođaja carskim rezom. Povećan morbiditet kod ove dece je uslovljen udruženošću hipoksije i traume (3,4,5).

Cilj istraživanja

Osnovni cilj istraživanja bio je da se ispita povezanost anamnestičko – populacionih karakteristika karličnih porođaja i porođaja glavom.

Materijal i metode

U realizovanoj case - control studiji, obuhvaćene su 564 ispitanice. Sve ispitanice su sa teritorije Šumadijskog okruga i porodile su se u Klinici za ginekologiju i akušerstvo Kliničko-bolničkog centra u Kragujevcu, u periodu od 01. 01. 2000. do 31. 12. 2002. godine.

Studijsku grupu činile su 282 porodilje koje su imale karlični porođaj. Kontrolnu grupu predstavljale su takođe 282 ispitanice, koje su imale porođaj glavom. U razmatranje su uzete samo

jednoplodne trudnoće. Takođe su poštovani epidemiološki kriterijumi u izboru obima uzorka i njihovih karakteristika. Obim i struktura uzoraka iz obeju grupa napravljeni su tako da reprezentuju populaciju porodilja sa karličnim porođajem i porođajem glavom.

Ispitivani su sledeći parametri: opština stanovanja (1), mesto stanovanja (2), zanimanje (3), godine starosti (4), održavanje trudnoće (5), sadašnje bolesti porodilje (6).

Zaključivanje o validnosti razlika između pojedinih parametara i njihovih verovatnoća utvrđena je primenom odgovarajućih testova i to: Studentovog T testa, (T), χ^2 testa, Kolmogorov-Smirnov testa (D). Za nivo pouzdanosti uzeto je do 5% ili $p < 0.05$.

Rezultati istraživanja

U Tabeli 1 prikazana je raspodela ispitanica iz obeju grupa, $n=564$ prema opštini stanovanja. Treba napomenuti da se po pretpostavci istraživanja cela grupa sastoji od dve ravnopravne i jednake grupe, karličnog porođaja i porođaja sa prednjačecom glavicom ploda.

Signifikantno je najveća zastupljenost ispitanica iz obe grupe iz Kragujevca, oko 80%. Rezultat je očigledan i nije ga potrebno posebno statistički dokazivati.

Tabela 1. Distribucija ispitanica prema opštini stanovanja

Opština stanovanja	Ispitanice	
	n	%
Kragujevac	442	78.3*
Rača	20	3.6
Arandjelovac	18	3.2
Topola	20	3.6
Lapovo	8	1.4
Batočina	22	3.9
Knić	34	6.0
Ukupno	564	100.0

U Tabeli 2 prikazana je raspodela verovatnoća ispitanica po mestu stanovanja, po modalitetima: grad i selo. Većina ispitanica je iz gradske sredine. Rezultat je očigledan i nije ga potrebno posebno statistički dokazivati.

Tabela 2. Distribucija ispitanica prema mestu stanovanja

Mesto stanovanja	Ispitanice	
	n	%
Grad	456	80.9*
Selo	108	19.1
Ukupno	564	100.0

Zanimanje ispitanica je jedna od demografskih karakteristika posmatranog područja. U Tabeli 3 prikazana je raspodela verovatnoća u

ispitivanoj i kontrolnoj grupi u odnosu na zanimanje ili obrazovanje porodilja. Primenom K-S i χ^2 testa dokazuje se da su raspodele verovatnoća prema zanimanju ili obrazovanju ispitanica slične u obema grupama ($D_{iz}=0.09 < D_k=0.114$ odnosno, $\chi^2_{iz}=3.42 < \chi^2_k=5.44$ za $DF=2$). Studentov T test, na usvojenom nivou pouzdanosti, pokazuje da je sa signifikantnom i podjednako verovatnoćom najviše bilo domaćica i nezaposlenih, u obema grupama ($Stiz=0.61 < Stk=1.98$).

Tabela 3. Distribucija ispitanica prema zanimanju

Zanimanje	Karlični porođaj		Porođaj glavom	
	n	%	n	%
Domaćice	105	37.2	121	42.9
Industrijske radnice	45	16.0	35	12.4
Službenice	8	2.8	5	1.8
Visoka sprema	9	3.2	11	3.9
Nezaposlene	114	40.4	107	37.9
Studentkinje	1	0.4	3	1.1
Ukupno	282	100.0	282	100.0

nije signifikantno

Iz rezultata proizilazi zaključak da je raspodela verovatnoća ispitanica u obema grupama slična, posmatrano u odnosu na zanimanje, kao i da je najveća zastupljenost domaćica ili nezaposlenih. Ovde nije striktno definisano zanimanje domaćica, odnosno nezaposlenosti. Međutim, kako se radi o podjednakoj verovatnoći, to se obe grupe mogu smatrati jedinstvenom. Zapravo, domaćice se mogu, uslovno, smatrati nezaposlenima, jer rade samo u domaćinstvu i ne rade na drugom plaćenom poslu. Ovaj rezultat, na taj način, odslikava i situaciju u oblasti zaposlenosti žena na teritoriji Šumadijskog regiona. Zaposlenost ili obrazovanje porodilja, nije prediktor za eventualni završetak karličnog ili porođaja sa prednjačecom glavom ploda, u smislu analize u ovom radu.

Godine starosti porodilja iz obeju grupa, mogu imati određenog uticaja na povećanu verovatnoću pojave karličnog, odnosno porođaja sa prednjačecom glavicom. Usporedna analiza verovatnoća zastupljenosti određene starosne dobi ispitanica prikazana je u Tabeli 4.

Tabela 4. Distribucija ispitanica prema uzrastu

Godine starosti	Karlični porođaj		Porođaj glavom	
	n	%	n	%
<19	13	4.6	14	5.0
20-24	91	32.3	87	30.8
25-29	106	37.6	106	37.6
30-34	44	15.6	45	16.0
35-39	21	7.4	20	7.1
40>	7	2.5	10	3.5
Ukupno	282	100.0	282	100.0

nije signifikantno

Prosečna starost ispitanica u obema grupama je $X_{sv}=26.8$ godina sa $SD=5.6$ za grupu karličnih porođaja, odnosno $SD=5.4$ za grupu porođenih glavom. Studentov T test pokazuje da su u proseku porođilje iz obeju grupa približno slične starosne dobi. K-S i χ^2 test pokazuju da su i raspodele verovatnoće po klasama starosne dobi slične ($D_{iz}=0.01 < D_k = 0.1145$ odnosno, $\chi^2_{iz}=0.064 < \chi^2 = 5.999$ za $DF=2$). Takođe je dokazano da se signifikantno najveći broj porođilja iz obeju grupa nalazi u životnom dobu između 20 i 29 godina, odnosno skoro 70%.

Iz navedene analize može se izvesti zaključak da su ispitanice iz obeju grupa slične starosne dobi pa, prema tome, godine starosti nisu prediktor za opredeljenje kako će se porođaj završiti, karlično ili glavom.

Po pretpostavci istraživanja toka trudnoće, odnosno potrebe za većim nadzorom u trudnoći, popularnije rečeno - održavanje trudnoće, može imati određenog uticaja na način završetka porođaja. Podaci o održavanju trudnoće mogu biti od epidemiološkog značaja za procenu verovatnoće normalnih tokova trudnoće u nekoj populaciji, a time na izvestan način, saznanje o zdravstvenom stanju populacije trudnica. Ukoliko je signifikantno velika verovatnoća normalnih tokova trudnoće, to je jedan pokazatelj povoljne zdravstvene situacije trudnica u ispitivanoj populaciji. Pod pojmom održavanje trudnoće, u ovom istraživanju se podrazumeva mirovanje u krevetu u intervalu dužem od mesec dana. U Tabeli 5 prikazana je uporedna distribucija porođilja iz ispitivane i kontrolne grupe, po pitanju održavanja trudnoća.

Tabela 5. Distribucija ispitanica prema održavanju trudnoće

Održavana trudnoća	Karlični porođaj		Porođaj glavom	
	n	%	n	%
Da	38	13.5	44	15.6
Ne	244	86.5	238	84.4
Ukupno	282	100.0	282	100.0

Iz podataka se zaključuje da je sa signifikantno velikom verovatnoćom tok trudnoća u obema grupama bio uredan (85%), dok je verovatnoća održavanja trudnoće oko 15% i u granicama je događanja u opštoj populaciji trudnica, bez obzira kako je ta trudnoća završena. Sa posmatranog aspekta, ispitivane grupe su slične među sobom. Rezultat je očigledan i nije ga potrebno posebno statistički dokazivati.

Sledi zaključak da sam tok trudnoće, odnosno da li je trudnoća održavana ili nije - nije imalo uticaja na povećanu verovatnoću završetka karličnog porođaja. Ovde treba napomenuti i epidemiološki aspekt ovog rezultata, a to je da su u šumadijskom regionu, sa signifikantno značajnom verovatnoćom trudnoće uredne, odnosno normalno teku i ne zahtevaju poseban nadzor u smislu održavanja.

Saznanje o sadašnjoj bolesti porođilje skreće pažnju lekara na tretman koji treba da spro-

vede tokom trudnoće pa i procenu na verovatni način završetka porođaja. U Tabeli 6 i prikazana je distribucija verovatnoća pridružene bolesti kod porođilja iz ispitivane i kontrolne grupe. Primenom K-S i χ^2 testa dokazuje se, na usvojenom nivou pouzdanosti $p < 0.05$ da postoji signifikantna razlika između pomenutih raspodela verovatnoća ($D_{iz}=0.1147 > D_k = 0.1145$, $\chi^2_{iz}=7.599 > \chi^2 = 5.999$, za $DF = 2$). Ta razlika je uslovljena signifikantno većom verovatnoćom sadašnje bolesti, a pre svega hipertenzije i dijabetesa u ispitivanoj grupi u odnosu na kontrolnu, 17.7% u odnosu na 6.1% ($T_{iz}=4.11 > T_k=1.97$). Ovde treba napomenuti da se u obema grupama sa signifikantno velikom verovatnoćom radi o zdravim trudnicama u odnosu na bolesti date u Tabeli 6 (82- 94%).

Tabela 6. Raspodela ispitanica prema prisustvu sadašnje bolesti

Sadašnje bolesti	Karlični porođaj		Porođaj glavom	
	n	%	n	%
Hipertenzija	18	6.3	4	1.4
Bol. srca i krv. sudova	7	2.5	4	1.4
Bol. urinarnog trakta	2	0.7	3	1.1
Diabetes mellitus	21	7.4	4	1.4
Bol. štitaste žlezde	1	0.4	1	0.4
Infektivne bolesti	1	0.4	1	0.4
Bez bolesti	232	82.3	265	93.9
Ukupno	282	100.0	282	100.0

signifikantno

Rezultati ukazuju na to da, ukoliko porođilja boluje od hipertenzije i dijabetesa, postoji značajna verovatnoća za završetak porođaja u karličnoj prezentaciji. Znači da ove bolesti, u određenoj meri ometaju prirodno postavljanje fetusa u položaj za normalno završavanje porođaja ili utiču na trajanje i tok trudnoće.

Diskusija

Uzorak populacije porođilja koje su bile predmet proučavanja ove studije formiran je iz područja šumadijskog regiona sa centralnim mestom i najvećim gradom u regionu Kragujevcem. Ostala, pretežno manja gradska i seoska mesta iz okruženja zastupljena su u znatno manjem procentu. Najveća verovatnoća porođaja iz obe ispitivane grupe (karličnih ili porođaja glavom) bila je iz gradske sredine - prvenstveno iz Kragujevca, a iz ostalih mesta znatno manje (oko 80% iz Kragujevca, odnosno iz gradske sredine).

Dalja demografska struktura pokazuje da su porođilje iz ispitivanog uzorka po zanimanju najčešće domaćice ili nezaposlene osobe u oko 80% slučajeva. Te dve grupe ispitanica mogu se smatrati jedinstvenom grupom. Ovaj rezultat oslikava strukturu zaposlenosti šumadijskog okruga.

Zaposlenost kao demografska kategorija i epidemiološki pokazatelj u populaciji porođilja uopšte, a posebno sa aspekta karličnog porođaja,

neosporno je u direktnoj vezi i sa godinama starosti ispitanica. Naime, kako pokazuje ova studija, porodilje iz obe ispitivane grupe sa značajnom verovatnoćom bile su u starosnoj grupi 20-24 i 25-29 godina (pripadnost ovim intervalima godišta, u obe ispitivane grupe, iznosi približno oko 70%).

U poređenju sa rezultatima drugih istraživanja nailazi se na podudarnosti ali i odstupanja u onim regionima gde su ispitanice iz većih gradskih centara, pa i u poređenju sa Beogradom, kao glavnim gradom. Udružena analiza pokazuje da to ima veze sa prethodno konstatovanim činjenicom i zanimanjem ili obrazovanjem porodilja. Struktura ženske populacije po zanimanju pokazuje znatno veću verovatnoću zaposlenih žena i viši nivo obrazovanja u većim centrima, što posredno pokazuje povećanje procenta porođaja ka starijim godištim (studiranje, prvo zaposlenje, karijera...).

Najpovoljniji period za rađanje je od 20-30. godine, što se tiče zdravlja žene i novorođenčadi, pa se sa tog stanovišta Šumadijski region, na osnovu dobijene starosne strukture porodilja, može smatrati povoljnom sredinom.

Istraživanje autora iz Kliničkog centra Novi Sad pokazuje da je učestalost karličnih prezentacija sa ovog područja bila najviša u starosnoj dobi 20-29 godina, a da se porođaj sa najvećom verovatnoćom završavao vaginalno u starosnom intervalu 20-26. godine, dok je iznad ovih godina abdominalni put završavanja porođaja bio češći (6,7).

Parametar starosne dobi mogao se isključiti iz dalje statističke analize, što je proizašlo iz činjenice da se ispitivane grupe po raspodeli godina starosti nisu statistički razlikovale.

