

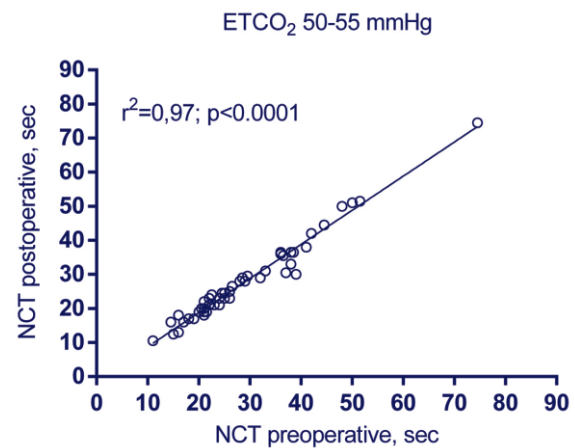
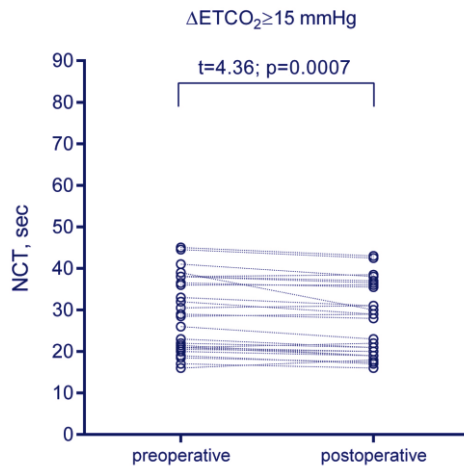
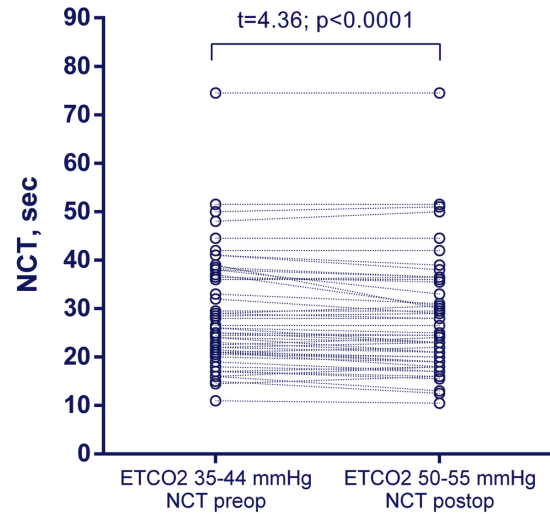
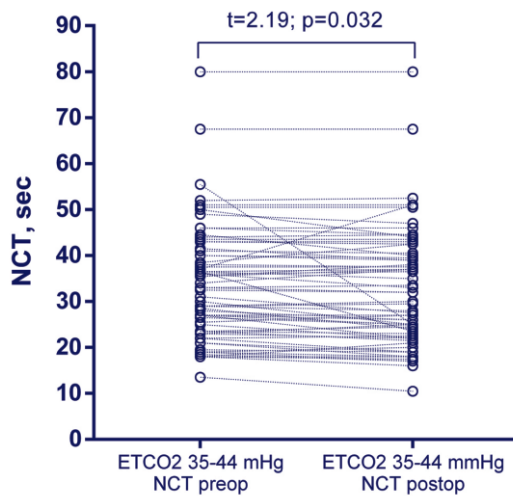


Categoria C

**CONTENT HIGHLIGHTS:**

**Victoria Rusu et al.**

Postoperative neurocognitive status of patients in relation with the carbon dioxide end-tidal level during anesthesia in laparoscopic cholecystectomy: prospective, randomized, experimental study



Categoria C (hotărârea CSSDT/CNA nr. 224 din 01.10.2015)  
înregistrată la IBN/IDSI la 16.11.2015



# GROPRINOSIN®

inozine pranobex, 500mg

*Creat pentru a învinge virușii!*

**PREPARAT IMUNOMODULATOR CU ACȚIUNE ANTIVIRALĂ**



Nr. 14425 din 18.08.2009

- **preîntâmpină și stopează dezvoltarea infecției virale**
- **scade gravitatea simptomatologiei și perioada de boală**
- **restabilește imunitatea și scade numărul complicațiilor**



GEDEON RICHTER

## SUMAR

## CONTENT

EDITORIAL	EDITORIAL
<b>Gabriel M. Gurman</b>	<b>Gabriel M. Gurman</b>
Somnul nostru cel de toate nopțile	Our sleep of all nights
ARTICOL ORIGINAL	ORIGINAL ARTICLE
<b>Victoria Rusu, Ghenadie Severin, Petru Rusu, Adrian Belii</b>	<b>Victoria Rusu, Ghenadie Severin, Petru Rusu, Adrian Belii</b>
Statutul neurocognitiv postoperatoriu al pacienților în funcție de nivelul de bioxid de carbon expirat intraanestezic în colecistectomia laparoscopică: studiu prospectiv, randomizat, experimental	Postoperative neurocognitive status of patients in relation with the carbon dioxide end-tidal level during anesthesia in laparoscopic cholecystectomy: prospective, randomized, experimental study
ARTICOLE DE CERCETARE	ARTICOLE DE CERCETARE
<b>Andrei Olaru</b>	<b>Andrei Olaru</b>
Evaluarea durerii după tratamentul chirurgical combinat al pacienților cu metastaze spinale: studiu prospectiv, consecutiv, descriptiv	Pain assessment after combined surgical treatment of patients with spinal metastases: prospective, consecutive, descriptive study
<b>Andrei Bradu, Emil Ceban</b>	<b>Andrei Bradu, Emil Ceban</b>
Rolul densitometriei prin tomografie computerizată în evaluarea rezultatelor tratamentului prin litotriție extracorporală cu unde de șoc al calculilor renoureterali: studiu prospectiv, descriptiv	The role of computed tomography densitometry in assessing the outcomes of extracorporeal shock wave lithotripsy of reno-ureteral calculi: prospective, descriptive study
<b>Veronica Sardari, Olga Mihalciuc, Inna Șveț, Lilia Andronache, Olga Tagadiuc, Valentin Gudumac</b>	<b>Veronica Sardari, Olga Mihalciuc, Inna Svet, Lilia Andronache, Olga Tagadiuc, Valentin Gudumac</b>
Influența unor compuși bioactivi autohtoni asupra indicilor metabolismului glucidic în țesutul osos în osteopatiile experimentale	Influence of some local bioactive compounds on indices of carbohydrate metabolism in bone tissue in experimental osteopathies
<b>Nataliya Kresyun, Leonid Godlevsky</b>	<b>Nataliya Kresyun, Leonid Goldlevsky</b>
Diagnosticul retinopatiei diabetice, bazat pe analiza comparativă a depigmentării zonei maculare: studiu experimental	Diabetic retinopathy diagnostics via comparative analysis of macular zone depigmentation: experimental study
<b>Alina Jucov, Svetlana Țurcan</b>	<b>Alina Jucov, Svetlana Turcan</b>
Rata markerilor hepatitelor virale B și C la pacienții cu colită ulcerativă: studiu prospectiv, comparativ, descriptiv	Rate of viral hepatitis B and C markers in patients with ulcerative colitis: prospective, comparative, descriptive study
<b>Alina Malic</b>	<b>Alina Malic</b>
Aspectele clinice, microbiologice și eficacitatea tratamentului tuberculozei pulmonare rezistente: studiu retrospectiv, comparativ, pe serie de cazuri	Clinical, microbiological particularities and treatment effectiveness of resistant pulmonary tuberculosis: retrospective, comparative, case series study

<b>Cornelia Guțu-Bahov, Radu Avădăanii, Tatiana Dumitraș, Victor Garbuz</b> Managementul donatorului marginal în moarte cerebrală: experiența Republicii Moldova	74	<b>Cornelia Gutu-Bahov, Radu Avadani, Tatiana Dumitras, Victor Garbuz</b> Management of the brain-dead extended donor: the experience of Republic of Moldova
<b>ARTICOLE DE SINTEZĂ</b> <b>Elena Visternicean, Veaceslav Moșin</b> Hiperhomocisteinemia ca factor potențial de risc pentru patologia obstetricală: sinteză de literatură	81	<b>REVIEW ARTICLES</b> <b>Elena Visternicean, Veaceslav Mosin</b> Hyperhomocysteinemia as a potential risk factor for obstetric pathology: review article
<b>Larisa Crivceanscaia</b> Administrarea surfactantului la nou-născuții prematuri: sinteză narativă de literatură	92	<b>Larisa Crivceanscaia</b> Surfactant administration in premature newborns: narrative synthesis of literature
<b>IMAGINI DIN PRACTICA CLINICĂ</b> <b>Victor Botnaru,</b> Modificările sistemice – apanajul astmului bronșic dificil?	104	<b>IMAGES FROM CLINICAL PRACTICE</b> <b>Victor Botnaru,</b> Are systemic changes an attribute of difficult asthma?
Ghidul autorului	109	Guidelines for authors
Scrisoare de însoțire	118	Cover letter
Declarația autorilor	119	Authorship statement

# Revista de Științe ale Sănătății din Moldova

## Moldovan Journal of Health Sciences

Ediție bilingvă: română, engleză

### Fondator:

Instituția Publică Universitatea de Stat de Medicină și Farmacie „Nicolae Testemițanu” din Republica Moldova

### Redactor-șef:

Adrian Belii, dr. hab. șt. med., profesor universitar

### Colectivul redacției:

Liviu Belii, redactor stilist de limbă română

Viorica Cazac, redactor stilist de limbă engleză

Tatiana Jechiu, redactor stilist de limbă engleză, netitular  
Iana Burmistr, redactor stilist de limbă engleză, netitular

Adresa redacției:  
biroul 407, blocul Administrativ, Universitatea de Stat de Medicină și Farmacie „Nicolae Testemițanu”, bd. Ștefan cel Mare și Sfânt, 165, Chișinău, Republica Moldova, MD-2004

Bilingual edition: Romanian, English

### Founder:

Public Institution Nicolae Testemitanu State University of Medicine and Pharmacy from Republic of Moldova

### Editor-in-chief:

Adrian Belii, PhD, university professor

### Editorial staff:

Viorica Cazac, English redactor

Liviu Belii, Romanian redactor

Tatiana Jechiu, English redactor, freelancer

Iana Burmistr, English redactor, freelancer

### Address of Editorial Office:

office 407; Administrative building, Nicolae Testemitanu State University of Medicine and Pharmacy bd. Ștefan cel Mare și Sfânt, 165, Chișinău, Republic of Moldova, MD-2004

Editat: Tipografia „Sirius”

Tiraj: 350 ex.

Înregistrat la Ministerul Justiției cu nr. 290 din 01 august 2014

Categoria C (hotărârea comună a CSȘDT/CNAA nr. 224 din 01 oct. 2015)  
Înregistrat IBN/IDSI la 16 noi. 2015

## Editorial board

### HONORARY MEMBERS

Ababii Ion, PhD, university professor, academician of ASM (Republic of Moldova)

Ghidirim Gheorghe, PhD, university professor, academician of ASM (Republic of Moldova)

Gudumac Eva, PhD, university professor, academician of ASM (Republic of Moldova)

### LOCAL EDITORIAL BOARD („NICOLAE TESTEMITANU” STATE UNIVERSITY OF MEDICINE AND PHARMACY OF REPUBLIC OF MOLDOVA)

Balica Ion, PhD, associate professor

Bendelic Eugen, PhD, university professor

Bețiu Mircea, PhD, associate professor

Botnaru Victor, PhD, university professor

Catereniuc Ilia, PhD, university professor

Cernețchi Olga, PhD, university professor

Ciobanu Gheorghe, PhD, university professor

Ciocanu Mihai, PhD, university professor

Ciubotaru Anatol, PhD, university professor

Corcimaru Ion, PhD, university professor, correspondent member of ASM

Croitor Gheorghe, PhD, university professor

Curocichin Ghenadie, PhD, university professor

Gavriliuc Mihai, PhD, university professor

Ghicavăi Victor, PhD, university professor, correspondent member of ASM

Gamma Rodica, PhD, MPH, associate professor

Groppa Liliana, PhD, university professor

Groppa Stanislav, PhD, university professor, academician of ASM

Gudumac Valentin, PhD, university professor

Guțu Eugen, PhD, university professor

Holban Tiberiu, PhD, university professor

Hotineanu Vladimir, PhD, university professor, correspondent member of ASM

Lozan Oleg, PhD, MPH, university professor

Matcovschi Sergiu, PhD, university professor

Mereuță Ion, PhD, university professor

Nacu Anatolie, PhD, university professor

Opopol Nicolae, PhD, university professor, correspondent member of ASM

Popescu Irinel, PhD, university professor

Popovici Mihai, PhD, university professor, academician of ASM

Prisacari Viorel, PhD, university professor, correspondent member of ASM

Revenco Valerian, PhD, university professor

Rojnoveanu Gheorghe, PhD, university professor

Rudic Valeriu, PhD, university professor, academician of ASM

Safta Vladimir, PhD, university professor

Știuca Svetlana, PhD, university professor

Țăbărnă Gheorghe, PhD, university professor, academician of ASM

Tagadiuc Olga, PhD, university professor

Tănase Adrian, PhD, university professor

Topalo Valentin, PhD, university professor

Țurcan Svetlana, PhD, associate professor

Valica Vladimir, PhD, university professor

Vorojbit Valentina, PhD, associate professor

Vovc Victor, PhD, university professor

Zota Ieremia, PhD, university professor, correspondent member of ASM

### INTERNATIONAL EDITORIAL BOARD

Acalovschi Iurie, PhD, university professor (Iuliu Hatieganu University of Medicine and Pharmacy, Cluj-Napoca, Romania)

Beuran Mircea, PhD, university professor (Carol Davila University of Medicine and Pharmacy, Bucharest, Romania)

Beydon Laurent, PhD, university professor (Faculty of Medicine, Angers University, Angers, France)

Bruhl Sorin, PhD, university professor (Mayo Clinic, Jacksonville, Florida, USA)

Cebotari Serghei, PhD, researcher (Hanover Medical School, Hanover, Germany)

Dmytriiev Dmytro, PhD, associate professor (N. I. Pirogov, National Medical University, Vinnitsa, Ukraine)

Kostin Sawa, PhD, university professor (Max Planck Institute for Heart and Lung Research, Giessen, Germany)

Grigoraș Ioana, PhD, university professor (Grigore T. Popa University of Medicine and Pharmacy, Iasi, Romania)

Gurman Gabriel, PhD, professor emeritus (Ben Gurion University of the Negev, Beer Sheva, Israel)

Lebedinsky Konstantin, PhD, university professor (Medical Academy of Postgraduate Studies, Sankt Petersburg, Russia)

Popa Florian, PhD, university professor (Carol Davila University of Medicine and Pharmacy, Bucharest, Romania)

Raica Marius, PhD, university professor (Victor Babes University of Medicine and Pharmacy, Timisoara, Romania)

Săndesc Dorel, PhD, university professor (Victor Babes University of Medicine and Pharmacy, Timisoara, Romania)

Tărcoveanu Eugen, PhD, university professor (Grigore T. Popa University of Medicine and Pharmacy, Iasi, Romania)

Tinică Grigore, PhD, university professor (Grigore T. Popa University of Medicine and Pharmacy, Iasi, Romania)

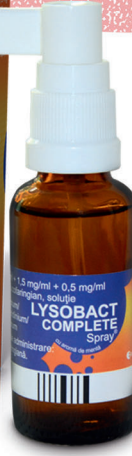
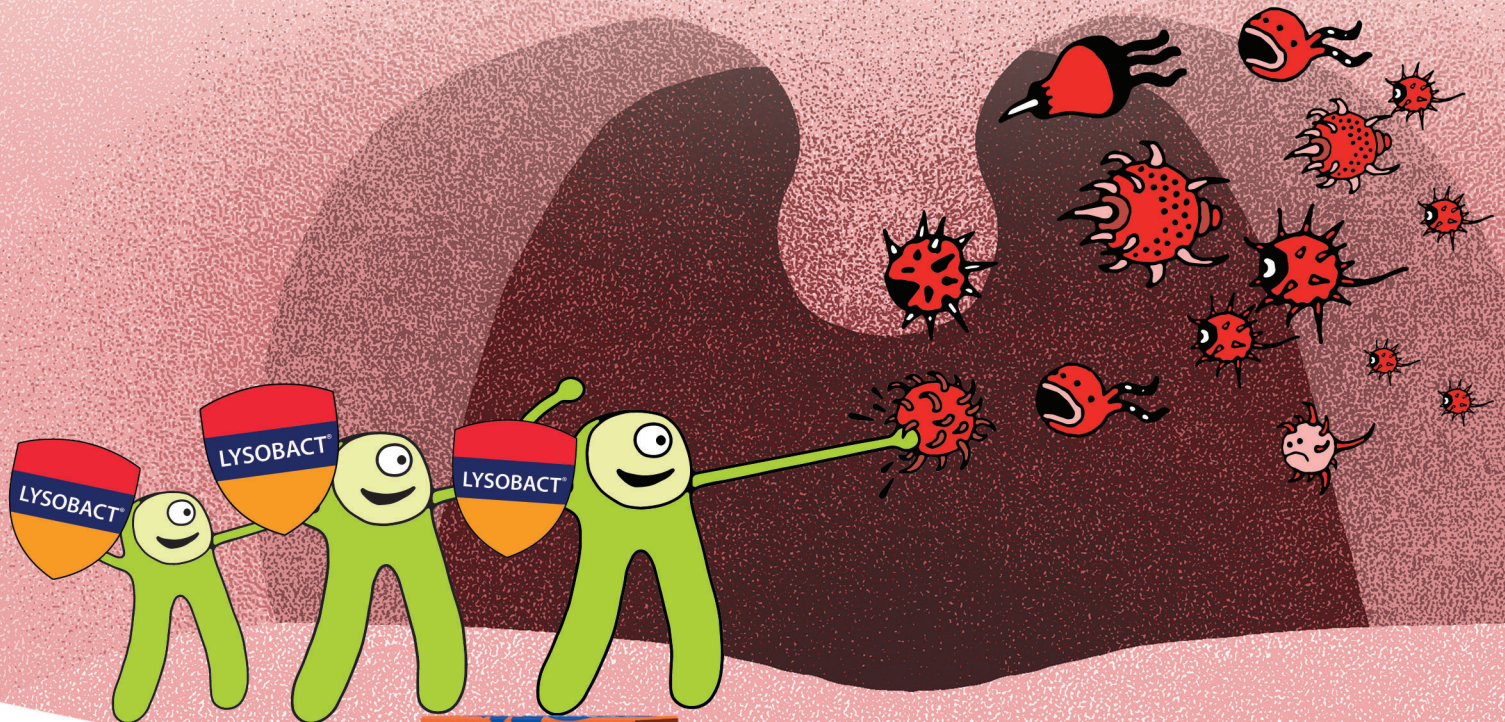
Todiraș Mihail, PhD, scientist (Max Delbrück Center for Molecular Medicine, Berlin, Germany)

Toma Vasilovski Ian, PhD, university professor (George Washington University Medical Center, Washington, USA)

Zaporozhan Valery, PhD, university professor, academician (Odessa National University of Medicine, Odessa, Ukraine)

# LYSOBACT®

## ЛЕЧИТ ГОРЛО ЕСТЕСТВЕННО!



ТЕПЕРЬ И В НОВЫХ КОМБИНИРОВАННЫХ ФОРМАХ - ТАБЛЕТКАХ ДЛЯ РАССАСЫВАНИЯ LYSOBACT DUO® И ДВУХ ФОРМАХ СПРЭЙВ.



**ЛИЗОЦИМ – ЕСТЕСТВЕННЫЙ ДЛЯ ОРГАНИЗМА ЧЕЛОВЕКА АНТИБАКТЕРИАЛЬНЫЙ ФЕРМЕНТ.**

- УСТРАНЯЕТ ПРИЧИНУ **БОЛИ В ГОРЛЕ**
- ОБЛАДАЕТ ШИРОКИМ СПЕКТРОМ ДЕЙСТВИЯ (БАКТЕРИИ, ВИРУСЫ, ГРИБЫ)

- СОХРАНЯЕТ ПОЛЕЗНУЮ МИКРОФЛОРУ\*
- УСКОРЯЕТ ВЫЗДОРОВЛЕНИЕ\*

\* Погорелова О.О., Усенко Д.В., Ардатская М.Д., Дикая А.В., Горелов А.В. Оценка эффективности Лизобакта в лечении острых респираторных заболеваний у детей // Инфекционные болезни. 2009. 7(1). С. 69–72. Это лекарство. Прочитайте внимательно инструкцию. В случае возникновения побочных эффектов обратитесь к врачу или фармацевту.