U našoj kliničko epidimiološkoj studiji nije utvrđena značajna verovatnoća potrebe za održavanjem trudnoće u ispitivanom uzorku, bez obzira

na prezentaciju ploda na rođenju. U vrlo visokom procentu (karlična prezentacija -86% i prezentacija glavom -84%) u ispitivanim grupama, nije bilo održavanja trudnoće u smislu posebnog nadzora ili potrebe za mirovanjem dužem od jednog meseca. Ta činjenica ukazuje da je tok trudnoće bio uredan i bez komplikacija, sa najvećom verovatnoćom.

Čitav spektar oboljenja i stanja ploda, ali i trudnice, praćen je povećanom učestalošću karlične prezentacije u odnosu na opštu populaciju. Faktori rizika koji potiču od strane porodilje, pored godina starosti porodilje, vezani su za oboljenje trudnice. Pre svih, pokazano je u ovoj studiji, nalaze se oboljenja hipertenzija i diabetes mellitus koji, po nalazima i drugih autora, mogu da prouzrokuju prematuritet novorođenčadi i karličnu prezentaciju (8,9,10,11) i upute na potrebu adekvatnog postpartalnog nadzora ove dece (12).

Zaključci

Signifikantno je najveća zastupljenost ispitanica iz obe grupe iz Kragujevca, oko 80%. Većina ispitanica je iz gradske sredine. Raspodele verovatnoća prema zanimanju ili obrazovanju ispitanica slične su u obema grupama. Prosečna starost ispitanica u obema grupama je 26.8 godina. Signifikantno najveći broj porodilja iz obeju grupa nalazi se u životnom dobu između 20 i 29 godina, odnosno skoro 70%.

Sa značajnom velikom verovatnoćom tok trudnoća u obema grupama bio uredan (85%), bez održavanja. Signifikantno je češća prisutnost sadašnje bolesti, posebno hipertenzije i dijabetesa kod porodilja iz karličnih porođaja u odnosu na porodilje sa porođajem sa prednjačecom glavicom ploda.

Literatura

- Green J et al. Has an increased cesarean section rate for term breech delivery reduced the incidence of birth asphyxia, trauma, and death? *Am J Obstet Gynecol* 1982;142:643-5.
- Ballas S, Toaff R: Hyperextension of the fetal head in breech presentation: radiological evaluation and significance. *Br J Obstet Gynaecol* 1976;83(3):201-4.
- Bilodeau R and Marier R: Breech presentation at term, *Am J Obstet Gynecol* 1978;130:555-6.
- Hannah ME. Term Breech Trial. Study Protocol. Unpublished 1997.
- Colle JV et al. The randomized management of term frank breech presentation: Vaginal delivery vs. cesarean section, *Am J Obstet Gynecol* 131:186, 1978.
- Sekulic S, Vuleta P, Mihaljev-Martinov J. Prilog proučavanju etiologije zatkom, ZBORNIK RADOVA XIII Kongres ginekologa i opstetričara Jugoslavije, Klinički centar Novi Sad, 2001;291-2.
- Vuleta P. Način završavanja porođaja kod karlične prezentacije, ZBORNIK RADOVA XIII Kongres ginekologa i opstetričara Jugoslavije Klinički centar Novi Sad, 2001;20-9.
- Bilodeau R, Marier R: Breech presentation at term, *Am J Obstet Gynecol* 1978;130:555-6.
- Bird CC, McElin TW: A 6-year prospective study of term breech deliveries utilizing the Zatuchni-Andros Prognostic Scoring Index. *Am J Obstet Gynecol* 1975;121:551-3.
- Gimovsky ML et al. Neonatal performance of the selected term vaginal breech delivery, *Obstet Gynecol* 1980;56:687-9.
- Hannah ME, Hannah WJ, Hewson SA, et al. Planned caesarean section versus planned vaginal birth for breech presentation at term: a randomised multicentre trial. *Term Breech Trial Collaborative Group. Lancet* 2000;356(9239):1375-83.
- Đorđević M, Đorđević G, Jovanović B, Pantović V. Stanje ploda na rođenju i antropometrijske mere u baby friendly programu. *Acta Medica Medianae* 2008;47(1):37-40.

ANAMNESTIC AND POPULATION CHARACTERISTICS OF THE BREECH DELIVERIES IN SUMADIJA REGION

Momcilo Djordjevic, Gordana Djordjevic, Bozidar Jovanovic and Jovan Jovanovic

Breech presentation implies vertical position of the fetus, accounting for 3-4% of all monofetal deliveries. Perinatal morbidity and mortality are significantly higher in breech deliveries than in head presentation deliveries.

The aim of the investigation was to examine the association between the anamnestic and population characteristics of the breech deliveries and the same characteristics in the head deliveries.

Study group included 282 mothers who had breech deliveries and 282 mothers in control group who had head presentation deliveries. All the babies were delivered at the Clinic of Obstetrics and Gynecology Kragujevac.

The population sample - the subject of the study encompassed mothers from Sumadija region with the center in Kragujevac as the capital and biggest city in the region.

Distribution of probabilities according to profession or education of mothers was similar in both groups. The mean age of the mothers in both groups was 26.8 years. Significantly, the largest number of mothers from both groups was between 20 and 29 years of age, e.g. 70 %.

With significantly high probability, the pregnancy progression in both groups was positive (85%), without maintaining pregnancy. The presence of associated disease was significantly higher, especially hypertension and diabetes in mothers who had breech deliveries compared to mothers who had head presentation deliveries. *Acta Medica Medianae 2008;47(2):44-48.*

Key words: *population and anamnestic characteristics, breech delivery, associated diseases*

ANTHROPOMETRIC STUDY OF THE FACIAL INDEX IN THE POPULATION OF CENTRAL SERBIA

D. JEREMIĆ¹, SANJA KOCIĆ², MAJA VULOVIĆ¹, MAJA SAZDANOVIĆ³, P. SAZDANOVIĆ¹,
B. JOVANOVIĆ⁴, J. JOVANOVIĆ⁴, Z. MILANOVIĆ⁵, NELA ĐONOVIĆ²,
ALEKSANDRA SIMOVIĆ⁶, KATARINA PAREZANOVIĆ-ILIC⁴, A. MALIKOVIĆ⁷, J. TOŠEVSKI¹ and
IVANA ŽIVANOVIĆ-MAČUŽIĆ¹

¹ *Department of Anatomy and Forensic Medicine, Faculty of Medical Sciences, University of Kragujevac, 34000 Kragujevac, Serbia*

² *Institute for Public Health, University of Kragujevac, 34000 Kragujevac, Serbia*

³ *Department of Histology, Faculty of Medical Sciences, University of Kragujevac, 34000 Kragujevac, Serbia*

⁴ *Clinical Center Kragujevac, 34000 Kragujevac, Serbia*

⁵ *Faculty of Sport and Physical Education, University of Niš, 18000 Niš, Serbia*

⁶ *Pediatric Clinic, Clinical Center, 34000 Kragujevac, Serbia*

⁷ *Department of Anatomy, Faculty of Medicine, University of Belgrade, 11000 Beograd, Serbia*

Abstract - The aim of this study was to determine the craniofacial parameters in the population of the central part of Serbia. The research was conducted on 700 persons (360 males and 340 females), aged 18-65 years, selected randomly. The measured parameters were morphological facial height and breadth. The standard spreading caliper with scale was used for the measurement of facial parameters. There were significant differences in the facial parameters of male compared to female subjects in all observed parameters. The mean value of the morphological facial height in the study population was 116.8 mm \pm 7.28, maximum facial breadth 124.12 mm \pm 8.44, while the mean value of the total facial index was 93.68 \pm 6.86. The total facial index was calculated according to the formula and the obtained results were analyzed statistically using the t-test. The dominant phenotype in the studied population was leptoprosopic. The data obtained in our study may be useful in anthropological research, forensics, genetic research, as well as in medical clinical practice.

Key words: Anthropometry, facial height, facial breadth, facial index, facial phenotype

INTRODUCTION

Craniofacial anthropometry, as an important part of anthropology and medicine, is used for the determination of the morphological characteristics of the head and face. Face shape depends on many factors, such as gender, race and ethnicity, climate, socio-economic, nutritional, and genetic factors. The determination of facial parameters is of great importance for the evaluation of facial trauma, congenital

and traumatic deformities and easier identification of certain congenital malformations (Oladipo et al., 2008a; Oladipo et al., 2008b; Oladipo et al. 2009a). The collected data can be used in anthropology and forensic medicine for identification of racial and sexual differences as well as in reconstructive surgery for facial reconstruction.

Types of faces, as determined by craniofacial measurements, were divided into five international

anatomical categories: hypereuryprosopic, euryprosopic, mesoprosopic, leptoprosopic and hyperleptoprosopic (Martin and Saller, 1957).

The aim of this study was to determine the craniofacial parameters in the population of the central part of Serbia and to compare them with the those determined in earlier studies in different populations, which is important for anthropological research, research in forensic medicine and clinical practice (reconstructive surgery).

MATERIALS AND METHODS

This study was conducted on 700 persons (360 males and 340 females), aged 18-65 years, that were randomly selected. Measurements were performed at the Institute of Anatomy, Faculty of Medical Science, University of Kragujevac, as well as at the Center for Rehabilitation Medicine of the company "Zavodi Crvena Zastava", from 2001-2006. All subjects were without past and existing craniofacial trauma, deformities or facial scars. The measurement process was explained to each subject and written permission was obtained from each tested person before the measurement.

All measurements were performed in the same way and under the same conditions. The subjects were in a sitting position, relaxed, with the head in the correct anatomical position (neutral position of the head). Measurements were performed during the period from 14.00-16.30 to eliminate discrepancies in relation to diurnal variation. All measurements were repeated three times and the mean value of the measurements was taken for further analysis. The measurements were made with a permissible error of 1 mm.

A standard spreading caliper with scale was used for the measurement of facial parameters. The statistical significance of sex differences in mean values of the measured parameters was examined by using an independent t-test.

Landmark points used in measuring of the parameters were: n – nasion: the midpoint of the nasofrontal suture; gn – gnation: in the midline, the lowest point on the lower border of the chin; zy - zygomatic prominences, zygion: the most lateral point on the zygomatic arch.

Morphological facial height (MHF) is the distance between nasion and gnation (n-gn). It was measured by standard caliper with scale as follows: the fixed tip of the caliper was placed at the subject's gnation and the movable part was moved and placed on the nasion.

The maximum width of face or maximum facial breadth (MFB) is the distance between the two zygomatic prominences (zy-zy). It was measured by standard caliper with a scale in the following way: after palpation (by fingers) to locate the most lateral point of the zygomatic arch (*arcus zygomaticus*) on the both sides of the face, the ends of spreading caliper were placed at these points, with enough pressure to feel the bone under the caliper. The caliper was slightly shifted in the direction of up and down and back and forth, until the maximum value was shown.

Total facial index (TFI) is the ratio of morphological facial height (obtained by measuring the distance from n to gn) and maximum facial breadth (the distance between two zygomatic prominences – from zy to zy) and can be calculated according to the formula:

$$TFI = (n-gn / zy-zy) \times 100$$

The values of TFI were used to determine the incidence of certain facial types (according to Martin-Saller's scale). Based on the total facial index (TFI), the facial phenotype was classified as: hypereuryprosopic ($TFI \leq 78,9$), euryprosopic ($79,0 < TFI < 83,9$), mesoprosopic ($84,0 < TFI < 87,9$), leptoprosopic ($88,0 < TFI < 92,9$) and hyperleptoprosopic ($TFI \geq 93,0$) (Martin and Saller, 1957).

Table 1. The craniofacial parameters in studied populations

Parameter	Male	Female	Total-both gender	p value
MHF (mm±SD)	121.42±5.79	110.84±5.61	116.28±7.28	<0.001*
MFB (mm±SD)	129.12±8.86	119.98±6.38	124.12±8.44	<0.001*
TFI	94.04±7.00	92.38±6.72	93.68±6.86	<0.001*

* Statistically significant difference

MHF (morphological facial height), MFB (maximal facial breadth) and TFI (total facial index)

Table 2. The frequency of facial phenotype, according to the value of total facial index, in studied population

Facial phenotype	Male	Female	Total-both gender	p value
hypereuryprosopic	(0)	(0)	(0)	-
euryprosopic	(0)	(0)	(0)	-
mesoprosopic	17.78% (64)	10.59% (36)	14.29% (100)	<0.001*
leptoprosopic	76.67% (276)	87.06% (296)	81.71% (572)	<0.001*
hyperleptoprosopic	5.56% (20)	2.35% (8)	4.00% (28)	<0.001*

* Statistically significant difference

RESULTS

The conducted research provides important new information concerning the total facial index, face shape, and facial phenotype in the adult population of central Serbia. The mean values of the morphological facial height, facial breadth and total facial index in males were, respectively, 121.42 mm ± 5.79, 129.12 mm ± 8.86, 94.04 ± 7.00, while the following values of parameters were obtained in females, respectively: 110.84 mm ± 5.61, 119.98 mm ± 6.38, 92.38 ± 6.72 (Table 1). It has been shown that males in the studied population of the central part of Serbia have significantly higher values of morphological facial height, the facial breadth and total facial index, compared to the tested females ($p < 0.001$).

The dominant type of face phenotype in the studied population, according to the value of total facial index, was leptoprosopic with an incidence of 81.71% (76.66% males and 87.05% females), which was followed by mesoprosopic with an incidence of 14.28% (17.77% males and 10.58% females) (Table 2,

Fig. 1) and hyperleptoprosopic with a frequency of 4.00% (5.55% males and 2.35% females). In the study population of both sex, face shape corresponding phenotypes designated as hypereuryprosopic and euryprosopic were not observed (0%).

The phenotype of face, leptoprosopic, dominant in both sexes, has a higher incidence in females compared to males, while mesoprosopic and hyperleptoprosopic are more common in male subjects compared to females (Table 2, Fig. 1).

DISCUSSION

Earlier studies have indicated racial and ethnic differences in the mean value of total facial index in different populations of people. The mean value of the total facial index observed in this study was higher than the those observed in the population of central Croatia – TFI value of 80.08, southern Dalmatia (Croatia) – TFI value of 93.37 (Radović et al., 2000), the population of Croatia – TFI value of 63.07, the population of Syria – TFI value of 83.12 (Grbeša et al.,

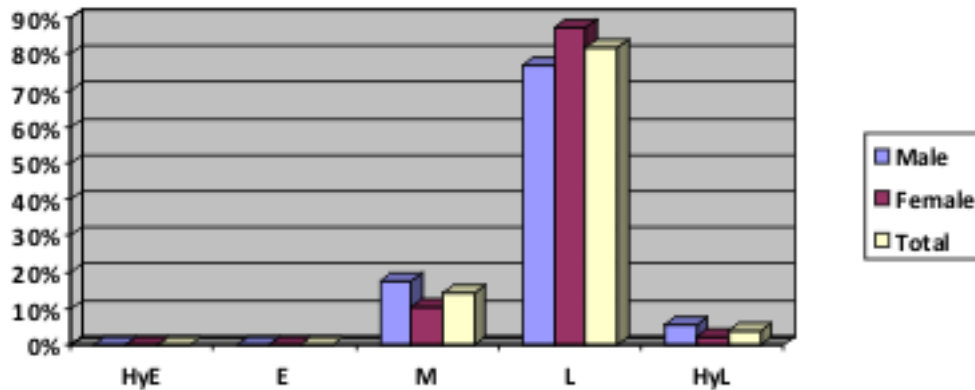


Fig. 1. The frequency of facial phenotype of both genders in studied population

2007). TFI values obtained in our study were higher in both males and females than the values obtained in the following populations: the Onge population of India (Indian Onges), 77.98 male, 75.29 female (Ashok, 2006), the population of Malaysia, 85.72 males, 87.71 females (Shetti et al., 2011), the population of India, 87.19 males, 86.75 females (Shetti et al., 2011), Japanese adult females 82.66 (Hossain et al., 2011), the Far ethnic group of Iran (Iranian Fars): 88,22 males, 84.48 females; Turkman ethnic group of Iran (Iranian Turkman), 87.25 males, 81.48 females (Jahanshahi et al., 2008).

In the present study, the mean value of the total facial index of both genders was higher than those obtained in a similar study conducted among adult Hungarians in Vojvodina (Serbia) in which the mean total facial index was 87.9, and the phenotype of highest incidence was mesoprosopic (Pavlica et al., 2004). In our research, according to the value of the total facial index, the most common facial phenotype was leptoprosopic, which is consistent with the research results of Pavlica et al. conducted among Montenegrins in Vojvodina (Serbia) (Pavlica et al., 2007).

Nagle and associates (Nagle et al., 2005) conducted a study in which craniofacial measurements were taken in female and male populations of Lithuania. In their study, the mean value of the morphologi-

cal facial height of male subjects was $12.48 \text{ cm} \pm 0.5$, which was higher compared to our study (Table 1). Also, the mean value of maximum facial breadth of Latvian females was $11.8 \text{ cm} \pm 0.65$, which was higher compared to the one obtained in our study (Table 1).

The study conducted in the Turkman ethnic group of northern Iran showed that the dominant facial phenotype in males was mesoprosopic (38.4%), and for females, euryprosopic (51.7%). For the Far ethnic group of northern Iran it was shown that the dominant facial phenotype in males was mesoprosopic (44%), and euryprosopic (37.7%) for females (Jahanshahi et al., 2008).

Pavlica et al. (2006), in their study of anthropometric characteristics of the head and face conducted among adult populations of northwest Bačka (Serbs, Montenegrins, Hungarians) concluded that the presence of euryprosopic, mesoprosopic and leptoprosopic facial phenotypes was equal in this population. A survey of the anthropological characteristics of adult Poles living in northern Banat (Yugoslavia, Serbia), showed that in this population the most common shape of face was the euryprosopic phenotype (Bozić-Krstić et al., 1997).

Morphological facial height values obtained in our study ($121.42 \text{ mm} \pm 5.79$ for males and 110.84

mm \pm 5.61 in females) were lower than the values obtained after anthropometric research in the population of northeastern part of Nigeria (141.15 mm \pm 7.5 in males and 141.29 mm \pm 7.6 in females) (Maina et al., 2011), the population of India (130.02 mm \pm 7.2 in males and 125.4 mm \pm 6.0 in females), and the population of Sri Lanka (140.2 mm \pm 10.3 in males and 138.8 mm \pm 12.9 in females) (Gohiya et al., 2010; Ilayperuma, 2011).

The mean value of morphological facial height in adult Egyptian males (121.1 mm \pm 0.41) was lower than that in our study (121.42 mm \pm 5.79), while the same parameter values in female subjects were higher in the Egyptian population (111.5 mm \pm 0.68) compared to those obtained in our study (110.84 mm \pm 5.61) (Muhammad and Haze, 2011).

The mean value of morphological facial height observed in our study (116.28 mm \pm 7.28) was lower than the value obtained in the study of anthropometric characteristics of the population of Lithuania (120.8 mm) (Nagle et al., 2005), the Caucasian population (the white race) (120.9 mm) (Farkas et al., 1989), Brazilian Indians (125.7 mm) (Niswander et al., 1967), as well as the Nigerian population (120.2 mm) (Didia and Dapper, 2005).

The mean morphological facial height observed in our study (116.28 mm \pm 7.28) was higher than the value obtained in a survey conducted among West Africans (108.4 mm) (Herskovits, 1937).

After conducting the research, it was concluded that the dominant facial phenotype in the population of the central part of Serbia is leptoprosopic. The data obtained in our study may be useful in anthropological research, forensics, genetic research, as well as in medical clinical practice (reconstructive surgery).

REFERENCES

- Ashok, K.P. (2006). Cephalo-facial variation among Onges. *Anthropologist* **28** (4), 245-249.
- Božić-Krstić, V., Radovanović, Đ., Rakić, R., Pavlica, T., and M. Savić (1997). Some anthropological characteristics of adult Poles inhabiting a north of Yugoslav Banat. *Glasnik Antropološkog društva Jugoslavije* **33**, 203-207.
- Didia, B.C., and D.V. Dapper (2005). Facial, nasal, maxillary, mandibular and oro-facial heights of adult Nigerians. *J. Orien. Med.* **17**, 1 - 8.
- Farkas, L.G., Hreczko, T.A., Kolar, J.C., and I.R. Munro (1989). Vertical and horizontal proportions of the face in adult North American Caucasians: revision of neoclassical canons. *Plast. Reconstr. Surg.* **75**, 328 - 338.
- Gohiya, V.K., Shrivatava, S., and S. Gohiya (2010). Estimation of cranial capacity in 20-25 year old population of Madhya Pradesh a State of India. *Int. J. Morphol.* **28** (4), 1211-1214.
- Grbeša, Đ., Pezerović-Panijan, R., Kalaya, M.N., Goršić, I., Čavčić, A., Žura, N., and B. Berberović (2007). Craniofacial characteristics of Croatian and Syrian populations. *Coll. Antropol.* **31** (4), 1121-1125.
- Herskovits, M.J. (1937). Physical types of West African Negroes. *Hum. Biol.* **9**, 483.
- Hossain, M.G., Saw, A., Ohtsuki, F., Lestrel, P.E., and T. Kamarul (2011). Change in facial shape in two cohorts of Japanese adult female students twenty years apart. *Singapore Med. J.* **52** (11), 818-823.
- Ilayperuma, I. (2011). Evaluation of cephalic indices: a clue for racial and sex diversity. *Int. J. Morphol.* **29** (1), 112-117.
- Jahanshahi, M., Golalipour, M.J., and K. Heidari (2008). The effect of ethnicity on facial anthropometry in Northern Iran. *Singapore Med.* **49**(11), 940-3.
- Maina, M.B., Shapu, Y.C., Garba, S.H., Muhammad, M.A., Garba, A.M., Yaro, A.U., and O.N. Omoniyi (2011). Assessments of cranial capacities in a North-Eastern adult Nigerian population. *Journal of Applied Sciences* **11**, 2662-2665.
- Martin, R., and K. Saller (1957). *Lehrbuch der anthropologie*. Gustav Fischer Verlag, Stuttgart
- Muhammad, H., and A.S. Hazem (2011). Vertical facial dimensions and indices in adult upper Egyptians. *Journal of American Science* **7** (10), 785-791.
- Nagle, E., Teibe, U., and D. Kapoka (2005). Craniofacial anthropometry in a group of healthy Latvian residents. *Acta Med. Lituanica* **12** (1), 47-53.
- Niswander, J.D., Keiter, F., and J.V. Neel (1967). Further studies on the Xavante Indians. Some anthropometric, dermatoglyphic and non quantitative morphological traits of the Xavantes of Simoes Lopes. *Amer. J. Hum. Genet.* **19**, 490-501.
- Oladipo, G.S., Didia, B.C., Okoh, P.D., and J.S. Hart (2008a). Sexual dimorphism in facial dimensions of adult Ijaw. *J. Expt. and Clin. Anat.* **7** (2), 10-14.

- Oladipo, G.S., Fawehinmi, H.B., and P.D. Okoh (2009a). Canthal indices of Urhobo and Itsekiri ethnic groups. *Australian Journal of Basic and Applied Sciences* **3** (4), 3093-3096.
- Oladipo, G.S., Olotu, E., and I.U. Guinireama (2008b). Anthropometric comparison of canthal indices between the Ijaw and Igbo tribes. *Scientia Africana* **7** (1), 141-144.
- Pavlica, T., Božić-Krstić, V., and R. Rakić (2004). Anthropological characteristics of adult Hungarians in Vojvodina. *Glasnik Antropološkog Društva Jugoslavije* **39**, 123-130.
- Pavlica, T., Božić-Krstić, V., and R. Rakić (2006). Some anthropometric characteristics of head and face in adult population of northwest Bačka. *Glasnik Antropološkog društva Jugoslavije* **41**, 45-55.
- Pavlica, T., Božić-Krstić, V., and R. Rakić (2007). Anthropological characteristics of Montenegrins living in Vojvodina. *Glasnik Antropološkog društva Jugoslavije* **42**, 167-177.
- Radović, Z., Muretić, Ž., Nemirovskij, V., and V. Gaži-Čoklica (2000). Craniofacial variations in a south Dalmatian population. *Acta Stomat. Croat.*, 399-403.
- Shetti, V.R., Pai, S.R., Sneha, G.K., Gupta, C., Chethan, P., and Soumya (2011). Study of prosopic (facial) index of Indian and Malaysian students. *Int. J. Morphol.* **29** (3), 1018-1021.

MDCT ANGIOGRAPHY OF ANATOMICAL VARIATIONS OF THE CELIAC TRUNK AND SUPERIOR MESENTERIC ARTERY

NEDA OGNJANOVIĆ¹, D. JEREMIĆ¹, IVANA ŽIVANOVIĆ-MAČUŽIĆ¹, MAJA SAZDANOVIĆ², P. SAZDANOVIĆ¹, IRENA TANASKOVIĆ², J. JOVANOVIĆ³, R. POPOVIĆ⁴, R. VOJINOVIĆ³, B. MILOŠEVIĆ³, M. MILOSAVLJEVIĆ³, D. STOJADINOVIĆ¹, J. TOŠEVSKI¹ and MAJA VULOVIĆ¹

¹ *Department of Anatomy and Forensic Medicine, Faculty of Medical Sciences, University of Kragujevac, 34000 Kragujevac, Serbia*

² *Department of Histology, Faculty of Medical Sciences, University of Kragujevac, 34000 Kragujevac, Serbia*

³ *Clinical Center Kragujevac, 34000 Kragujevac, Serbia*

⁴ *Clinical Center Ostrog, 11000 Belgrade, Serbia*

Abstract - The aim of this study was to detect and describe the existence and incidence of anatomical variations of the celiac trunk and superior mesenteric artery. The study was conducted on 150 persons, who underwent abdominal Multi-Detector Computer Tomography (MDCT) angiography, from April 2010 until November 2012. CT images were obtained with a 64-row MDCT scanner in order to analyze the vascular anatomy and anatomical variations of the celiac trunk and superior mesenteric artery. In our study, we found that 78% of patients have a classic anatomy of the celiac trunk and superior mesenteric artery. The most frequent variation was the origin of the common hepatic artery from the superior mesenteric artery (10%). The next variation, according to frequency, was the origin of the left gastric artery direct from the abdominal aorta (4%). The arc of Buhler as an anastomosis between the celiac trunk and superior mesenteric artery, was detected in 3% of cases, as was the presence of a common trunk of the celiac trunk and superior mesenteric artery (in 3% of cases). Separate origin of the splenic artery and the common hepatic artery was present in 2% of patients. The MDCT scanner gives us an insight into normal anatomy and variations of the abdominal blood vessels, which is very important in the planning of surgical interventions, especially transplantation, as well as in the prevention of complications due to ischemia.

Key words: Angiography, variation, celiac trunk, superior mesenteric artery

INTRODUCTION

The celiac trunk and the superior mesenteric artery are accepted as the most important ventral visceral branches of the abdominal aorta with regard to their vascularization field (Cicekcibasi et al., 2005). The celiac trunk, as a first ventral visceral branch of ab-

dominal aorta, divides into three branches: the left gastric artery, the common hepatic artery and the splenic artery (Van Damme and Bonte, 1990; Oran et al., 2001; Cicekcibasi et al., 2005; Chen et al., 2009). This trifurcation of the celiac trunk has been considered as the normal vascular anatomy for many years (Van Damme and Bonte, 1990; Oran et al., 2001).