EDITORIAL

## Somnul nostru cel de toate nopțile

**Motto:**

„Somnul pare a fi modalitatea cea mai eficace de restaurare a funcțiilor psihosomatice ale organismului.”

(Matthew P. Walker)

Autorul citatului alăturat, Matthew P. Walker, fost profesor de psihiatrie la Harvard, în prezent – profesor de neuroștiințe la Berkeley și directorul laboratorului de somn și neuroimagingistică de la universitatea californiană, reușește să rezume, în doar câteva cuvinte, un subiect cu implicații foarte importante pentru publicul larg. Până la urmă, câte aspecte ale vieții cotidiene reprezintă un interes de importanță identică pentru medic și pentru pacienții săi? Subiectul „somn” răspunde perfect la această întrebare. Fiziologia și fiziopatologia somnului sunt și au fost subiecte de interes pentru cercetători, dar și pentru clinicieni, psihologi, antropologi și psihiatri.

Somnul e considerat un element esențial în refacerea funcțiilor vitale. Perioada de somn e una anabolică pentru toate sistemele organismului. Supremația parasimpatică din timpul somnului oferă organismului o valoroasă perioadă de relaxare și pauză în multe din funcțiile sale. Un somn eficace reface capacitatea de memorizare, crește nivelul atenției și reduce, într-o bună măsură, gradul de anxietate. Mai mult, unele studii indică influența pozitivă a somnului asupra activității sistemului imunitar și asupra procesului de vindecare a plăgilor.

Interesant e felul cum a evoluat societatea umană în ceea ce privește somnul. În era preistorică, individul dormea de câteva ori pe zi, cele 24 de ore erau împărțite în mai multe perioade de activitate, întrerupte de alte perioade de somn. Pe parcurs, noțiunea de somn postprandial, așa-numita *siesta* sau *schlafstunden*, a devenit un fenomen curent, individul întrerupându-și activitatea la mijlocul zilei cu scopul de a recupera forța de muncă și abilitatea de a continua să lucreze până mai spre seară. Un studiu relativ recent demonstrează chiar un fapt oarecum neașteptat: somnul postprandial reduce în mod semnificativ pericolul insuficienței coronariene.

Epoca modernă, de după al Doilea Război Mondial, a schimbat cu desăvârșire modul în care era tratat somnul ca mijloc eficace și obligatoriu în vederea asigurării continuității activității cotidiene. Așa-numiții *workaholici*, suferind de o cumplită dependență de muncă, nu mai respectă sfântul principiu al odihnei obligatorii. Ziua de muncă se prelungeste, nu-

EDITORIAL

## Our sleep of all nights

**Motto:**

„Sleep seems to be the most effective way to restore the body's psychosomatic functions.”

(Matthew P. Walker)

The author of this quote, Matthew P. Walker, former professor of psychiatry at Harvard, currently – a Berkeley neuroscience professor and director of the Sleep and Neuroimaging Laboratory at Californian University, manages to sum up in a few words, a subject with great implications for the general public. After all, how many aspects of everyday life are of equal importance to the doctor and his patients? The subject “sleep” perfectly answers this question. Physiology and sleep pathophysiology are and were subjects of interest to researchers, but also to clinicians, psychologists, anthropologists and psychiatrists.

Sleep is considered an essential element in restoring vital functions. Sleep is an anabolic one for all body systems. Parasympathetic supremacy during sleep, provides the body with a valuable period of relaxation and rest in many of its functions. Effective sleep restores memory capacity, increases attention and reduces the degree of anxiety. Furthermore, some studies shows the positive influence of sleep on immune system activity and on the wound healing process.

Interesting is the way, how human society has evolved in terms of sleep. In the prehistoric era, the individual slept several times a day, the 24 hours were divided into several periods of activity, interrupted by other periods of sleep. Along the way, the notion of sleeping after the lunch, the so-called *siesta* or *schlafstunden*, has become a current phenomenon, the individual interrupting his activity in the middle of the day, in order to recover the workforce and the ability to continue working until evening. A relatively recent study even demonstrates a rather unexpected fact: sleeping after lunch reduces significantly the risk of coronary insufficiency.

The modern era, after the Second World War, completely changed the way sleep was treated as an effective and binding, means to ensure the continuity of everyday work. The so-called *workaholics*, suffering from a terrible dependence on work, no longer respects the holy principle of compulsory rest. The working day is prolonged, the number of hours of

mărul orelor de somn scade, dar, de cele mai multe ori, efectul obținut e contrar așteptărilor: eficacitatea activității diminuează evident, iar prețul plătit pentru acest fel de viață devine uneori prea ridicat și periculos. Statisticile indică o proporție înaltă (30-35%) din adulții epocii moderne care suferă de lipsă cronică de somn. Această stare de fapte continuă și în ziua de azi, în multe părți ale lumii, în multe întreprinderi și instituții medicale.

Nu pot să nu-mi aduc aminte de un celebru chirurg israelian care, observându-și rezidenții strecurându-se pe ușa din spate a secției în jurul orei 7 seara, îi oprea întrebându-i, în mod cinic, dacă lucrează doar o jumătate de normă. Și mă simt obligat să amintesc aici celebra definiție ironică a anesteziștului: un medic pe jumătate adormit (adică, extenuat și aflat sub influența vaporilor anestezici) lângă un pacient pe jumătate treaz (adică, insuficient anesteziat și supravegheat).

Această discuție conduce, inevitabil, la subiectul gărzilor efectuate de medicii de spital. Această temă e spinoasă, dureroasă și necesită nu numai dezbateri, dar și măsuri pentru a transforma garda într-o activitate acceptabilă și mai puțin dăunătoare pentru medic și pentru pacienții săi.

În vremuri nu foarte îndepărtate, pe cele două părți ale Atlanticului, activitatea internului de spital presupunea permanenta sa prezență la locul de muncă (de unde și numele funcției), el aflându-se la dispoziția secției, a camerei de gardă sau a sălii de operații 24 de ore din 24. E adevărat, funcția de intern era apanajul vârstei tinere, dar, treptat, ideea accesibilității medicului dedicat muncii de spital și-a găsit un loc de cinste și în activitatea specialistului, aflat la apogeul carierei sale profesionale. De exemplu, practica gărzilor duble, de sfârșit de săptămână, a existat și înflorit vreme de zeci de ani și încă se mai găsesc, pe ici pe colo, reminiscențe ale acestei practici incorecte.

Dar, chiar în condiții „ideale”, care, de fapt, nu au nimic în comun cu necesitatea de a respecta perioadele de odihnă ale medicului, acesta e privat, în cele mai multe cazuri, de perioade, chiar scurte, de somn neîntrerupt.

Inutil a accentua că, în aceste condiții, accesul medicului la perioade de relaxare și somn era (încă este) extrem de limitat. Ba, mai mult, frecvențele întreruperi ale unor scurte perioade de somn din cauza multiplelor chemări pentru a rezolva situații urgente, agravează și mai mult starea de lucruri.

Studii efectuate pe medici rezidenți au indicat, fără drept de apel, o situație periculoasă pentru pacientul aflat sub îngrijirea unui medic extenuat. Afectarea atenției și a memoriei duc la greșeli de discernământ clinic și de reducere semnificativă a îndemnării profesionale a medicului aflat în picioare, la locul de muncă, zeci de ore în șir. Încercările, de multe ori foarte reușite, de a mări semnificativ suma de plată pentru orele de gardă, au ca efect (așteptat!) înrobirea medicului dornic să-și completeze venitul lunar, adică creșterea numărului de gărzi lunare sau săptămânale, în detrimentul stării sale de sănătate, cu un clar pericol și pentru pacientul aflat în îngrijirea sa. De aici până la efectele negative de lungă durată ale privării de somn nu e decât un pas.

Dependența de alcool și de droguri e doar unul din gravele aspecte ale supraîncărcării programului de lucru al medicului.

sleep decreases, but most often the effect is contrary to expectations: the effectiveness of the activity diminishes obviously, and the price paid for this kind of life is sometimes too high and dangerous. Statistics show a high proportion (30-35%) of modern-day adults suffering from chronic sleep deprivation. This state of facts continues today in many parts of the world, in many businesses and medical institutions.

I remember a famous Israeli surgeon who, observing his residents slipping on the back door of the section around 7 o'clock, stopped them by asking them cynically if they only worked half a dozen norm. And I feel obliged to recall here the famous ironic definition of the anesthetist: a half-sleeping physician (*i.e.*, exhausted and under the influence of anesthetic vapor) next to a half-awake patient (*i.e.*, insufficiently anaesthetized and supervised).

This discussion, inevitably leads to the subject of guards made by hospital doctors. This theme is thorny, painful and requires not only debates, but also measures to turn the guard into an acceptable and less harmful activity for the physician and his patients.

In not far away times, on both sides of the Atlantic, the hospital's internship assumed its permanent presence at the workplace (hence the name of the function), being at the disposal of the department, the guard room or the operating room – 24 hours a day. It is true, that the resident's function, was the aptitude of the young age, but gradually, the idea of accessing of the doctor for hospital work, has also found a place of honor in the work of the specialist at the height of his professional career. For example, the practice of double guards, at the end of the week-end, has been blooming for decades, and there are still reminiscences of this incorrect practice.

But even under “ideal” conditions, which in fact have nothing in common with the need to respect the doctor's rest periods, it is in most cases private, even short, of uninterrupted sleep.

Needless to emphasize that, under these conditions, the doctor's access to relaxation and sleep, was (is still) extremely limited. Moreover, frequent interruptions of short sleep periods, due to multiple calls to resolve urgent situations, further aggravate the situation.

Studies conducted by resident doctors have indicated, without right of appeal, a dangerous situation for the patient under the care of an exhausted physician. Affecting attention and memory, lead to clinical misconceptions and significant decrease in the professional skills of the standing up physician, at the workplace, for dozens of hours. The attempts, often very successful, to significantly increase the payment amount for on-call time, have the effect (expected!) of the willing the doctor who wants to supplement his monthly income, meaning the increase in the number of monthly or weekly guards, to the view of his health condition, with a clear danger to the patient in his care. From here, to the long-term negative effects of sleep deprivation, is just one step.

Alcohol and drug addiction, is just one of the serious aspects of overloading the doctor's work schedule. Many guild



Mulți colegi de breaslă și-au exprimat nu o dată dorința de a înceta fumatul, dar s-au aflat în fața unei situații în care continua activitate în spital, trezirile frecvente în timpul gărzii și lipsa de somn i-au împiedicat s-o facă.

Anumite studii indică asocierea dintre lipsa de odihnă și apariția sindromului depresiv, cu cunoscutele sale efecte negative.

Stresul profesional și așa-numitul sindrom *burn out* (caracterizat prin completa lipsă de satisfacție profesională și dorința de a părăsi domeniul de activitate), reprezintă alte două, nu mai puțin grave, fenomene secundare ale privării de somn.

În mod cu totul paradoxal, societatea nu e unanimă în ceea ce privește importanța somnului pentru prezervarea unei stări normale de sănătate. Opinia, după care somnul ar fi, de fapt, o imensă pierdere de timp, încă predomină în anumite cercuri socioeconomice, care ignoră tot ce s-a studiat și observat din punct de vedere științific de-a lungul ultimelor decade. Și nu e de mirare că celebrul Benjamin Franklin era de părere că toți vom avea timp să ne odihnim... în mormânt!

Am mai amintit, la această rubrică, inițiativa israeliană care obligă, prin lege, administrația spitalului de a oferi medicului minimum două ore de somn în timpul unei gărzi de 24 de ore. În plus, legislația israeliană obligă eliberarea medicului de gardă de orice obligație profesională a doua zi dimineată. Ceea ce, bineînțeles, nu-l împiedică pe sârmanul medic, în căutare de venituri suplimentare, să continue să lucreze după gardă într-un alt spital sau centru medical, anulând în felul acesta posibilitatea de odihnă după o intensă activitate de 24 de ore.

În alte locuri, pe continental european, administrația medicală a preluat sistemul personalului paramedical, limitând garda la numai opt ore. În alte spitale, medicul de gardă se prezintă la locul de muncă doar la începerea gărzii, el prestând, de fapt, numai 16 ore de lucru și nu 24.

Ca în orice situație, existența mai multor soluții indică, de fapt, că niciuna nu rezolvă în întregime problema în cauză. Și, cu toate acestea, soluții există, ele trebuie încercate, ținând cont în mod permanent că privarea de somn e la fel de periculoasă pentru medic cum este pentru pacienții săi. Întrebarea care se impune e în ce măsură individul (în cazul nostru, medicul) e responsabil de prezervarea propriei sale stări de sănătate legată de respectul pentru somn și de efectele sale pozitive. Cel mai simplu lucru pe care fiecare dintre noi îl poate face e de a blama societatea, administrația și ministerele pentru faptul că suntem împiedicați în mod constant de a avea grijă de noi înșine, obligându-ne să lucrăm ore în șir, fără pauză și fără odihnă, să ingerăm cantități periculoase de cafeină pentru a ne menține treji și a aprinde o țigară de la alta pentru a nu adormi în timpul lucrului. Anecdota care circulă curent în Israel e traducerea celebrei expresii latine *mea culpa* în ebraică: *cu toții sunteți vinovați!* Dar literatura de specialitate indică în mod clar că o bună parte a soluțiilor pozitive stă în mâna și la îndemâna noastră.

De exemplu, e cunoscut efectul pozitiv al activității fizice asupra calității somnului. Această mențiune e necesară, având în vedere o tristă realitate și anume greutatea cu care individul stresat, obosit sau chiar epuizat fizic și psihic reușește să

colleagues have expressed no desire to stop smoking, but have faced a situation where continued hospital activity, frequent wakefulness and lack of sleep prevented them from doing so.

Some studies indicate the association between lack of rest and depressive syndrome with its known negative effects.

Professional stress and the so-called *burn out* syndrome (characterized by complete lack of professional satisfaction and the desire to leave the field of activity) are two more, not less serious, secondary phenomena of sleep deprivation.

Totally paradoxical, the society is not unanimous about the importance of sleep for preserving a normal state of health. The view, after which sleep is, in fact, a huge waste of time, still prevails in some socio-economic circles that ignore all that has been scientifically studied and observed over the past decades. And no wonder that the famous Benjamin Franklin thought we would all have time to rest ... in the tomb!

I have also mentioned, under this rubric, the Israeli initiative that obliges the hospital administration to give the doctor at least two hours of sleep during a 24-hour guard. In addition, Israeli legislation obliges the on-call doctor to release any professional duty the next morning. Which, of course, does not prevent the poor physician, seeking extra income, from continuing to work on guard in another hospital or medical center, thus canceling the possibility of rest after an intense 24-hour activity.

In other places, on the European continent, the medical administration took over the paramedical staff, limiting the guard to only eight hours. In other hospitals, the on-call physician is present at work only at the start of the guard, and in fact, he only provides 16 hours of work, and not 24 hours.

As in any case, the existence of several solutions indicates, in fact, that none of them resolves entirely the issue in question. And, however, solutions exist, they must be tried, always taking into account that sleep deprivation is as dangerous to the doctor as it is for his patients. The question is to what extent the individual (in our case, the doctor) is responsible for preserving his or her own health related to respect for sleep and its positive effects. The simplest thing, each of us can do, is to blame society, the administration and the ministries for being constantly prevented from taking care of ourselves, forcing us to work for hours, without pause and without rest, take in dangerous amounts the caffeine, to keep us awake and light a cigarette from another, to not fall asleep during work. The anecdote circulating in Israel is the translation of my famous Latin phrase *mea culpa* into Hebrew: *you are all guilty!* But the literature clearly indicates that much of the positive solution is in our hands and at our disposal.

For example, is known the positive effect of physical activity on the quality of sleep. This is necessary, because of a sad reality, namely the weight with which the individual stressed, tired or even exhausted physically and mentally, manages to fall asleep and not be affected by insomnia, so frequent in these situations. Half an hour of moderate exercise during the evening will considerably reduce the amount of time required to install deep sleep.

adoarmă și să nu fie afectat de insomnie, atât de frecventă în aceste situații. O jumătate de oră de exerciții fizice moderate în cursul serii va reduce considerabil timpul necesar până în momentul instalării somnului profund.

Durata somnului nu e mai puțin importantă decât calitatea sa. Cercetări în acest domeniu indică obligativitatea a cel puțin șase-șapte ore de somn pe zi, în total. Tendința spre somn în cursul zilei, așipitul pentru câteva momente la pupitrul de lucru, alături de aparatul de anestezie sau de ecograf, e o dovadă clară a lipsei cronice de somn și efectele sale negative sunt evidente.

În fine, se vorbește din ce în ce mai mult despre importanța unei alimentații corecte pentru calitatea somnului. Un studiu, publicat în 2011, a comparat efectul diverselor tipuri de alimentație asupra acestui parametru și a ajuns la concluzia că dieta bogată în proteine asigură un somn constant și fără perturbări. La celălalt capăt al scalei se află dieta bogată în glucide, care provoacă perturbări în continuitatea somnului și lungi perioade de veghe în cursul nopții.

Personal, sunt convins că cei mai mulți dintre noi oferă doar o importanță minoră calității și duratei somnului ca parte din ciclul circadian. Speranța mea e ca aceste rânduri să dea de gândit, dacă nu și mai mult.

**Prof. Dr. Gabriel M. Gurman**  
**Omer, Israel**  
**e-mail: gurman@bgu.ac.il**  
**Viața Medicală, nr. 27 din 2017.**

Sleep duration is no less important than its quality. Researches in this area, indicates the necessity of at least six to seven hours of sleep per day in total. The tendency to sleep during the day, for a few moments at the work desk, along with the anesthesia or ultrasound, is a clear evidence of a chronic lack of sleep and its negative effects are obvious.

Finally, there is a growing awareness of the importance of a proper diet for sleep quality. A study, published in 2011, compared the effect of different types of diet on this parameter, and concluded that a protein-rich diet ensures a constant, uninterrupted sleep. At the other end of the scale is a diet rich in carbohydrates, which causes disturbances in the continuity of sleep and long waking hours during the night.

Personally, I am convinced that most of us only offer a minor importance to the quality and duration of sleep, as part of the circadian cycle. My hope is that these lines give thought, if not more.

**Prof. Dr. Gabriel M. Gurman**  
**Omer, Israel**  
**e-mail: gurman@bgu.ac.il**  
**Medical Life, no. 27 of 2017.**

ARTICOL ORIGINAL

## Statutul neurocognitiv postoperatoriu al pacienților în funcție de nivelul de bioxid de carbon expirat intraanestezic în colecistectomia laparoscopică: studiu prospectiv, randomizat, experimental

Victoria Rusu<sup>1,2\*</sup>, Ghenadie Severin<sup>3</sup>, Petru Rusu<sup>2,4</sup>, Adrian Belii<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Catedra de anesteziologie și reanimatologie „Valeriu Ghereg”, Universitatea de Stat de Medicină și Farmacie „Nicolae Testemițanu”, Chișinău, Republica Moldova;

<sup>2</sup>Spitalul Clinic Municipal „Sfânta Treime”, Chișinău, Republica Moldova;

<sup>3</sup>Spitalul Clinic Municipal nr. 1, Chișinău, Republica Moldova;

<sup>4</sup>Catedra de anesteziologie și reanimatologie nr. 2, Universitatea de Stat de Medicină și Farmacie „Nicolae Testemițanu”, Chișinău, Republica Moldova.

Data primirii manuscrisului: 30.03.2017

Data acceptării spre publicare: 26.05.2017

### Autor corespondent:

Victoria Rusu, doctorand

Catedra de anesteziologie și reanimatologie „Valeriu Ghereg”

Universitatea de Stat de Medicină și Farmacie „Nicolae Testemițanu”

bd. Ștefan cel Mare și Sfânt, 165, Chișinău, Republica Moldova, MD-2004

e-mail: victoria\_rusu@mail.ru

### Ce nu este cunoscut, deocamdată, la subiectul abordat

Tradițional, ventilarea pulmonară artificială (VPA) intraanestezică a pacientului era efectuată în regim de hiperventilare moderată (ETCO<sub>2</sub>=33-35 mmHg) sau normoventilare (ETCO<sub>2</sub>=35-40 mmHg). Efectul ventilării cu hipercapnie permisivă (ETCO<sub>2</sub> ≥45 mmHg) intraanestezic asupra statutului neurocognitiv postoperatoriu al pacientului nu a fost, deocamdată, studiat.