The superior mesenteric artery supplies the pancreas and intestine from the lower part of the duodenum through 2/3 of transverse colon.

Vascular aberrations and anatomical variations of the celiac trunk and the superior mesenteric artery are not infrequent and have been described in many earlier studies. These vascular variations are due to unusual embryological development of the ventral splanchnic branches of aorta (Cavdar, 1997; Oran et al., 2001; Chitra 2009). Some of the described variants of the celiac trunk are: 1) the presence of only two of three branches of the celiac trunk, when the third is the branch of superior mesenteric artery or direct branch of aorta (Van Damme and Bonte, 1985; Shoumuro et al., 1991; Harada et al., 1997; Kahraman et al., 2001; Saeed et al., 2003; Babić et al., 2008); 2) all three of the classical branches of the celiac trunk are direct branches of aorta (Van Damme and Bonte, 1985; Basar et al., 1995; Yamaka et al., 1995), and 3) the presence of a celiacomesenteric trunk – a fusion of the celiac trunk and the superior mesenteric artery (Cavdar et al., 1997; Detroux et al., 1998; Agarwal et al., 2000). Other variations are related to diameter, length or location of these abdominal vessels (Yalcin et al., 2004).

These variations resulting in variable vascular anatomy of the abdominal viscera are very important to every radiologist or surgeon in planning and conducting surgical or interventional procedures. The first description of variable hepatic arteries was published in 1756 by Haller. The vascular anatomy of the liver was examined in many studies regarding its importance for liver surgery and the therapy of unresectable advanced liver malignancies. Adachi (1928) examined the CT of 252 subjects and classified six types with 28 forms of variations. Michels (1955) proposed a recognized classification of the variations of hepatic arteries, and this classification was modified by Hiatt in 1994 (Koops, 2004).

The aim of this study was to evaluate MDCT-detected variations of the celiac trunk and superior mesenteric artery, and to compare the results with previous reports in the literature.

MATERIALS AND METHODS

This study was conducted on 150 persons who underwent abdominal MDCT angiography in the period from April 2010 until November 2012. MDCT angiography was performed at the Clinical Center in Kragujevac and private clinic "Ostrog" in Belgrade.

CT images were obtained with a 64-row MDCT scanner (Siemens AG, Medical Solutions Computed Tomography Siemensstr. 1, D-91301 Forchheim, Germany and Toshiba Aquillion 64) with a symmetrical matrix of 64 detector rows, each with a minimum slice thickness of 0.625 mm at a collimation of 0.625. Contrast administration is fundamental to the success of the examination: to inject the contrast material, we used a dual-head injector (Ulrich, GMBH %Co, Buchrunnenweg, Ulm, Germany) which allows the injection of a compact bolus of iodinated contrast material followed by a saline flush (0.9% NaCl). A patient weighing 80 Kg will require an injection of approximately 80 ml of contrast medium followed by 40 ml of saline solution (Ultravist 370, Bayer HealthCare). The injection rate, identical for contrast bolus and saline solution, should be high, as arterial enhancement is directly dependent on flow rate: in our study, a flow rate of 4.5-5.0 ml/s was used. Scan delay was established with the automatic bolus tracking technique. A region of interest was placed at the level of the thoracoabdominal aorta, and the scan was initiated when density in the region reached 150 HU.

Image analysis was performed on a dedicated Siemens console equipped with Syngo software. We used multiplanar reconstructions (MPRs) in the three spatial planes and three-dimensional reconstructions using maximum intensity projection (MIP) and volume rendering (VR).

RESULTS

We found that 78% of patients presented a classic anatomy of the celiac trunk and superior mesenteric artery. The celiac trunk arises from the ventral side of the abdominal aorta, at the level of the 12th thoracic vertebra and then divides into three branches,

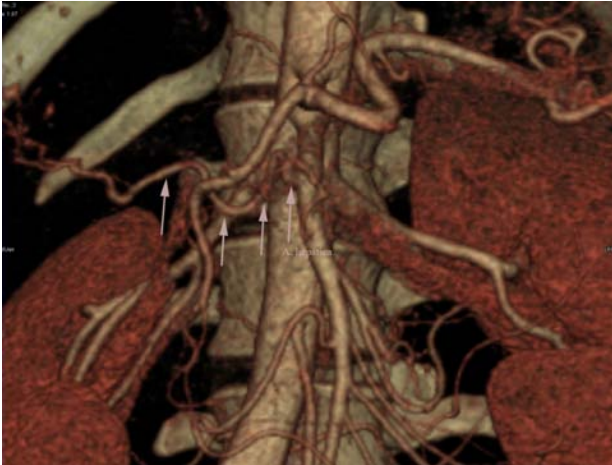


Fig. 1. Origin of the common hepatic artery from the superior mesenteric artery.

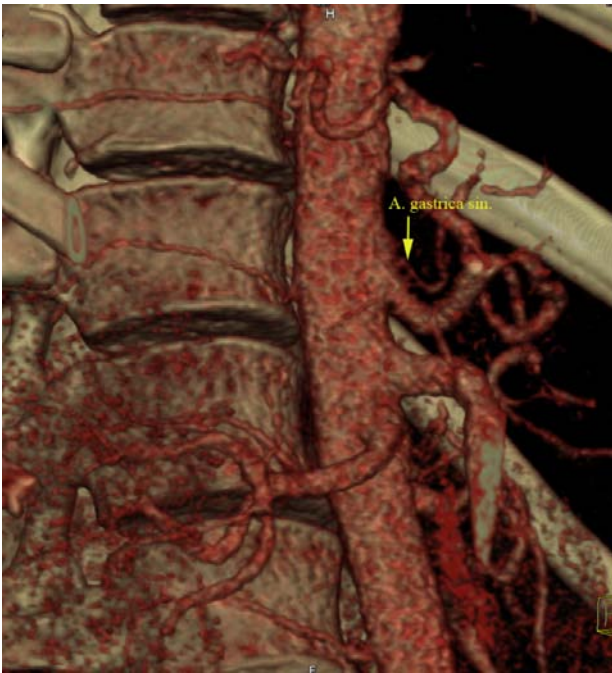


Fig. 2. Origin of the left gastric artery from the abdominal aorta.

the left gastric artery, the common hepatic artery and splenic artery. The superior mesenteric artery also has its origin on the ventral side of the abdominal aorta, lower than the origin of the celiac trunk.

Using this imaging technique, we found the existence of variations of these abdominal blood vessels in 22% of patients.

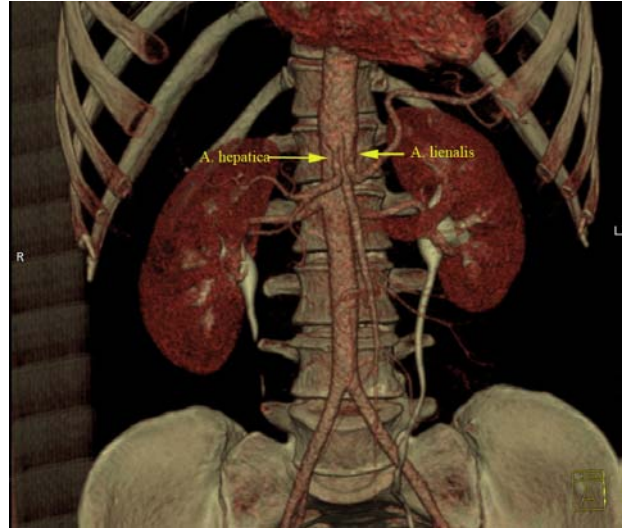


Fig. 3. Separate origins of the splenic artery and the common hepatic artery.

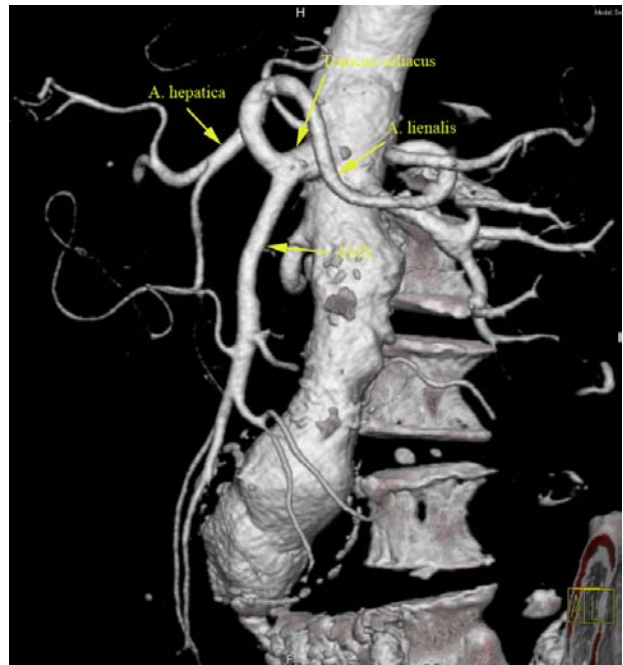


Fig. 4. The presence of a common trunk of the coeliac trunk and the superior mesenteric artery.

The most frequent variation was the origin of the common hepatic artery from the superior mesenteric artery (10%) (Fig. 1). The next variation, according to frequency, was the origin of the left gastric artery direct from the abdominal aorta (4%)

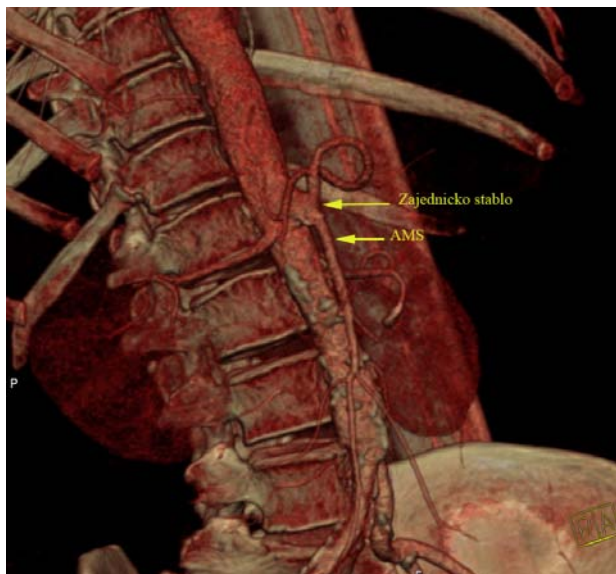


Fig. 5. The presence of a common trunk of the coeliac trunk and the superior mesenteric artery

Table 1 Michel's classification of the hepatic arteries

Type	Description
I	Normal anatomy
II	Left hepatic artery from left gastric artery
III	Right hepatic artery from superior mesenteric artery
IV	Left hepatic artery from left gastric artery and right hepatic artery from superior mesenteric artery
V	Acc. left hepatic artery from left gastric artery
VI	Acc. right hepatic artery from superior mesenteric artery
VII	Acc. left hepatic artery from left gastric artery and acc. right hepatic artery from superior mesenteric artery
VIII	Acc. left hepatic artery from left gastric artery and right hepatic artery from superior mesenteric artery
IX	Common hepatic artery from superior mesenteric artery
X	Common hepatic artery from left gastric artery

(Fig. 2). Separate origin of the splenic artery and the common hepatic artery was present in 2% of patients (Fig. 3). The presence of a common trunk of the coeliac trunk and superior mesenteric artery is rarely present and this variation in our research was



Fig. 6. The anastomosis between the coeliac trunk and the superior mesenteric artery.

detected in 3% of patients (Figs. 4 and 5). The arc of Buhler as anastomosis between the coeliac trunk and superior mesenteric artery was detected in 3% of cases (Fig. 6).

DISCUSSION

Vascular anatomical variations of the coeliac trunk and the superior mesenteric artery were described by Tandler in 1904, as the result of disorders during embryogenesis. During human embryogenesis, four roots of the omphalomesenteric artery, as the anterior branches of the abdominal aorta, are connected by the ventral longitudinal anastomosis (Längsanastomose). The central two of these four roots disappear during embryogenesis and the ventral anastomosis connects the first and the fourth roots. The splenic, left gastric and common hepatic artery arises from this longitudinal anastomosis. The superior mesenteric artery will come from the fourth root of omphalomesenteric artery. Retention or disappearance of any of these arteries results in arterial variation of the coeliac trunk or superior mesenteric artery.

Based on hypothesis of Tandler (1904) and Morita (1935), variations of the celiac trunk are classified into 15 forms. There are no data about four of them to date. Adachi (1928) classified these anatomical variations of the celiac trunk into 6 types with 28 forms. Van Damme and Bonte (1985) and Bergman et al. (1989), after angiographic examinations, found a classic trifurcation of the celiac trunk in 86% of respondents, bifurcation in 12% and the absence of the celiac trunk in 2% of patients. Hazirolan et al. (2009), using MDCT scanners, found the trifurcation of the celiac trunk in 70% of patients, while in the study of Ferrari et al. (2007) this percentage was lower (56.7%). The results of our study have revealed the presence of classical trifurcation of the celiac trunk in 78% of patients, bifurcation in 14% and the absence of trunk in 2%, which corresponds to the results of previous studies.

Hepatic artery variations are described using Michels' (1955) and Hiatt's (1994) classification. Our results showed the existence of a ninth type of variation according to Michels' classification (Table 1), which was that the common hepatic artery arises from the superior mesenteric artery and this was found in 10% of patients. This corresponds to the fifth type of variation according to Hiatt's classification. Iezzi et al. (2008) revealed the presence of these variations in 3.6% patients. In cadaveric studies of Michels (1955) this variation was found in 4.5% of cadavers. The greater percentage of this variation in our study may be explained by the smaller number of respondents.

The left gastric artery is a direct branch of the celiac trunk. The origin of this artery from the aortic arch was described by Ferrari et al. (2007), and the percentage of this variation in their study was 1.7%, while the percentage of the same variation was 10% in the study of Piquand (1910). Hazirolan et al. (2009) showed an incidence of 3%, while the incidence of this variation in our study was 4%.