### Ipoteza de cercetare

Ventilarea pulmonară artificială cu hipercapnie permisivă (ETCO<sub>2</sub>=45-55 mmHg) intraanestezic în colecistectomia laparoscopică nu afectează statutul neurocognitiv postoperatoriu al pacientului.

### Noutatea adusă literaturii științifice din domeniu

S-a constatat că VPA cu hipercapnie permisivă (ETCO<sub>2</sub>=45-55 mmHg) intraanestezic în colecistectomia laparoscopică nu afectează statutul neurocognitiv postoperatoriu al pacientului; mai mult decât atât, performanțele neurocognitive par a fi ameliorate.

ORIGINAL ARTICLE

## Postoperative neurocognitive status of patients in relation with the carbon dioxide end-tidal level during anesthesia in laparoscopic cholecystectomy: prospective, randomized, experimental study

Victoria Rusu<sup>1,2\*</sup>, Ghenadie Severin<sup>3</sup>, Petru Rusu<sup>2,4</sup>, Adrian Belii<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Chair of anesthesiology and reanimatology “Valeriu Ghereg”, Nicolae Testemitanu State University of Medicine and Pharmacy, Chisinau, Republic of Moldova;

<sup>2</sup>“Sfanta Treime” Clinical Municipal Hospital, Chisinau, Republic of Moldova;

<sup>3</sup>Clinical Municipal Hospital no. 1, Chisinau, Republic of Moldova;

<sup>4</sup>Chair of anesthesiology and reanimatology no. 2, Nicolae Testemitanu State University of Medicine and Pharmacy, Chisinau, Republic of Moldova.

Manuscript received on: 30.03.2017

Accepted for publication on: 26.05.2017

### Corresponding author:

Victoria Rusu, PhD fellow

Chair of anesthesiology and reanimatology “Valeriu Ghereg”

Nicolae Testemitanu State University of Medicine and Pharmacy

165, Stefan cel Mare si Sfânt ave., Chisinau, Republic of Moldova, MD-2004

e-mail: victoria\_rusu@mail.ru

### What is not known yet, about the topic

Traditionally, mechanical ventilation (MV) of the patient during anesthesia was made in a moderate hyperventilation regimen (ETCO<sub>2</sub>=33-35 mmHg) or normal ventilation (ETCO<sub>2</sub>=35-45 mmHg). The effect of permissive hypercapnia (ETCO<sub>2</sub> ≥45 mmHg) during anesthesia on the postoperative neurocognitive status of the patient has not been studied yet.

### Research hypothesis

Mechanical ventilation with permissive hypercapnia (ETCO<sub>2</sub>=45-55 mmHg) during surgery in laparoscopic cholecystectomy does not affect the postoperative neurocognitive status.

### Article's added novelty on this scientific topic

It has been established that MV with permissive hypercapnia (ETCO<sub>2</sub>=45-55 mmHg) during anesthesia in laparoscopic cholecystectomy does not affect the postoperative neurocognitive status; more than that, neurocognitive performances seem to improve.

## Rezumat

**Introducere.** Capnia este responsabilă de o serie de efecte fiziologice, cu impact clinic important. Ventilarea pulmonară artificială, pe durata anesteziei generale, poate asigura, separat, atât oxigenarea, cât și nivelul de  $\text{CO}_2$  din sânge. Hipercapnia moderată a fost asociată cu o trezire mai rapidă, cu bronhodilatare, cu reducerea riscului de infecție de plagă; totodată, hipercapnia a fost asociată cu acidoză respiratorie, vasoconstricție pulmonară hipoxică, creșterea presiunii intracerebrale. Nu a fost studiat, deocamdată, impactul hipercapniei moderate, induse intraanestezic, asupra funcției neurocognitive postoperatorii.

**Material și metode.** Studiu prospectiv, randomizat (eșantionare simplă, raport 1:2,5), experimental. Acordul Comitetului de Etică a Cercetării și al pacientului eligibil – obținute. Înrolați pacienții beneficiari de colecistectomie laparoscopică elective, fără comorbidități severe. Seturi de date complete, analizate – 177 (lotul „normocapnie” – 49 de pacienți; lotul „hipercapnie” – 128 de pacienți). Hipercapnia asigurată intraanestezic prin creșterea spațiului mort al circuitului respirator. Au fost înregistrați parametrii antropometrici, durata anesteziei, durata de spitalizare. Pentru evaluarea statutului neurocognitiv, a fost utilizat testul de conectare a numerelor (NCT). Teste statistice aplicate: t-Student pereche, bicaudal (pentru datele de tip continuu, cu distribuție normală), testul exact Fisher, pentru datele de tip categorie. Soft statistic utilizat: *GraphPad Prism, versiunea 6* (Graph Pad Software Inc, CA, SUA).

**Rezultate.** Loturile de studiu – omogene din punctul de vedere al repartizării pe sexe, masei corporale, înălțimii, duratei anesteziei și celei de spitalizare; eterogene după vârstă. Rezultatele testului NCT (în secunde), în funcție de valoarea intraanestezică a  $\text{ETCO}_2$ , respectiv, pentru starea de normocapnie (31,8 [28,8 – 34,8] vs. 33,0 [30,0 – 35,9],  $p=0,032$ ), hipercapnie ușoară (30,6 [27,9 – 33,3] vs. 31,4 [28,8 – 34,0],  $p=0,016$ ) și hipercapnie moderată (27,7 [24,5 – 30,8] vs. 28,8 [25,7 – 32,0],  $p<0,0001$ ). Pacienții cu un gradient  $\text{ETCO}_2<15$  mmHg au prezentat valori ale NCT, postoperator vs. preoperator cu diferențe statistice semnificative (31,9 [29,6 – 34,1] vs. 32,7 [30,5 – 35,0],  $p=0,01$ ); în mod analogic – pacienții care au avut un gradient al  $\text{ETCO}_2\geq 15$  mmHg (27,0 [23,9 – 30,3] vs. 28,5 [25,1 – 31,8],  $p=0,0007$ ).

**Concluzii.** Ventilarea pulmonară artificială cu hipercapnie moderată ( $\text{ETCO}_2=45-55$  mmHg), indusă și menținută intraanestezic, nu afectează funcția neurocognitivă a pacientului postoperatoriu, după colecistectomia laparoscopică. Mai mult decât atât, funcția neurocognitivă postoperatorie, pe fundal de hipercapnie moderată, indusă intraanestezic, pare să fie ameliorată, probabil din cauza menținerii unei perfuzii cerebrale sporite.

**Cuvinte cheie:** disfuncție neurocognitivă postoperatorie, colecistectomie laparoscopică, hipercapnie permisivă, hipercapnie indusă, intraanestezic.

## Abstract

**Introduction.** Level of  $\text{CO}_2$  (capnia) is responsible for several physiological effects, with important clinical impact. Mechanical ventilation during general anesthesia can separately assure both oxygenation and blood levels of  $\text{CO}_2$ . Moderate hypercapnia was associated with a faster wake up, bronchodilation, reduced risk of wound infection; at the same time, hypercapnia was associated with respiratory acidosis, hypoxic pulmonary vasoconstriction and a rise in intracranial pressure. The impact of moderate hypercapnia, induced during anesthesia, on postoperative neurocognitive function has not been studied yet.

**Material and methods.** Prospective, randomized (simple sampling, 1:2.5 ratio), experimental study. Ethics Research Committee's and patient's consent have been received. The study enrolled patients scheduled for elective laparoscopic cholecystectomy, without severe comorbidities. Data sets were complete and analyzed – 177 patients, out of which – 49 patients in the “normocapnia” group, and 128 – in the “hypercapnia” group. Hypercapnia was provided during surgery by a rise in dead space. Anthropometric parameters, anesthesia length, length of hospital stay were registered. In order to evaluate the neurocognitive status, the number connection test (NCT) was used. The following statistical tests were applied: two-tailed t-Student paired test (for continuous type data, with normal distribution), Fisher's exact test, for category type data. The soft used: *GraphPad Prism, version 6* (Graph Pad Software Inc, CA, USA).

**Results.** The study groups were homogenous from the point of view of gender repartition, weight, height, anesthesia length and hospital stay length; heterogeneous regarding age. The results of the NCT (in seconds), depending on  $\text{ETCO}_2$  values during anesthesia, were distributed for normocapnia (31.8 [28.8 – 34.8] vs. 33.0 [30.0 – 35.9],  $p=0,032$ ), for mild hypercapnia (30.6 [27.9 – 33.3] vs. 31.4 [28.8 – 34.0],  $p=0.016$ ) and moderate hypercapnia (27.7 [24.5 – 30.8] vs. 28.8 [25.7 – 32.0],  $p<0.0001$ ). Patients with an  $\text{ETCO}_2$  gradient  $<15$  mmHg presented postoperative vs. preoperative NCT values with statistical significance (31.9 [29.6 – 34.1] vs. 32.7 [30.5 – 35.0],  $p=0.01$ ); in the same way – patients that had an  $\text{ETCO}_2$  gradient  $\geq 15$  mmHg (27.0 [23.9 – 30.3] vs. 28.5 [25.1 – 31.8],  $p=0.0007$ ).

**Conclusions.** Mechanical ventilation with moderate hypercapnia ( $\text{ETCO}_2=45-55$  mmHg), induced and maintained during anesthesia, does not affect the postoperative neurocognitive function of the patient after laparoscopic cholecystectomy. More than that, the postoperative neurocognitive function, on a background of moderate hypercapnia induced during anesthesia, seems to be improved, probably due to a maintained increased cerebral flow.

**Key words:** postoperative neurocognitive dysfunction, laparoscopic cholecystectomy, permissive hypercapnia, induced hypercapnia, intra-anesthetic.

## Introducere

Ventilarea pulmonară artificială a pacientului, pe durata anesteziei, securizează căile aeriene, asigură schimbul de gaze (oxigenarea hemoglobinei și evacuarea de bioxid de carbon), menține echilibrul dintre ventilarea și perfuzia pulmonară și, de asemenea, servește drept vector pentru agenții anestezici inhalatori. Hiperventilarea permite evacuarea mai rapidă a anestezicelor inhalatorii, durata de trezire a pacientului devenind, astfel, mai scurtă [1]. Totodată, hiperventilarea diminuează perfuzia cerebrală și cea a plăgii operatorii – efect care întârzie trezirea [2] și crește riscul de infecție de plagă [3]. Pentru a permite hiperventilarea pacientului, dar fără a-i scăde presiunea parțială de  $\text{CO}_2$  din sânge, unele spitale dotează mașinile de anestezie cu butelii cu  $\text{CO}_2$ , care este administrat în fluxul de gaz proaspăt [4].

A fost demonstrat că menținerea intraanestezică a unei hipercapnii moderate este asociată cu reducerea riscului infecției de plagă [3], cu accelerarea trezirii din anestezie, indiferent dacă ea este asigurată cu propofol [5] sau cu anestezice inhalatorii [6], produce bronhodilatare [7]. Pe de altă parte, hipercapnia poate induce acidoză respiratorie, provoacă vasoconstricție pulmonară hipoxică sau crește presiunea intracraniană la pacienții cu leziune cerebrală traumatică [7].

Practic, nu au fost găsite referințe care să comunice despre impactul hipercapniei induse intraanestezic asupra funcției neurocognitive postoperatorii. În această ordine de idei, scopul studiului a fost evaluarea comparativă, postoperatorie versus preoperatorie, a funcției neurocognitive a pacientului, care a fost ventilat pulmonar artificial intraanestezic cu hipercapnie indusă, pe modelul colecistectomiei laparoscopice programate.

## Material și metode

### *Design-ul și parametrii studiului*

Studiul este de tip prospectiv, experimental, randomizat. Eșantionare aleatorie, simplă. Randomizarea a fost efectuată prin metoda plicurilor de către o persoană independentă, care nu a participat la colectarea și analiza datelor sau la acordarea asistenței medicale. Rata de alocare a fost de 1:2,5 și a constat în orientarea pacienților fie în lotul de ventilare pulmonară artificială intraanestezic în normocapnie ( $\text{ETCO}_2=35\text{-}40$  mmHg), fie în hipercapnie moderată ( $\text{ETCO}_2=45\text{-}60$  mmHg). Rata de alocare a fost apropiată de raportul intervalelor valorilor capniei (5 mmHg – în lotul „normocapnie”, 15 mm Hg – în lotul „hipercapnie”). Durata de colectare a datelor: aprilie 2015 – decembrie 2016 în Secția de anestezie și terapie intensivă a Spitalului Clinic Municipal „Sfânta Treime”. Anestezia și îngrijirea perioperatorie, precum și intervenția chirurgicală, a fost asigurată de aceeași echipă de specialiști.

Protocolul de cercetare a fost aprobat de către Comitetul de Etică a Cercetării a USMF „Nicolae Testemițanu” (proces-verbal nr. 21 din 24.02.2015, președinte al CEC – prof. Mihail Gavriluc, dr. hab. șt. med., prof. univ.). Toți pacienții înrolați au semnat un acord informat în scris.

## Introduction

Mechanical ventilation of a patient under anesthesia secures airway, ensures gas exchange (hemoglobin oxygenation and evacuation of carbon dioxide), and maintains equilibrium between ventilation and pulmonary perfusion, also serving as a vector for inhalational anesthetic. Hyperventilation provides faster evacuation of inhalational anesthetics, thus shortening the duration of awakening of the patient [1]. Therewith, hyperventilation diminishes cerebral and surgical wound perfusion – effect that postpones awakening and raises the risk of wound infection [3]. In order to permit hyperventilation of the patient, but without diminishing  $\text{PaCO}_2$ , some hospitals provide anesthesia machines with  $\text{CO}_2$  cylinders, which is administered into the fresh gas flow [4].

It has been demonstrated that moderate hypercapnia during anesthesia is associated with a reduced risk of wound infection [3], with faster awakening from anesthesia, regardless of what anesthetic is being used, propofol [5] or inhalational agent [6], causes bronchodilation [7]. On the other side, hypercapnia can induce respiratory acidosis, cause hypoxic pulmonary vasoconstriction or rise intracranial pressure in patients with traumatic brain injury [7].

Practically, no references have been found that would relate about the impact of induced hypercapnia during anesthesia upon the postoperative neurocognitive function. This being said, the aim of the study was to comparatively evaluate (preoperatively vs. postoperatively) the neurocognitive function of the patient that has been artificially ventilated during surgery with induces hypercapnia, on the elective laparoscopic cholecystectomy model.

## Material and methods

### *Design and parameters of the study*

The study is a prospective, experimental and randomized one. Sampling was random, simple. Randomization was made by means of envelopes, by an independent person that did not take part in collecting and analyzing of data or providing medical assistance. Allocation rate was 1:2.5 and consisted of orientation of patients in either normocapnia group ( $\text{ETCO}_2=30\text{-}40$  mmHg) or hypercapnia group ( $\text{ETCO}_2=45\text{-}60$  mmHg). Allocation rate was close to the ratio of capnia values' intervals (5 mmHg – in the “normocapnia” group, and 15 mmHg – in “hypercapnia” group. Time frame data was collected: April 2015 – December 2016 in Anesthesia and Intensive Care ward of the “Sfanta Treime” Clinical Municipal Hospital. Anesthesia and perioperative care, as well as the surgery itself was provided by the same team of specialists.

The research protocol was approved by the Ethics Research Committee of Nicolae Testemitanu SUMPh (verbal process no. 21, from 24.02.2015, president of ERC – prof. Gavriluc Mihail, MD, PhD, univ. prof.). All participants signed the informed consent.

### *Participants*

Eligibility evaluation included 242 patients; out of them – 52 did not meet the inclusion criteria. A total number of 190

### Participanții

Au fost evaluați pentru eligibilitate 242 de pacienți; 52 dintre ei nu au îndeplinit criteriile de includere. Randomizați, în total, 190 de pacienți. Seturi de date complete, analizate – 177 (lotul „normocapnie” – 49 de pacienți; lotul „hipercapnie” – 128 de pacienți). Diagrama de flux CONSORT a pacienților înrolați este prezentată în Figura 1.

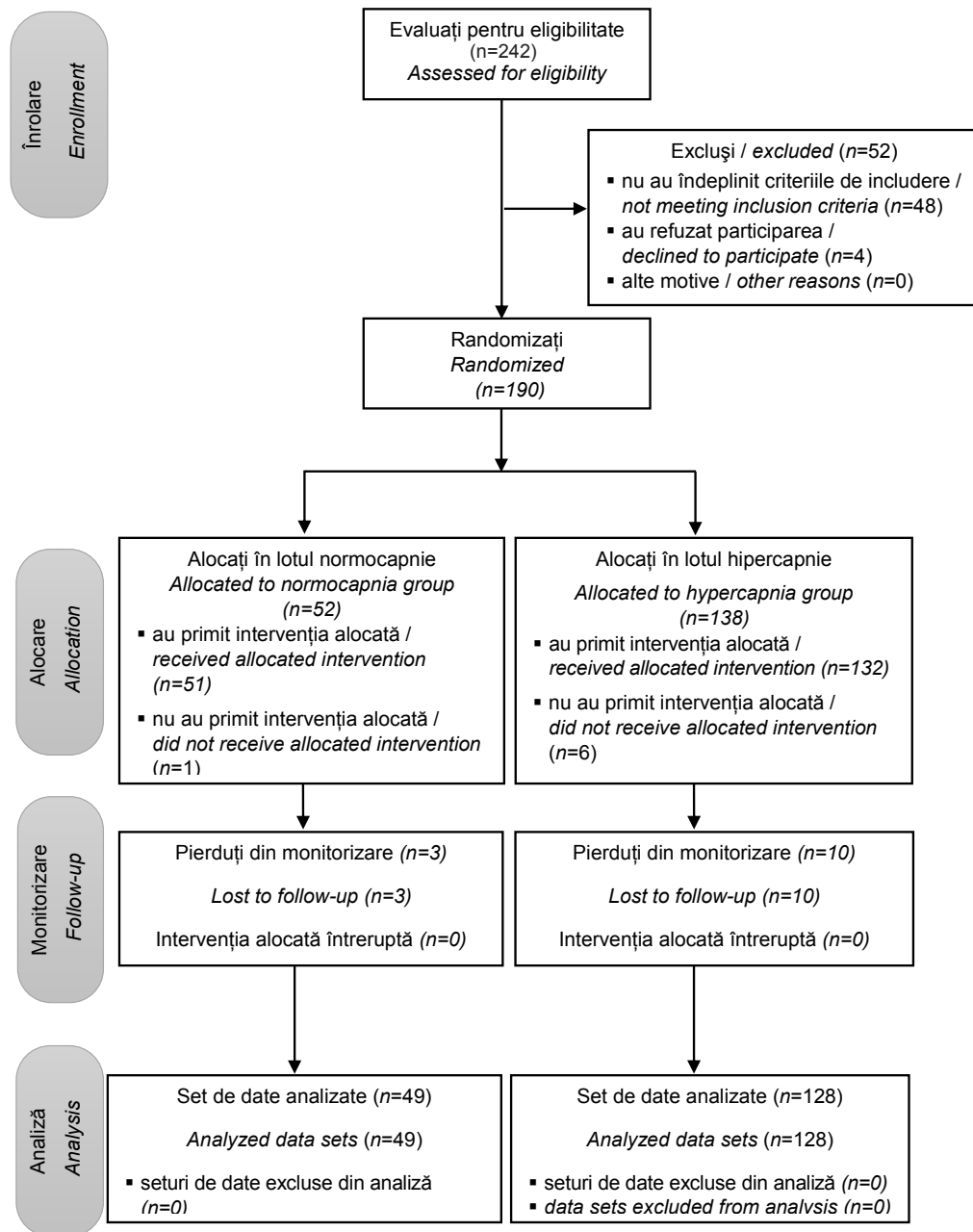
Criteriile de includere în studiu au fost:

- pacient adult ( $\geq 18$  ani), beneficiar de colecistectomie laparoscopică programată;
- semnarea acordului scris de înrolare în studiu;
- capabil să citească și să înțeleagă instrucțiunile date pentru trecerea testării neurocognitive;

patients were randomized. Complete sets of data of 177 patients were analyzed (“normocapnia” group – 49 patients; “hypercapnia” group – 128 patients). CONSORT flow diagram of the enrolled patients is presented in Figure 1.