A separate origin of the splenic artery and the common hepatic artery, without the presence of the celiac trunk, is a rare variation and the incidence in

our study was 2%. Winston et al. (2005) found that in 2% of cases the common hepatic artery arises directly from the aortic arch, and Ferrari et al. (2007) found this variation in 1.7% of cases.

The existence of a common celiacomesenteric trunk is a rare variation and according to available literature, it has been found in less than 2% of cases (Hazirolan et al. 2009; Yi et al., 2007; Yilmaz et al., 2013). In our study, the percentage of this variation was 3%.

Buhler's arc is the anastomosis between the superior mesenteric artery and the celiac trunk. This vascular anastomosis is present in less than 4% of individuals according to Dubel (Dubel, 2007), and 1.7% according to Ferrari et al. (2007). The types of the arterial anastomosis between the superior mesenteric artery and the celiac trunk described in the literature are as follows: 1) anastomosis between the gastroduodenal artery (the branch of the common hepatic artery, as the branch of the celiac trunk) and the inferior pancreaticoduodenal arteries (the branches of the superior mesenteric artery); 2) anastomosis between the dorsal pancreatic artery (the branch of the splenic artery, as the branch of the celiac trunk), and the anterior and posterior pancreaticoduodenal arcades (the branches of the superior mesenteric artery are parts of these arcades); 3) ventral arterial anastomosis between the superior mesenteric artery and the celiac trunk described by Buhler in 1904 (McNulty et al., 2001). The arc of Buhler was present in 3% respondents of our study, what is in agreement with the results of earlier studies.

According to the results of this study, 78% of respondents had a classic anatomy of the celiac trunk and superior mesenteric artery, but in 22% of respondents we found the existence of variations of these abdominal blood vessels. MDCT scanner gave us an insight into normal anatomy and variations of the abdominal blood vessels, which is very important for the planning of surgical interventions, especially transplantation, as well as for the prevention of complications due to ischemia.

REFERENCES

- Adachi, B. (1928). Anatomie der Japaner I. das arteriensystem der Japaner. Band II. Kaiserlis-Japanischen Universitat yu Kyoto. Maruzen Publishing Co., Kyoto, 20-71
- Agarwal, A.K., Youssef, M.K., Doyle, G.J. and C.P.Wood (2000). Coeliacomesenteric trunk stenosis a rare variation causing mesenteric ischaemia. *Eur. J. Vasc. Endovasc. Surg.* **20**, 405-406.
- Babic, Z., Jasovic, A., Popovic, R. and V. Babic (2008). Anatomical variations of celiac trunk. *Abstract book, Second Congress of Serbian Anatomical Society*, 38-39.
- Basar, R., Onderoglu, S., Cumhuri, T., Yuksel, M. and T. Olcer (1995). Agenesis of the coeliac trunk: an angiographic case. *Kaibogaku Zasshi* **70**, 180-182.
- Bergman, R.A., Afifi, A.K. and R. Miyauchi (1989). [Http://www.vh.org/adult/provider/anatomy/Anatomic_Variants/Cardiovascular/Text/Arteries/Coeliac_Trunk](http://www.vh.org/adult/provider/anatomy/Anatomic_Variants/Cardiovascular/Text/Arteries/Coeliac_Trunk).
- Cavdar, S., Sehirli, U. and B. Pekin (1997). Coeliacomesenteric trunk. *Clin. Anat.* **10**, 231-234.
- Chen, H., Yano, R., Emura, S. and S. Shoumura (2009). Anatomic variation of the celiac trunk with special reference to hepatic artery patterns. *Annals of anatomy* **191**, 399-407.
- Chitra, R. (2009). Clinical relevance of a rare variation in the origin of gastroduodenal artery. *International Journal of Anatomical Variations* **2**, 69-70.
- Cicekibasi, A.E., Uysal, I. I., Seker, M., Tuncer, I., Büyükmumcu, M. and A. Salbacak (2005). A rare variation of the coeliac trunk. *Annals of anatomy* **187**, 387-491.
- Detroux, M., Anidjar, S. and R. Nottin (1998). Aneurysm of a common coeliacomesenteric trunk. *Ann. Vasc. Surg.* **12**, 78-82.
- Dubel, G.J., Ahn, S.H. and M.A. Saeed (2007). Interventional management of arc of Buhler aneurysm. *Semin Intervent Radiol.* **24**, 76-81
- Ferrari, R., De Cecco, C.N., Iafrate, F., Paolantonio, P., Rengo, M. and A. Laghi (2007). Anatomical variations of the coeliac trunk and the mesenteric arteries evaluated with 64-row CT angiography. *Abdominal radiology.* **112**, 988-998
- Harada, H., Yamaki, K., Doi, Y., Hirata, T., Saga, T., Nishida, T., Nishimura, H. and M. Yoshizuka (1997). An anomalous case of the gastro-hepatic and splenomesenteric trunks independently arising from the abdominal aorta. *Kurume Med. J.* **44**, 237-240.
- Hazirolan, T., Metin, Y., Karaosmanoglu, A.D., Canyigit, M., Turkbey, B., Oguz, B.S. and M. Ariyurek (2009). Mesenteric arterial variations detected at MDCT angiography of abdominal aorta. *AJR Am J Roentgenol.* **192**, 1097-1102
- Hiatt, J.R., Gabbay, J. and R.W. Busuttil (1994). Surgical anatomy of the hepatic arteries in 1000 cases. *Annals of surgery.* **220**, 50-52
- Iezzi, R., Cotroneo, A.R., Giancristofaro, D., Santoro, M. and M.L. Storto (2008). Multidetector-row CT angiographic imaging of the celiac trunk: anatomy and normal variants. *Surg Radiol Anat.* **30**, 303-310
- Kahraman, G., Marur, T., Tanyeli, E. and M. Yildirim (2001). Hepatomesenteric trunk. *Surg. Radiol. Anat.* **23**, 433-435.
- Koops, A., Wojciechowski, B., Broering, D.C., Adam, G. and G. Krupski-Berdien (2004). Anatomic variations of the hepatic arteries in 604 selective celiac and superior mesenteric angiographies. *Surg. Radiol. Anat.* **26**, 239-244.
- McNulty, J.G., Hickey, N., Khosa, F., O'Brien, P. and J.P. O'Callaghan (2001). Surgical and radiological significance of variants of Bühler's anastomotic artery: a report of three cases. *Surg Radiol Anat.* **23(4)**, 277-280
- Michels, N.A. (1955). Blood supply and anatomy of the upper abdominal organs with a descriptive atlas. *JB Lippincot Co., Philadelphia, Montreal*, 3-137
- Morita, M., (1935). Reports and conception of three anomalous cases on the area of the celiac and superior mesenteric arteries. *Igaku Kenkyu (Acta Med.)* **9**, 159-172
- Oran, I., Yesildag, A. and A. Memis (2001). Aortic origin of right hepatic artery and superior mesenteric origin of splenic artery two rare variations demonstrated angiographically. *Surg. Radiol. Anat.* **23**, 349-352.
- Piquand, G. (1910). Recherches sur l'anatomie du tronc coeliaque et des ses branches. *Bibliogr. Anat.* **19**, 159-201
- Saeed, M., Murshid, K.R., Rufai, A.A., Elsayed, S.E. and M.S. Sadiq (2003). Coexistence of multiple anomalies in the coeliac mesenteric arterial system. *Clin. Anat.* **16**, 30-36.
- Shoumuro, S., Emura, S., Utsumi, M., Chen, H., Hayakawa, D., Yamahira, T. and H. Isono (1991). Anatomical study on the branches of the coeliac trunk (IV). Comparison of the findings with Adachi's classification. *Kaibogaku Zasshi* **66**, 452-461.
- Tandler, J. (1904). Zur entwickelungsgeschichte des menschliden darmarterien. *Anat. Hefte.* **23**, 189-209, 475-499.
- Van Damme, J.P. and J. Bonte (1990). Vascular anatomy in abdominal surgery. Georg Thieme Verlag, Stuttgart, 4-42.
- Van Damme, J.P. and J. Bonte (1985). The branches of the coeliac trunk. *Acta. Anat.* **122**, 110-114.
- Winston, C.B., Lee, N.A., Teitcher, J., Dematteo, R.P., Fong, Y. and L.H. Blumgart (2007). CT angiography for delineation of celiac and superior mesenteric artery variants in patients undergoing hepatobiliary and pancreatic surgery. *AJR Am J Roentgenol.* **188**, W13-W19

- Yalcin, B., Kocabiyik, N., Yazar, F., Ozan, H. and Ö. Özdogmus (2004). Variations of the branches of the celiac trunk. *Gülhane Tıp Dergisi* **46** (2), 163-165.
- Yamaka, K., Tanaka, N., Matsushima, T., Miyazaki, K. and M. Yoshizuka (1995). A rare case of absence of the coeliac trunk: the left gastric, the splenic, the common hepatic and the superior mesenteric arteries arising independently from the abdominal aorta. *Anat. Anz.* **177**, 97-100.
- Yi, S.Q., Terayama, H., Naito, M., Hayashi, S., Moriyama, H., Tsuchida, A. and M. Itoh (2007). A common celiacomesenteric trunk and a brief review of the literature. *Annals of anatomy.* **189**, 482-488
- Yilmaz, M.T., Tezer M., Cicecibasi, A.E., Aydin, A.D. and A. Salbacak (2013). A case report of coeliacomesenteric trunk. *Biomedical Research.* **24**, 150-152

NASAL MORPHOLOGICAL CHARACTERISTICS OF THE SERBIAN POPULATION

J. JOVANOVIĆ¹, D. JEREMIĆ², B. JOVANOVIĆ¹, MAJA VULOVIĆ², P. SAZDANOVIĆ²,
MAJA SAZDANOVIĆ³, NEDA OGNJANOVIĆ², D. STOJADINOVIĆ², KATARINA JEREMIĆ¹,
N. MARKOVIĆ² and IVANA ŽIVANOVIĆ-MAČUŽIĆ²

¹ *Clinical Center Kragujevac, 34000 Kragujevac, Serbia*

² *Department of Anatomy and Forensic Medicine, Faculty of Medical Sciences, University of Kragujevac,
34000 Kragujevac, Serbia*

³ *Department of Histology, Faculty of Medical Sciences, University of Kragujevac, 34000 Kragujevac, Serbia*

Abstract - The aim of this study was to determine the nasal parameters in the population of central Serbia and to compare them with those determined in earlier studies in different populations. The research was conducted on 496 randomly selected persons (262 males and 234 females), aged 18-65 years. The measured parameters were nasal height and nasal breadth and the standard spreading caliper with scale was used for measurements. There were significant differences in the nasal parameters between male and female subjects. The nasal breadth was 34.72 mm in females, and in the male population it was 36.7 mm. The mean values of nasal height were 52.6 mm and 54.32 mm in females and males, respectively. The nasal index in females and males was 66.01 and 67.56, respectively, and the mean value of the nasal index of all respondents was 66.78. After conducting the research it was concluded that the dominant nasal type in the population of the central part of Serbia is leptorrhine. The present study showed the existence of sexual dimorphism in nasal morphology. The data obtained in our study may be useful in anthropological and forensic research, as well as in cosmetic planning and reconstructive surgery.

Key words: Anthropometry, nasal height, nasal breadth, nasal index, nasal type

INTRODUCTION

The prominent characteristics of the human facial profile are lips, nose and chin (Troncoso et al., 2008). The measurement of anatomical parameters of these facial structures is of great importance to anthropology, reconstructive surgery and forensic medicine. The techniques of anthropometry, as a basic tool of biological anthropology, are used for obtaining these data.

The size and the shape of the nose have been used for differentiation of human races, among the

other parameters (Leong and Eccles, 2009). The nasal index, as the ratio between nasal height and nasal width, multiplied by 100 is the most commonly used parameter in nasal anthropometry. It is based on both bony and cartilaginous landmarks, which makes it different from most other anthropological indices (Bhargava and Sharma, 1959). Based on the nasal index, the nose has been classified as leptorrhine or fine ($NI \leq 69.90$), mesorrhine or medium nose ($70.0 \leq NI \leq 84.90$), or platyrrhine or broad ($NI \geq 850$) (Williams et al., 1995). The nose of individuals with a high nasal index is broad and those with a low index have a narrow nose.

The differences between nasal shapes of people from different parts of the world in part are the results of evolutionary adaptation to climate (Davies, 1932; Balaesque et al., 2007). The nasal index has been correlated with average temperature and humidity (Thomson and Duddley Buxton, 1923; Weiner, 1954) and nasal size with oxygen consumption (Hall, 2005). A low nasal index was associated with cold and dry climates, while a high nasal index was associated with hot and moist climates. It has not been confirmed whether differences in the size and the shape of the nose between different ethnic groups influences the different nasal physiology or predilection to sinonasal pathology (Leong and Eccles, 2009).

The aim of this study was to determine the nasal parameters in the population of central Serbia and to compare them with those determined in earlier studies in different populations.

MATERIALS AND METHODS

This study was conducted on 496 randomly selected persons (262 males and 234 females), aged 18-65 years. Measurements were performed at the Institute of Anatomy, Faculty of Medical Science, University of Kragujevac, from 2007-2012. All subjects were without past and existing craniofacial trauma, without deformity and facial scars. The measurement process was explained to each subject and written permission was obtained from each tested person before measurement.

All measurements were performed in the same way and under the same conditions. The subjects were in a sitting position, in a relaxed condition, with the head in the correct anatomical position (neutral position of the head). All measurements were performed three times and the mean value was taken for further analysis. The measurements were made with a permissible error of 1 mm.

The standard spreading caliper with scale was used for the measurement of nasal parameters.