The study inclusion criteria were:

- adult patient ( $\geq 18$  y.o.) that underwent elective laparoscopic cholecystectomy;
- signed informed consent regarding enrollment into the study;
- able to read and understand given instructions for neurocognitive testing;
- no previous neurocognitive dysfunction;



**Fig. 1** Diagrama de flux CONSORT a pacienților înrolați.

*Fig. 1 CONSORT flow diagram of enrolled patients.*

- fără disfuncție neurocognitivă preexistentă;
- fără medicație cronică, care ar afecta statutul neurocognitiv (antidepresante, benzodiazepine, antihistaminice etc.);
- fără comorbiditate neurologică, psihică, cardiacă, respiratorie, hepatică sau renală severă, care să afecteze gazometria sanguină, mecanica respirației, statutul neurocognitiv;

Criteriile de excludere din studiu au fost:

- dorința exprimată de pacient de a ieși din studiu;
- fișă standardizată de achiziție de date incompletă;
- conversia colecistectomiei laparoscopice la tehnica deschisă.

#### Asistența anestezică

Pacienții, suferinzi de colecistită calculoasă cronică, au beneficiat de colecistectomie laparoscopică în mod programat. Tehnica anestezică utilizată la pacienții studiați a fost cea generală intravenoasă, pe pivot inhalator. Dozele medicamentelor, folosite pentru asigurarea anesteziei, sunt prezentate în Tabelul 1. Hidratarea perioperatorie a fost efectuată cu soluție Ringer lactat. Profilaxia antiemetică și antihyperalgezică a fost efectuată sistematic cu dexametazonă, 8 mg bolus, până la inducție.

- no chronic medication that would affect neurocognitive status (antidepressants, benzodiazepines, antihistamines etc.);
- no neurological, psychic, cardiac, respiratory, hepatic or renal comorbidities that would affect blood gases, respiratory mechanics or neurocognitive status.

Exclusion criteria were:

- expressed desire of the patient to leave the study;
- incomplete standardized data chart;
- conversion of laparoscopic cholecystectomy to open technique.

#### Anesthetic assistance

Patients that suffered of chronic calculous cholecystitis, underwent elective laparoscopic cholecystectomy. Total intravenous anesthesia combined with inhalational general anesthesia was used in the enrolled patients. Medication's doses used for anesthesia maintenance are presented in Table 1. Perioperative hydration was done with Ringer's lactate solution. Antiemetic and antihyperalgesic prophylaxis was made systematically with a bolus of 8 mg of dexamethasone, before induction.

Perioperative analgesia was ensured with ketoprofen,

**Tabelul 1.** Dozele de hipnotice, analgezic opioid și miorelaxant, utilizate în cadrul asistenței anestezice.

**Table 1.** Doses of hypnotics, analgesics, opioids and muscle relaxant used during anesthesia assistance.

Medicamentul <i>Drug</i>	Premedicație <i>Premedication</i>	Inducție <i>Induction</i>	Bolus (perfuzie) de menținere <i>Maintenance bolus (perfusion)</i>	Comentarii <i>Comments</i>
Diazepam <i>Diazepam</i>	5 mg (0,08 mg/kg)	20 mg (0,28 mg/kg)	10 mg (0,15 mg/kg)	bolus la 45-60 min, la necesitate. <i>bolus every 45-60 min, if needed.</i>
Midazolam <i>Midazolam</i>	1 mg (0,01 mg/kg)	5 mg (0,07 mg/kg)	nu <i>no</i>	utilizat în co-inducție. În premedicație – doar la pacientul anxios, după diazepam. <i>used in co-induction. Premedication – only in anxious patients, after diazepam.</i>
Propofol <i>Propofol</i>	nu <i>no</i>	180 mg (2,4 mg/kg)	30 mg (0,4 mg/kg), sau 8-12 ml/oră	bolus la fiecare 5 min, fie perfuzare i.v. continuă după bolusul de inducție. <i>bolus every 5 min, or continuous infusion after the induction bolus.</i>
Fentanil <i>Fentanyl</i>	0,1 mg (0,0015 mg/kg)	0,2 mg (0,003 mg/kg)	0,1 mg (0,0015 mg/kg)	bolus la 20 min. <i>bolus every 20 min.</i>
Sevofluran <i>Sevoflurane</i>	nu <i>no</i>	nu <i>no</i>	0,5 – 1,3 MAC	MAC ajustată în funcție de presiunea arterială și frecvența cardiacă (ambele ±15% variație față de valorile inițiale). <i>MAC adjusted to BP and HR (±15% variation of both from initial values).</i>
Atracuriu <i>Atracurium</i>	nu <i>no</i>	50 mg 0,6 mg/kg	nu <i>no</i>	doar pentru realizarea intubării oro-traheale. <i>only for performing oro-tracheal intubation.</i>

Analgezia postoperatorie a fost asigurată cu ketoprofen, 100 mg de 2 ori pe zi, i.v.; la necesitate (intensitatea durerii ≥40 pe scorul vizual analogic) – tramadol 100 mg i.m.

#### Ventilarea pulmonară artificială și inducerea hipercapniei

Ventilarea pulmonară artificială a fost asigurată de mașina de anestezie *Draeger Fabius Plus* (*Draeger Inc.*, Houston, TX,

100 mg twice a day, i.v.; if required (pain intensity ≥40 on VAS) – tramadol 100 mg i.m.

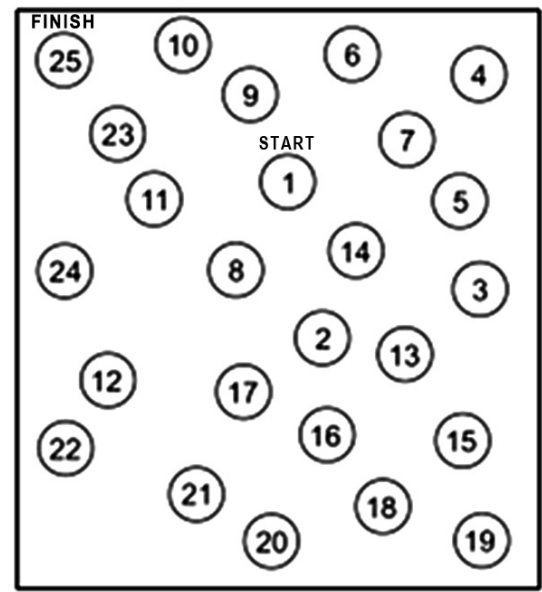
#### Artificial pulmonary ventilation and hypercapnia induction

Artificial pulmonary ventilation was performed with *Draeger Fabius Plus* anesthesia machine (*Draeger Inc.*, Lübeck, Germany) with the following parameters: volume control ventila-



**Fig. 2** Inducerea hipercapniei controlate intraanestezic prin creșterea spațiului mort cu ajutorul unui tub gofrat.

*Fig. 2* Induction of controlled hypercapnia during anesthesia through dead space raise with the help of a corrugated tube.



**Fig. 3** Exemplu de foaie cu testul de conectare a numerelor (NCT).

*Fig. 3* Example of a number connection test sheet (NCT).

SUA) cu următorii parametri: regim volum-control (VCV), frecvență respiratorie – de 12-14 rpm, volum inspirator – 7-8 ml/kg. Frecvența și volumul respirației erau ajustate pentru menținerea  $SpO_2 \geq 95\%$  și un  $ETCO_2$  de 35-40 mmHg.

Hipercapnia controlată, pentru lotul respectiv, a fost indusă prin creșterea spațiului mort (conectarea unui tub gofrat de lungime variabilă între sonda orotraheală și piesa Y) (Figura 2). Ajustarea capniei se efectua prin alungirea sau scurțarea tubului gofrat, respectiv – prin creșterea sau reducerea spațiului mort și al volumului de gaz alveolar reinhalat. Parametrii vitali, inclusiv –  $SpO_2$  și concentrația end-expiratorie a bioxidului de carbon ( $ETCO_2$ ), au fost monitorizați conform standardului ASA, cu monitorul multifuncțional *Nihon Kohden BSM-6301A* (*Nihon Kohden Corporation*, Tokyo, Japonia).

#### Testarea neurocognitivă

Testarea neurocognitivă s-a efectuat prin aplicarea testului de conectare a numerelor (l. engl. *number connection test*, NCT), după ce pacientului i-a fost explicată metodologia respectivă. Esența testării constă în unirea, cu pixul, contra cronometru, a 25 de numere, în ordine crescătoare (de la 1 la 25), care sunt aranjate aleatoriu pe foaia de hârtie (Figura 3). A fost înregistrată media vitezei de conectare, exprimată în secunde, a două încercări. Testul a fost aplicat preoperatoriu și 6 ore postoperatoriu. Testarea a fost considerată eșuată, dacă pacientul nu reușea conectarea corectă a tuturor numerelor în 120 de secunde.

#### Parametrii înregistrați și analiza statistică

Au fost înregistrați următorii parametri: vârsta, sexul, înălțimea, masa corporală, durata anesteziei, durata de spitalizare, viteza de îndeplinire a testului NCT, preoperatoriu și postoperatoriu, capnia la sfârșitul expirului. Valorile parametrilor au

tion, respiratory rate – 12-14 rpm, tidal volume – 7-8 ml/kg. Respiratory rate and tidal volume were adjusted in order to maintain  $SpO_2 \geq 95\%$  and  $ETCO_2$  of 35-40 mmHg.

Controlled hypercapnia, for the respective group, was induced by a raise in dead space (connection of a corrugated tube of variable length, between the endo-tracheal tube and Y piece) (Figure 2). Adjustment of capnia was made through shortening or elongation of the corrugated tube, respectively through reducing or elevating of dead space and of the volume of re-inhaled alveolar gas. Vital parameters, including  $SpO_2$  and end-expiratory concentration of  $CO_2$  ( $ETCO_2$ ), were monitored according to ASA standards, with the multifunctional *Nihon Kohden BSM-6301A* (*Nihon Kohden Corporation*, Tokyo, Japan)

#### Neurocognitive testing

Neurocognitive testing was made with a *number connection test* (NCT), after explaining the procedure to the patient. The test consists of connecting 25 numbers, against the clock, in an ascending order, that are randomly arranged on the paper (Figure 3). The mean speed value of connection, expressed in seconds, of 2 attempts. The test was applied preoperatively and 6h postoperatively. The test was considered failed if the patient could not connect correctly all 25 numbers in 120 seconds.