The differences in mean values of nasal height, nasal breadth and nasal index were tested for statistical significance by independent sample t-test.

Landmark points used in measuring of the parameters were the nasion (n) – the midpoint of the nasofrontal suture and the subnasale (sn) – in the midline, the junction between the lower border of the nasal septum and the cutaneous portion of the upper lip.

The anthropometric measurements taken were nasal height (NH) – distance between nasion (n) and subnasale (sn) and nasal breadth (NB) – distance between the two alae nasi (al).

The nasal breadth (maximum breadth of the nose) was measured at a right angle to the nasal height from ala to ala. The nasal height was measured from nasion to nasospinale.

Nasal index (NI) presents the ratio between nasal breadth (NB) and nasal height (NH) and can be calculated according to the formula of Romo and Abraham (2003):

$$\text{Nasal index (NI)} = \text{nasal breadth (NB)} / \text{nasal height (NH)} \times 100$$

According to the nasal index (NI), the nose was classified as leptorrhine – fine ($\text{NI} \leq 69.90$), mesorrhine – medium ($70.0 \leq \text{NI} \leq 84.90$) or platyrrhine – broad ($\text{NI} \geq 85.0$) (Williams et al., 1995).

RESULTS

The present study provides valuable new data pertaining to the nasal indices and nasal types in the adult Serbian population.

The nasal breadth, as a distance between two alae nasi, was found to be 34.72 mm in females, while in males it was 36.7 mm. The nasal height presents the distance between nasion and subnasale point and the mean values were 52.6 mm and 54.32 mm in females

Table 1. Nasal parameters of the studied population

Parameter	Male	Female	Both Sexes	p value
Nasal height (NH) mm±SD	54.32±3.70	52.6±4.61	53.46±4.28	<0.001*
Nasal breadth (NB) mm±SD	36.7±2.86	34.72±3.38	35.71±3.14	<0.001*
Nasal index (NI)	67.56±6.07	66.01±8.12	66.78±7.24	<0.001*

* Significant difference

Table 2. Frequencies of the categories of nasal type according to nasal index of the studied population

Nose type	Male	Female	Both gender	p value
Leptorrhine	68.32% (179)	87.18% (204)	77.22% (383)	<0.001*
Mesorrhine	29.77% (78)	11.97% (28)	21.37% (106)	<0.001*
Platyrrhine	1.91% (5)	0.85% (2)	1.41% (7)	<0.001*

* Significant difference

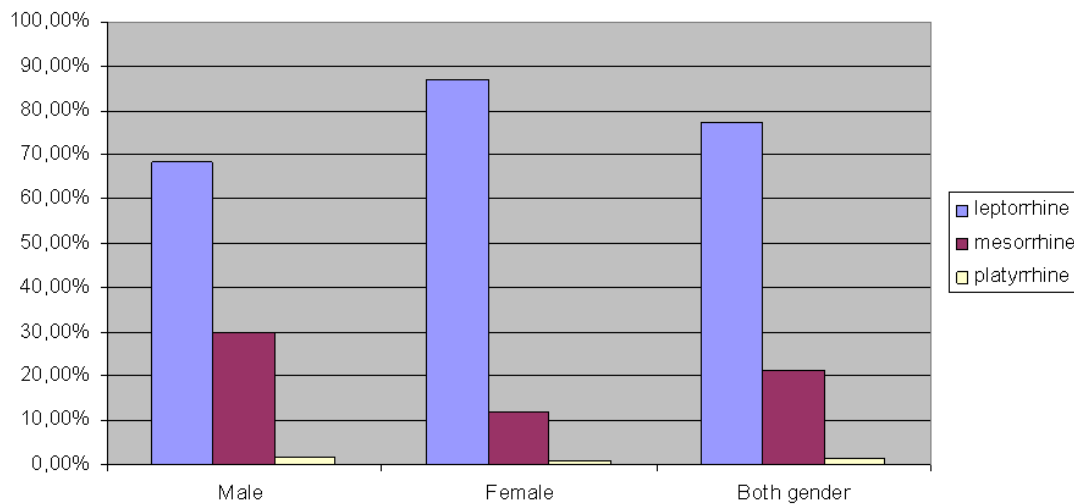


Fig.1. Frequencies of the categories of nasal type according to nasal index of the studied population

and males, respectively. The nasal indices in females and males were found to be 66.01 and 67.56 respectively, and the mean value of the nasal index of all respondents was 66.78 (Table 1). Thus, Serbian males have a significantly higher nasal breadth, nasal height and nasal index than females ($p < 0.001$).

The dominant type of nasal phenotype according to the nasal index was leptorrhine with a frequency of 68.32% in males and 87.18% in females; this was followed by mesorrhine (29.77% in males and

11.97% in females) and platyrrhine (1.91% in males and 0.85% in females). Thus, leptorrhine nasal type predominated among males and females with a frequency of 77.22% (Table 2, Fig. 1).

DISCUSSION

The understanding and concept of beauty are different and individual. However, all would agree that the appearance of the nose (shape and the size) significantly affect the appearance of the whole face.

It also can affect the psychological and social functioning of a person (Borges et al., 1998). Therefore, nose surgery is one of the most common surgical procedures in plastic surgery, because it can change the size and shape of the nose and can be of great importance for improved self-confidence and social functioning.

Esthetic surgery uses knowledge of anatomy and facial esthetics, and a distinct surgical technique is selected for each individual nose. Rhinoplasty is always based on a detailed preoperative analysis. Nasal index is very useful in this analysis. It is also very useful in forensic research as well as in the study of differences among living populations (Daniel, 2003). The number of variations in nasal shape and size is greater than the variations of any other part of the human body (Proetz, 1941). In the planning of reconstructive surgery of the nose it is very important to take into account the type of nose characteristic for a particular race or ethnic group to suit the final outcome with the proportions of the face. Various studies have indicated the great ethnic sensitiveness of nasal index and have shown racial and ethnic differences in nasal index among different populations. Leptorrhine nose type with a nasal index of 69.9 or less is characteristic for the Caucasian race. Africans have a platyrrhine type of nose, with a nasal index of 85.00 and higher, whereas the Caucasoids of Indo-Aryan ancestry have mesorrhine type noses (Gangrade and Babel, 2012).

The mean nasal index observed in this study (66.78) was higher than that observed in the populations of the following countries: Armenia – 63.80, Damascus – 63.26, Lebanon – 63.30 (Daniel, 2003), Montenegrins of Vojvodina-Serbia – 62.93 males, 60.61 females (Pavlica et al., 2007), North America – 64.85, Azerbaijan – 64.25, Bulgaria – 65, Czech Republic – 65.96, Germany – 62.85, Hungary – 65.8, Italy – 56.85, Poland – 64.6, Portugal – 58.35, Slovakia – 62.35, Turkey – 61.45, Iran – 55.65 and Egypt – 60.55 (Farkas et al., 2005).

This index was similar but lower than those observed in Croatians (66.8) and Russians (67.5) (Far-

kas et al., 2005). The nasal index of Greek and German populations according to Farkas et al. (2005) was 62.85, which is lower than in our study, but according to another study this index in the Greek population was 68.49 (Daniel, 2003), and in Germans 71 (Akpa et al., 2003), which was higher than in our study.

The mean nasal index observed in this study (66.78) was lower than those observed in various Nigerian populations (81.86-98.50) (Oladipo et al., 2007, 2008a, 2009, 2010), Nigerian Igbos – 116.70 (Akpa et al., 2003), Nigerian Isokos – 90.97±8.26 (Ese et al., 2011), Nigerian Sindhi – 70.7 (Choudhary and Chowdhary, 2012), Africans – 90-100 (Risley, 1969), African Americans – 79.70 (Porter and Olson, 2003), Indian Negroid (Sudroid) – 84.10, Indo-Aryans – 73.25 (Risley, 1969), Indian Onge males – 87.43, Indian Onge females – 90.07 (Ashok, 2006), Arabs – 74.48 (Daniel, 2003), Indians – 72.4, and Singaporeans – 72.4 (Farkas et al., 2005).

Most Western Europeans are leptorrhine, having long narrow noses with a nasal index of 69.9 or less (Romo and Abraham, 2003), corresponding to the findings in the present study. The Bantu and Bushmen African tribes are platyrrhine with a nasal index of 85.0 and above (Risley, 1969). In the present study, the mean nasal indices, both male and female, were lower than those observed for indigenous Australians with a nasal index of 85.0 and above and with platyrrhine nasal type (Romo and Abraham, 2003). In the present study, the largest number of subjects, according to the nasal index, had leptorrhine noses, corresponding to the findings in the Montenegrins of Vojvodina (Serbia) (Pavlica et al., 2007).

The mean value of the nasal breadth in the studied population (both male and female) was one of the highest among white Europeans. It was higher than the nasal breadth of males in Italy (32.1 mm), Slovakia (33.6 mm), Germany (34 mm), North America (34.7), Poland (35.2 mm), Russia (35.8 mm), Azerbaijan (35.7 mm), Greece (35.7 mm), Slovenia (35.9 mm), Bulgaria (36 mm) and Czech Republic (36.2

mm) (Farkas et al., 2005). It is similar to, but higher than, the measured values of Croatians (36.5 mm) and Portuguese (36.6 mm), and similar but lower than that of the Turkish male population (36.8 mm) (Farkas et al., 2005). The nasal breadth of the Serbian respondents of this study was lower than in the Hungarian population (37.3 mm).

The mean value of nasal breadth in the female population of our study (34.72) was higher than the nasal breadth of European and North American females. It was similar to, but higher than the measured values of females in Czech Republic (33.8 mm) and Azerbaijan (33.8) (Farkas et al., 2005). The nasal breadth of Serbian female respondents in our study was lower than in females from India, Singapore, Thailand and Japan (Farkas et al., 2005).

The mean value of nasal height in the studied male population was 54.32. This was higher than the nasal height of males in North America (53), Slovakia (53.5 mm), Germany (52 mm), Poland (53.7 mm), Russia (51.7 mm) and India (47.2 mm) (Farkas et al., 2005). It is similar to, but higher than the measured values in Bulgarian (54 mm), Czech (54 mm) and Croatian populations (53.8 mm) (Farkas et al., 2005). The nasal height of Serbian males was lower than that of males in Italy (56.2 mm) Azerbaijan (55.9 mm), Greece (55.5 mm) Slovenia (56.2 mm), Hungary (55 mm) and Portugal (59.5 mm) (Farkas et al., 2005).

The mean value of the nasal height in the studied female population was 52.6. It was higher than the nasal height of females in North America (48.9), Slovakia (49.4 mm), Croatia (50 mm), Germany (51.4 mm), Poland (51.2 mm), Russia (50.4 mm), India (43.7) and Egypt (47.4) (Farkas et al., 2005). It is similar to, but greater than the measured values in Italian (52.1 mm), Bulgarian (52.1 mm), Czech (52.1 mm), Azerbaijani (52.3 mm), Slovenian (52 mm) and Hungarian populations (52.5 mm) (Farkas et al., 2005). The nasal height of Serbian female respondents of this study was very similar, but lower than in Greek (52.8 mm) and Portuguese (57.8 mm), Iranian (58.5) and Turkish (55.2) females.

After conducting the research, it was concluded that the dominant nasal type in the population of the central part of Serbia is leptorrhine. The present study confirmed the existence of sexual dimorphism in nasal morphology. The data obtained in our study may be useful in anthropological and forensic research, as well as in cosmetic planning and reconstructive surgery.

REFERENCES

- Akpa, A.O.C., Ugwu, C. and S.O. Maliki (2003). Morphometric study of the nasal parameters in Nigerian Igbos. *J. Exp. Clin. Anat.* **2**(2), 24-25.
- Ashok, K.P. (2006). Cephalo-facial variation among Onges. *Anthropologist* **8**(4), 245-249.
- Balaresque, P.L., Ballereau S.J. and M.A. Jobling (2007). Challenges in human genetic diversity: demographic history and adaptation. *Hum. Mol. Gen.* **16**, R134-R139.
- Bhargava, I. and J.C. Sharma (1959). The Nose in Relation to Head and Face. An Anthropometric Study. *Indian Journal of Otolaryngology* **11**(4), 213-218.
- Borges, D.P., Dinis, M. and A. Gomes (1998). Psychosocial Consequences of Nasal Aesthetic and Functional Surgery: A Controlled Prospective Study in an ENT Setting. *Rhinology* **36**, 32-38.
- Choudhary, A. and D.S. Chowdhary (2012). Comparative anthropometric study of nasal parameters between two ethnic groups of Rajasthan State. *Int. J. Med. Public Health* **2**(2), 46-48.
- Daniel, R.K. (2003). Hispanic rhinoplasty in the United States, with emphasis on the Mexican American nose. *Plast. Reconstr. Surg.* **112**(1), 244-56, discussion pp. 257-258.
- Davies, A. (1932). Man's nasal index in relation to climate. *J.R. Anthropol. Ins. GB Irel.* **29**, 8-14.
- Ese, A., Mabel, O.E., Dennis, E.O.E. and A. Ogheneyeseno (2011). Anthropometric study of the nasal parameters of the Isokos in Delta State of Nigeria. *Annals of Biological Research* **2**(6), 408-413.
- Farkas, L.G., Katić, M.J. and C.R. Forrest (2005). International Anthropometric Study of Facial Morphology in Various Ethnic Groups/Races. *The Journal of craniofacial surgery* **16**(4), 615-646.
- Gangrade, P.R. and H. Babael (2012). Anthropometric study of the nasal index of the Bheel – Meena tribe of Southern Rajasthan. *Int. J. Cur. Res. Rev.* **4**(19), 88-91.

- Hall R.L. (2005). Energetics of nose and mouth breathing, body size, body composition and nose volume in young adult males and females. *Am. J. Hum. Biol.* **17**, 321-330.
- Leong, S.C. and R. Eccles (2009). A synaptic review of the nasal index and the significance of the shape and size of the nose in rhinology. *Clin. Otolaryngol.* **34**, 191-198.
- Oladipo, G.S., Didia, B.C., Okoh, P.D. and J.S. Hart (2008a). Sexual dimorphism in facial dimensions of adult jaw. *J. Expt. and Clin. Anat.* **7(2)**, 10-14.
- Oladipo, G.S., Eroje, M.A. and H.B. Fahwehinmi (2009). Anthropometric comparison of nasal indices between Andoni and Okrika tribes of Rivers State, Nigeria. *Int. J. Med. Med. Sci.* **1(4)**, 135-137.
- Oladipo, G.S., Olabiyi, A.O., Oremosu, A.A. and C.C. Noronha (2007). Nasal indices among major ethnic groups in southern Nigeria. *Scientific Research and Essay* **2(1)**, 20-22.
- Oladipo, G.S., Oyakhire, M.O. and A.A. Ugboma Henry (2010). Anthropometric studies of nasal indices of the Ekpeye and Ikwerre ethnic groups in Nigeria. *Asian J. Med. Sci.* **2(4)**, 167-169.
- Pavlica, T., Božić-Krstić, V. and R. Rakić (2007). Anthropological characteristics of Montenegrins living in Vojvodina. *Glasnik Antropološkog društva Jugoslavije* **42**, 167-177.
- Porter, J.P. and K.L. Olson (2003). Analysis of the African American female nose. *Plastic Reconstruct. Surg.* **111(2)**, 627-628.
- Proetz, A.W. (1941). *Essays on the applied physiology of the nose.* Annals Publishing Co., St. Louis, U.S.A
- Risley, H.H. (1969). *The people of India.* Oriental Books Reprint Corporation, Delhi, 395-399.
- Romo, T. and M.T. Abraham (2003). The ethnic nose. *Facial Plastic Surg.* **19(3)**, 269-278.
- Thompson, A. and L. Dudley Buxton (1923). Man's nasal index in relation to certain climatic conditions. *J. R. Anthropol. Inst. GB. Irel.* **53**, 99-122.
- Troncoso, P.J.A, Suazo, G.I.C, Cantin L.M. and M.D.A. Zavando (2008). Sexual dimorphism in the nose morphotype in adult Chilean. *Int. J. Morphol.* **26 (3)**, 537-542.
- Weiner J.S (1954). Nose shape and climate. *Am. J. Phys. Anthropol.* **12**, 615-618.
- Williams, P., Dyson, M., Dussak, J.E., Bannister, L.H., Berry, M.M., Collins, P. and M.W.J. Ferguson (1995). Skeletal system. In: *Gray's Anatomy.* 38th Edn, 607-612. Elbs with Churchill Livingstone, London

SEXUAL DIMORPHISM OF MEDIUM-SIZED NEURONS WITH SPINES IN HUMAN NUCLEUS ACCUMBENS

MAJA SAZDANOVIĆ¹, SLOBODANKA MITROVIĆ³, IVANA ŽIVANOVIĆ-MAČUŽIĆ², D. JEREMIĆ², IRENA TANASKOVIĆ¹, Z. MILOSAVLJEVIĆ¹, A. MALIKOVIĆ⁵, NEDA OGNJANOVIĆ², P. SAZDANOVIĆ², B. JOVANOVIĆ⁶, J. JOVANOVIĆ⁶, M. TODOROVIĆ⁴ and J. TOŠEVSKI²

¹ Department of Histology, Faculty of Medical Sciences, University of Kragujevac, 34000 Kragujevac, Serbia

² Department of Anatomy, Faculty of Medical Sciences, University of Kragujevac, 34000 Kragujevac, Serbia

³ Department of Pathological Anatomy, Faculty of Medical Sciences, University of Kragujevac, 34000 Kragujevac, Serbia

⁴ Department of Forensic medicine, Faculty of Medical Sciences, University of Kragujevac, 34000 Kragujevac, Serbia

⁵ Department of Anatomy, Medical Faculty, University of Belgrade, 11000 Belgrade, Serbia

⁶ Obstetrics/Gynecology Clinic, CC Kragujevac, 34000 Kragujevac, Serbia

Abstract - The nucleus accumbens is a limbic nucleus, representing part of the striatum body, and together with the caudate nucleus and putamen, it lies on the septum. The aim of this study was to examine morphological sexual dimorphism in spine density and also to undertake an immunohistochemical study of expression for estrogen and progesterone receptors in the medium-sized neurons in the nucleus accumbens. The research was conducted on twenty human brains of persons of both sexes, between the age of 20-75 years. The Golgi method was applied to determine the types and subtypes of neurons, morphologies of soma, dendrites and axons, as well as the relations between the cells and glial elements. The following were quantitatively examined: the maximum diameter of the neurons, the minimal diameter of the neurons, and the total length of the dendrites. The expression of receptors for estrogen and progesterone, their distribution and intensity were defined immunohistochemically. The parameters of the bodies of neurons in the shell and core of the nucleus accumbens were studied in both men and women. No statistically significant differences were found. Examination of the spine density showed statistical significance in terms of a higher density of spines in women. Immunohistochemically, in the female brain estrogen expression is diffusely spread in a large number of neurons; it is extra nuclear, of granular appearance and high intensity. In the male brain, expression of estrogen is visible and distributed over about one half of different types of neurons; it is extra nuclear, of granular appearance, mostly of middle and low staining intensity. Expression of progesterone in the female brain was very discreet and on a very small number of neurons; it was extra nuclear and with a weak staining intensity. Expression of progesterone in the male brain was distributed on a small number of neurons. It had a granular appearance, it was extra nuclear, with a very low staining intensity. Our results show differences in the morphology as well as expression of receptors for estrogen and progesterone on medium-sized neurons with spines in the nucleus accumbens of men and women.

Key words: Nucleus accumbens, neurons, Golgi, estrogen, progesterone

INTRODUCTION

The nucleus accumbens (NA), from the Latin word *accumbere* meaning sits on or leans on, is the rostral,

ventromedial part of the striatum body, together with the caudate nucleus and putamen, lying on the septum. Ramon Cajal (1911) described a medium-sized neuron in the striatum, densely covered with spines,

which appeared in the region of dorsal striatum and considered as the main neuron in this region.

The nucleus accumbens, as part of the limbic system, is well known as a drug-related brain region. The nucleus accumbens has a key role in reward and enforcement of neuronal processes via glutaminergic afferent pathways originating from the basolateral amygdala, ventral subiculum and medial prefrontal cortex (Mc Donald, 1991). Stimulated dopamine transmission in the human nucleus accumbens is related to addiction and positive reinforcement of many drugs (Hoebel et al., 1989).

Medium-sized neurons with spines (MSN) represent a heterogeneous group of neurons that are characterized by a morphologically different form of soma, with a size of 10-20 μm in greatest diameter, and a variable number of dendrites (2-8). The presence of spines was not registered on the primary dendrites, while the secondary and tertiary dendrites were covered with spines of different densities. Such morphology of spines provides an enormous variability of contacts between dendrites, both within the nucleus and distant structures.

There are two possible biological mechanisms that mediate in sexual dimorphism. First, sex differences in the brain during development can produce independent sex differences in the brains of adults that persist independently from circulating gonadal hormones in adults. Second, in adults, circulating gonadal hormones may affect the brain system in the processes of addiction and reward-conditioned behavior.

In men, androgens during prenatal life permanently organize the nucleus of the limbic system, hypothalamus and spinal cord, forming a male phenotype (androgens in the same period in women form the female phenotype). The organizational effects of gonadal hormones include differences in the volume of specific brain nucleus, the number and/or spine density on the dendrites of neurons, complexity of the synaptic connections and the expression of neuropeptides (De Vries et al., 2002).

MATERIALS AND METHODS

Research was conducted on twenty human brains, belonging to persons of both sexes (male-to-female ratio equal 10:10), between 20-75 years of age. All brains were fixed after autopsy within ten hours from the time of death. The brains were fixed in phosphate-buffered 10% formalin dilutions (3.7% formaldehyde). The Golgi method was applied to determine the types of neurons, subtypes of neurons, morphologies of soma, dendrites and axons, as well as the relations between the cells, synapses, blood vessels and glial elements. The following were studied quantitatively: maximum diameter of neurons (D_{max}), minimal diameter of neurons (D_{min}), and total length of dendrites (TDL). TDL is a total dendritic length that is the sum of the lengths of all dendritic extensions of a neuron in microns. Using the parameters D_{max} and D_{min} and the formula:

$$(D_{\text{max}} \times D_{\text{min}}^2) \times \pi/6,$$

we obtained the volume of a cell body. The spine densities were compared by, counting the spines on the secondary and tertiary dendrites along the entire length of the dendrites, and then calculating the average density at 10 μm . Quantitative studies were performed using a Zeiss Axiovision 3.0.6. program.

Immunohistochemical methods indicate the neurotransmitter and modulatory activities of individual neurons, as well as the morphological features of individual neurons, indicating the types of neurons, the shape and morphology of soma.

For immunohistochemical staining, we used a primary monoclonal anti-human mouse antibody that binds to the neurotransmitters contained in the soma or extensions of neurons. After addition of the primary antibody, the preparations were kept in a water bath for 60 min and then rinsed with PBS. A biotinylated anti-mouse secondary antibody, streptavidin-HRP (horseradish peroxidase) and DAB (3,3'-diaminobenzidine) were successively applied to the preparations, followed by rinsing in PBS after the use of each substances. The preparations were rinsed

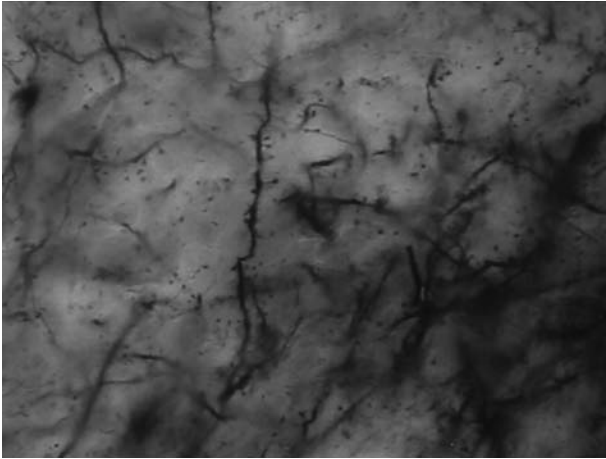


Fig. 1. Spine density on secondary dendrite, female sex, 400 X magnification

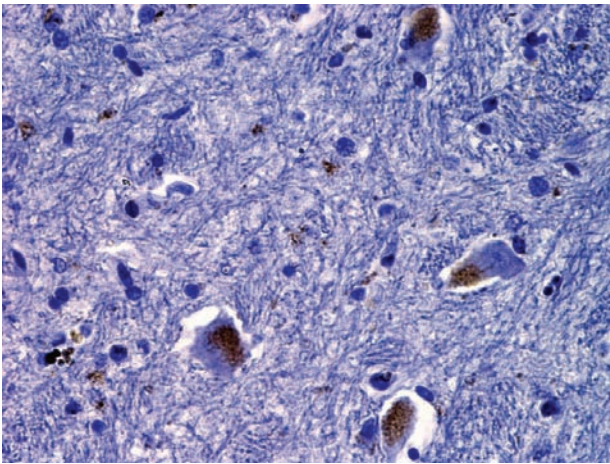


Fig. 2. Expression of estrogen (ERα) in the medium-sized neurons with spines in the nucleus accumbens, female sex, 400 X magnification

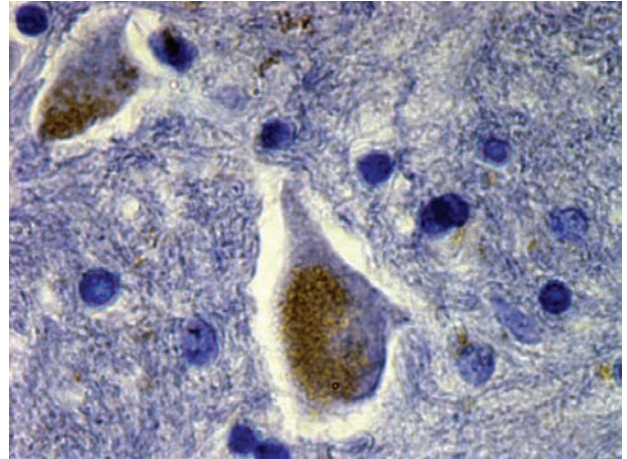


Fig. 3. Expression of estrogen (ERα) in the medium-sized neurons with spines in the nucleus accumbens, female sex, 640 X magnification

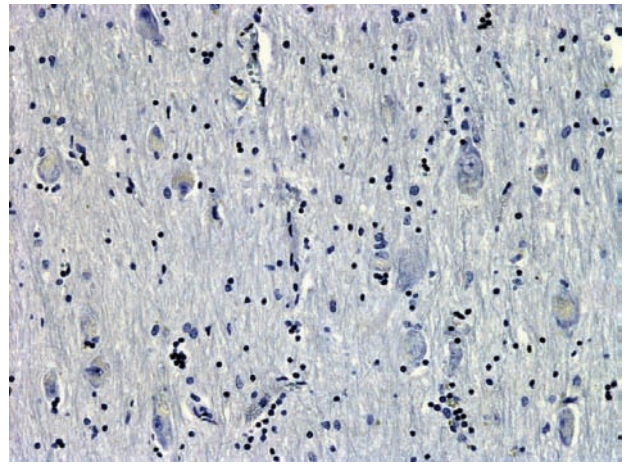


Fig. 4. Expression of estrogen (ERα) in the medium-sized neurons with spines in the nucleus accumbens, male sex, 200 X magnification

with distilled water, stained with hematoxylin and again rinsed with water. Further procedure involved the dehydration of the preparations by increasing the concentrations of alcohol.

RESULTS

Sexual dimorphism analysis

We examined if there were differences within certain sub-regions of the nucleus. We studied the pa-

rameters of the bodies of neurons (D_{max} , D_{min} , volume of the body of a neuron or a soma, Vol) in the shell of the nuclei (with the dominant types of the fusiform neurons and fusiform neurons with lateral dendrites of neurons), in both men and women. We found no statistically significant differences. The same parameters for neuron soma in the core of both sexes, where pyramidal-like neurons and multipolar neurons dominated, were studied. We found that there was no statistically significant difference.

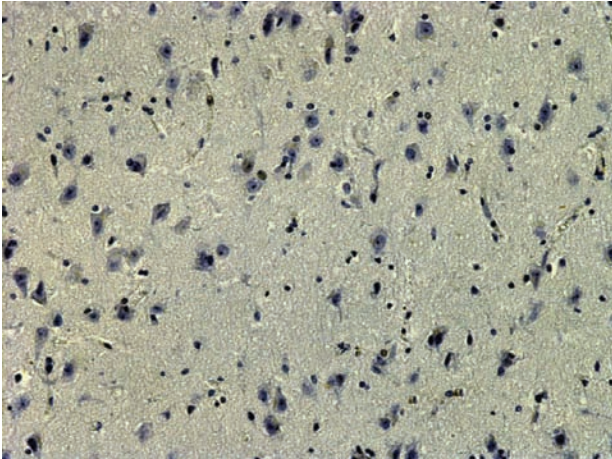


Fig. 5. Expression of progesterone in the medium-sized neurons with spines in the nucleus accumbens, female sex, 200 X magnification

After this, we examined the spine density, measuring them at a distance of 10 μm along the secondary and tertiary dendrites where their density was highest. In the shell spine, the density was 8.6 ± 0.5 in women, and 6.4 ± 0.8 in men (Table 1.) This result was statistically significant in terms of higher spine density in women. At the core, we registered 9.2 ± 0.9 in women compared to 6.9 ± 0.8 in men (Table 2). The result shows a statistically significant difference in terms of higher spine density in women than in men at both the level of individual sub-regions and across the entire nucleus (Fig. 1).

Sexual dimorphism, immunohistochemical expression of sex hormones

The neurons in the nucleus accumbens have receptors for estrogen and progesterone. They are extra nuclear, having different distributions and intensities in male and female brains. In the nucleus accumbens in the female brain, the expression of the estrogen receptors was diffuse and evident on a large number of different types of neurons. It was always extra nuclear, granular in appearance and of high intensity and occupying up to 2/3 of the soma (Figs. 2, 3).

In the nucleus accumbens in the male brain, the expression of estrogen receptors (ER α) was also evident. It was distributed in about half of different

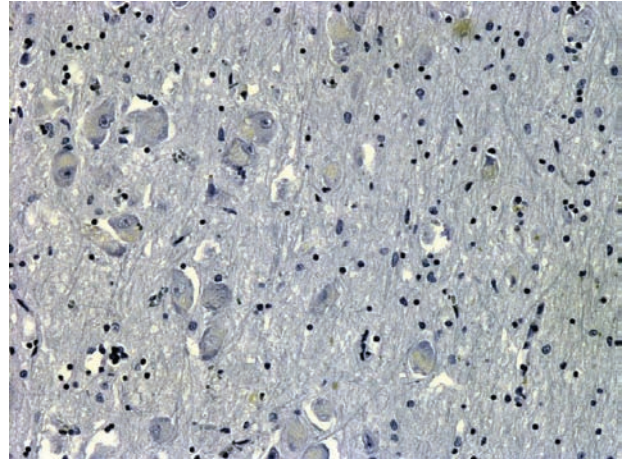


Fig. 6. Expression of progesterone in the medium-sized neurons with spines in the nucleus accumbens, male sex, 200 X magnification

types of neurons; it was extra nuclear, granular in appearance and mostly having middle to low staining intensity (Fig. 4).

The expression of progesterone in medium-sized neurons with spines in the female brain was very discreet, present on a very small number of neurons; it was extra nuclear and with a low intensity (Fig. 5). The expression of progesterone in male brain neurons was distributed over a small number of neurons; it was extra nuclear and with very weak intensity (Fig. 6).

DISCUSSION

Hormonal changes can directly induce changes in the plasticity of spines secreted peripherally (taken exogenously) and can be metabolized locally through a variety of hormone receptors. It was hypothesized that hormone-dependent dendritic plasticity that leads to changes in dendritic architecture, depends on the effects of hormones. Gonadal hormones have powerful effects on brain structure. They control animal behavior.

Estrogen, with its clearly defined role in reproductive functions, performs various activities in many regions of the nervous system that affect high cognitive functions, pain mechanisms, fine motor skills,

Table 1. Morphological characteristics of shell medium-spiny neurons of nc. accumbens

shell	male	female	Σ
D max	21.59 \pm 3.64 μm	23.12 \pm 3.21 μm	n.s.
D min	8.76 \pm 0.84 μm	9.58 \pm 0.72 μm	n.s.
vol	866.25 \pm 176.7 μm^3	1110.97 \pm 126.7 μm^3	n.s.
spine density	6.4 \pm 0.8	8.6 \pm 0.5	p<0.01

D max – maximal diameter of soma, D min – minimal diameter of soma, vol – volume of soma

Table 2. Morphological characteristics of core medium-spiny neurons of nc. accumbens

core	male	female	Σ
D max	22.72 \pm 1.24 μm	24.22 \pm 1.54 μm	n.s.
D min	14.33 \pm 2.26 μm	15.44 \pm 2.13 μm	n.s.
vol	2529.79 \pm 457.5 μm^3	3133.47 \pm 324.5 μm^3	n.s.
spine density	6.9 \pm 0.8	9.2 \pm 0.9	p<0.01

D max – maximal diameter of soma, D min – minimal diameter of soma, vol – volume of soma

mood and susceptibility to seizures. Estrogen also has a neuroprotective role against stroke and Alzheimer's disease. Estrogen activity is achieved through two distinct intracellular estrogen receptors, $\text{Er}\alpha$ and $\text{Er}\beta$, which are found in the nucleus of some neurons, and through some less typical mechanisms.

Estrogen causes a change in the dendritic plasticity of spines in the hippocampus, ventromedial nucleus and C1 pyramidal-like neurons of the dorsal hippocampus (Weiland et al., 1997). Estrogen most likely increases the density of spines in pyramidal-like neurons by indirect mechanisms.

Current literature indicates that female rats are more sensitive to cocaine addiction than male rats and may be more vulnerable to the powerful effects of psychostimulants (Chen and Kandel, 2002; Kosten, 1993). These studies have revealed different patterns of sexual behavior in response to cocaine at all stages of addiction, including initiation, maintenance and relapse (Lynch et al., 2002). A clearer picture that is emerging indicates the biological basis of sex-specific differences in addiction to cocaine, and that they are differently regulated in the CNS of male and female rats by gonadal hormones (Festa, and Quinones-Jenab, 2004).

When we examined the spine density, we noticed sexual dimorphism in both subregions (core and shell), and at the level of the entire nucleus accumbens in terms of higher density in females. Similar results were registered by Forlano and Wooley (2010) who noted a higher spine density in female rats at the core of the nucleus accumbens, as well as at the level of the whole nucleus, but not at the level of the shell. We have shown that the spine density was higher in women, thus the lower spine density in men suggests that dopamine has a smaller impact on the NA.

These differences are evident in the density of spines, especially on the distal (secondary and tertiary) dendrites of medium-sized neurons with spines. This tells us that early embryonic development defines the morphology of the neurons, and that later pubertal modulates these neurons by reward conditioned behavior (Forlano and Woolley, 2010).

After examining the synaptic activity of NAK and spine density, Wisman et al. (2011) concluded that the density of synapses is higher in female rats than in males and that it is higher in the core than in the shell of NAK. We registered a significantly higher expression of extra nuclear estrogen receptors

ER α , in the neurons of NAK in women than in men. As for the expression of extra nuclear progesterone receptors PR, in general, it is considerably less than the expression of ER α in both sexes. Similar gender differences, but on the other structures of the brain, were also obtained by other authors (Lenz et al., 2012; Quadros et al., 2002).

It is known that during embryonic development, testicular secretion leads to sexual dimorphism in brain organization (Breedlove and Jordan, 2001). There are also the effects of exposure to gonadal hormones during puberty that contribute to different brain development and behavior (Romeo and Sisk, 2001; McEwen, 2001). Estradiol is known as a hormone that affects many aspects of behavior, as well as in the processes of addiction (Pellis, 2002; Hu and Becker, 2003). In experimental animals, it was observed that high doses of estradiol enhances cocaine addiction (Robinson and Berridge, 2000).

Estradiol stimulates dopamine release in the ventral and dorsal striatum (nc. caudatus, putamen and nc. accumbens), increases dopamine takeover in NAK, influencing the density of receptors for dopamine (Lynch et al., 2001). The ability of estradiol to facilitate dopaminergic activity is considered key to enhancing the effects of cocaine on behavior in females (Jelks et al., 2007). Steroid hormones and their receptors are powerful regulators of gene transcription in the CNS and have the potential to change permanently the structure and function of the developing brain. In our study, we have shown sexual dimorphism in the expression of extra nuclear estrogen and progesterone receptors in the neurons of the human nucleus accumbens.

REFERENCES

- Breedlove, S.M., and C.L. Jordan (2001). The increasingly plastic, hormone-responsive adult brain. *Proc Natl Acad Sci USA*, **98**(6), 2956-7
- Chen, K., and D. Kandel (2002). Relationship between extent of cocaine use and dependence among adolescents and adults in the United States; *Drug Alcohol Depend.*, **68**(1), 65-85.
- De Vries, G.J., Rissman, E.F., Simerly, R.B., Yang, L.Y., Scordalakes, E.M., Auger, C.J., Swain, A., Lovell-Badge, R., Burgoyne, P.S., and A.P. Arnold (2002). A model system for study of sex chromosome effects on sexually dimorphic neural and behavioral traits. *J Neurosci.* **22**(20), 9005-14.
- Festa, E.D., and V. Quinones-Jenab (2004). Gonadal hormones provide the biological basis for sex differences in behavioral responses to cocaine; *Hormones and Behavior*, **46**, 509-519
- Forlano, P.M., and C.S. Woolley (2010). Quantitative analysis of pre- and postsynaptic sex differences in the nucleus accumbens; *Comp Neurol.* **518**(8), 1330-1348.
- Hoebel, B.G., Hernandez, L., Schwartz, D.H., Mark, G.P., and G.A. Hunter (1989). Microdialysis studies of brain norepinephrine, serotonin, and dopamine release during ingestive behavior, theoretical and clinical implications. *Ann NY Acad Sci*, **575**, 171-91.
- Hu, M., and J.B. Becker (2003). Effects of sex and estrogen on behavioral sensitization to cocaine in rats; *J Neurosci.* **23**(2), 693-9.
- Jelks, K.B., Wylie, R, Floyd, C.L., McAllister, A.K., and P.J. Wise (2007). Estradiol targets synaptic proteins to induce glutamatergic synapse formation in cultured hippocampal neurons: critical role of estrogen receptor-alpha; *Neurosci.* **27**(26), 6903-13.
- Kosten, T.R. (1993) Clinical and research perspectives on cocaine abuse: the pharmacotherapy of cocaine abuse; *NIDA Res Monogr.* **135**, 48-56.
- Lenz, K.M., Nugent, B.M., and M.M. McCarthy (2012). Sexual differentiation of the rodent brain: dogma and beyond; *Front Neurosci.*, **6**, 26.
- Lynch, W.J., Roth, M.E., Mickelberg, J.L., and M.E. Carroll (2001). Role of estrogen in the acquisition of intravenously self-administered cocaine in female rats; *Pharmacol Biochem Behav.* **68**(4), 641-6.
- Lynch, W.J., Roth, M.E., and M.E. Carroll (2002). Biological basis of sex differences in drug abuse: preclinical and clinical studies; *Psychopharmacology (Berl)*. **164**(2), 121-37.
- Mc Donald, A.J. (1991). Topographical organization of amygdaloid projections to the caudoputamen, nc. accumbens, and related striatal-like areas of the rat brain. *Neuroscience*, **44**(1), 15-33.
- McEwen, B.S. (2001) Invited review. Estrogens effects on the brain: multiple sites and molecular mechanisms. *J Appl Physiol.* **91**(6), 2785-801.
- Pellis, S.M. (2002). Sex differences in play fighting revisited: traditional and nontraditional mechanisms of sexual differentiation in rats. *Arch Sex Behav.* **31**(1), 17-26.
- Quadros, P.S., Pfau, J.L., Goldstein, A.Y., De Vries, G.J., and C.K. Wagner (2002). Sex differences in progesterone receptor

expression: a potential mechanism for estradiol-mediated sexual differentiation; *Endocrinology*. **143**(10), 3727-39.

Ramon y Cajal, S. (1911). *Histologie du Systeme Nerveux de l'Homme et des Vertebres*. Marloine; Paris

Robinson, T.E., and K.C., Berridge (2000). The psychology and neurobiology of addiction: an incentive-sensitization view. *Addiction*. **95** Suppl 2:S91-117

Romeo, R.D., and C.L.Sisk (2001). Pubertal and seasonal plasticity in the amygdala. *Brain Res*. **889**(1-2):71-7.

Weiland, N.G., Orikasa, C., Hayash,i S., and B.S. McEwen (1997). Distribution and hormone regulation of estrogen receptor immunoreactive cells in the hippocampus of male and female rats. *J Comp Neurol*. **388**(4):603-12.

Wissman, A.M., May, R.M., and C.S. Woolley (2011). Ultrastructural analysis of sex differences in nucleus accumbens synaptic connectivity; *Brain Struct Funct*. **217**(2):181-90.