#### Recorded parameters and statistical analysis

The following parameters were recorded: age, gender, weight, length of anesthesia, length of hospital stay, speed of NCT accomplishment (pre- and postoperatively), end-expiratory capnia. Parameters' values were digitized in an Excel table, with further import into the statistical analysis software *GraphPad Prism*, version 6 (*Graph Pad Software Inc.*, CA, USA).



fost numerizate în tabel Excel, după care – importate în softul de analiză statistică *GraphPad Prism, versiunea 6 (Graph Pad Software Inc, CA, SUA)*. Datele sunt prezentate sub formă de valori absolute și relative, sau medie și interal de încredere de 95% a mediei. Teste statistice aplicate: t-Student pereche, bi-caudal (pentru datele de tip continuu, cu distribuție normală), testul exact Fisher, pentru datele de tip categorie. Un  $p < 0,05$  a fost considerat statistic semnificativ.

**Rezultate**

Caracterizarea generală a loturilor studiate este prezentată în Tabelul 2. Loturile de studiu au fost omogene după repartizarea pe sexe, masa corporală, înălțime, durata anesteziei și durata de spitalizare. Pacienții lotului „hipercapnie” au fost mai tineri decât cei din lotul „normocapnie” cu aproximativ 6,7 ani, în medie.

**Tabelul 2.** Caracterizarea generală a loturilor de studiu.

Parametru	Lot normocapnie (n=49) (ETCO <sub>2</sub> =35-40 mmHg)	Lot hipercapnie (n=128) (ETCO <sub>2</sub> =45-55 mmHg)	t	p
Vârsta, ani	54,0 (50,0 – 58,1)	47,3 (44,9 – 49,7)	2,95	0,003
Repartizarea pe sexe, b/f	8/41 (1:5,1)	21/107 (1:5,1)	NA	1,00
Masa corporală, kg	79,3 (74,3 – 84,2)	82,8 (80,3 – 85,2)	1,39	0,166
Înălțimea, cm	167,0 (165,2 – 168,8)	168,1 (166,7 – 169,5)	0,88	0,378
Durata anesteziei, min	82,8 (74,6 – 91,0)	81,6 (76,4 – 86,8)	0,24	0,809
Durata de spitalizare, zile	4,8 (4,3 – 5,4)	5,3 (4,9 – 5,9)	1,28	0,200

Notă: teste statistice aplicate – t-Student și Fisher exact. NA – neaplicabil.

Parametrul principal de rezultat al studiului a fost durata de executare a testului NCT (secunde), pe loturi, comparativ

Data are presented in absolute and relative values, or in mean values and 95% confidence interval of the mean. The following statistical tests were applied: two-tailed t-Student paired test (for continuous type data, with normal distribution), Fisher’s exact test, for category type data. A  $p < 0.05$  value was considered statistically significant.

**Results**

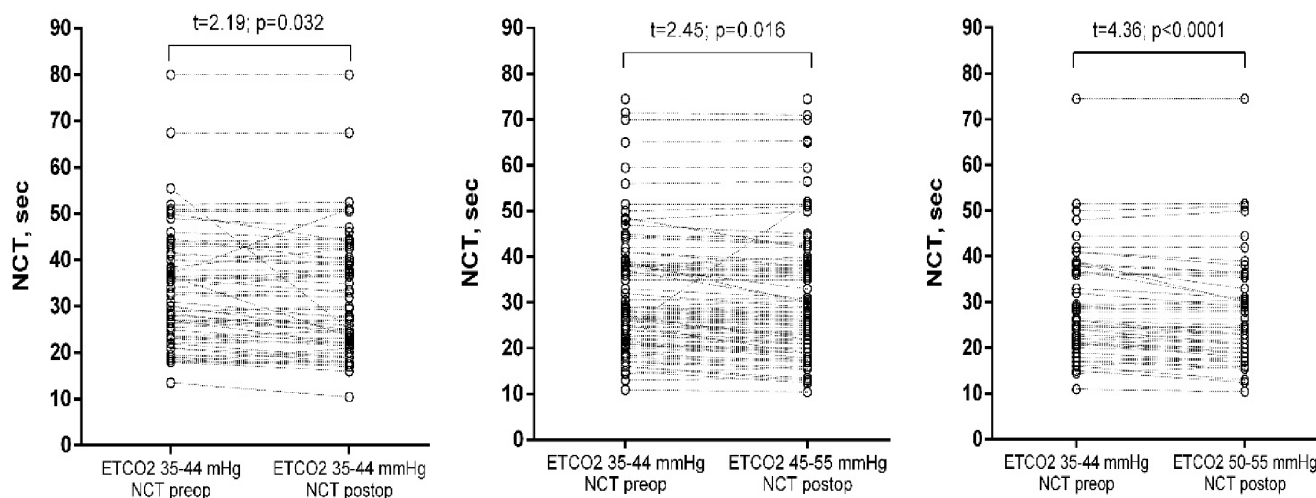
General characteristics of the study groups is presented in Table 2. The study groups were homogenous regarding gender, weight, height, anesthesia length and length of hospital stay. Patients from the “hypercapnia” group were, on average, 6.7 years younger than those from the “normocapnia” group.

**Table 2.** General characteristics of study groups.

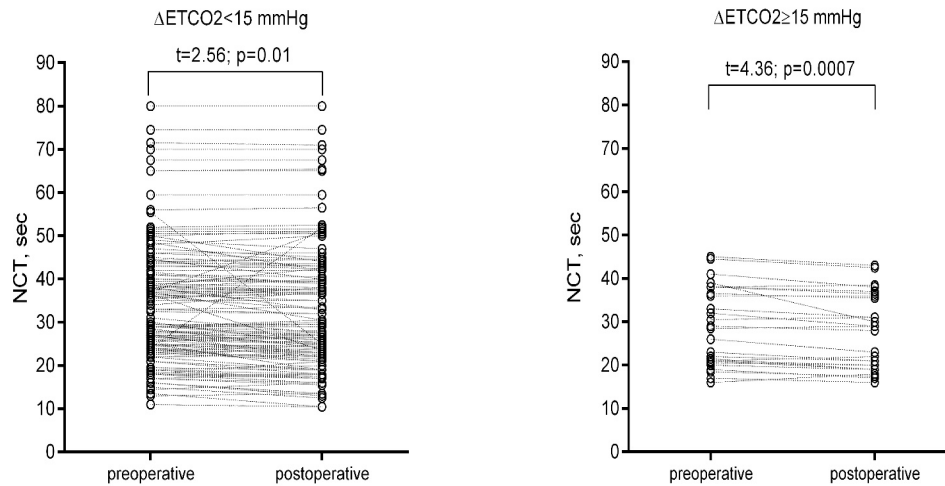
Parameter	Normocapnia group (n=49) (ETCO <sub>2</sub> =35-40 mmHg)	Hypercapnia group (n=128) (ETCO <sub>2</sub> =45-55 mmHg)	t	p
Age, years	54.0 (50.0 – 58.1)	47.3 (44.9 – 49.7)	2.95	0.003
Gender distribution, m/f	8/41 (1:5.1)	21/107 (1:5.1)	NA	1.00
Weight, kg	79.3 (74.3 – 84.2)	82.8 (80.3 – 85.2)	1.39	0.166
Height, cm	167.0 (165.2 – 168.8)	168.1 (166.7 – 169.5)	0.88	0.378
Anesthesia length, min	82.8 (74.6 – 91.0)	81.6 (76.4 – 86.8)	0.24	0.809
Hospital stay length, days	4.8 (4.3 – 5.4)	5.3 (4.9 – 5.9)	1.28	0.200

Note: applied statistical tests – t-Student and Fisher’s exact test. NA – not applicable.

The main parameter of the study’s results was the duration the NCT was performed (seconds), preoperatively vs. postoperatively, in both groups. Figure 4 represents, in a comparative way, pre- vs. postoperative results of the NCT (in seconds) de-



**Fig. 4** Rezultatele NCT (postoperatoriu vs. preoperatoriu), în funcție de valoarea intraanestezică a ETCO<sub>2</sub>.  
**Fig. 4** NCT results (postoperatively vs. preoperatively), depending on ETCO<sub>2</sub> value during anesthesia.



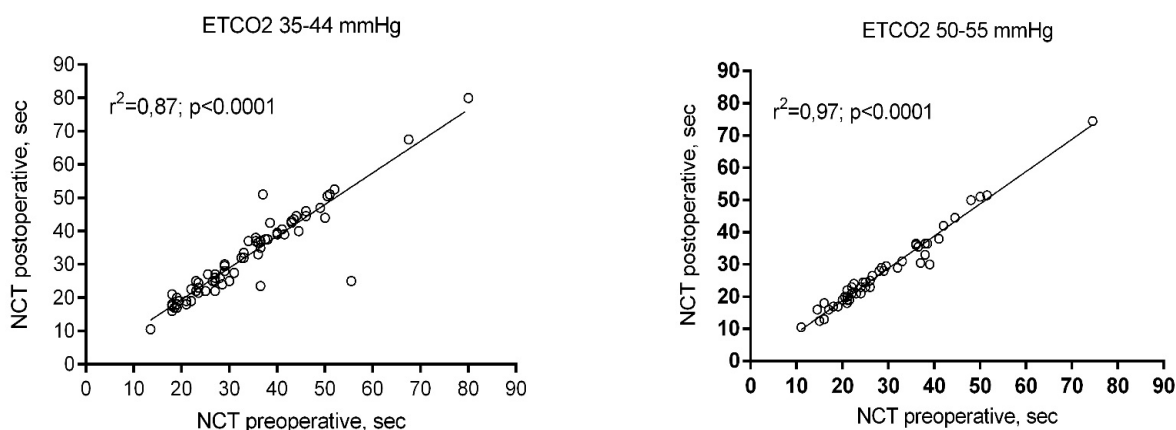
**Fig. 5** Rezultatele NCT (postoperatoriu vs. preoperatoriu), în funcție de creșterea intraanestezică a  $ETCO_2$ .  
**Fig. 5** NCT results (postoperative vs. preoperative), depending on the intra-anesthetic raise of  $ETCO_2$ .

postoperator vs. preoperator. Figura 4 prezintă, comparativ, postoperator vs. preoperator, rezultatele testului NCT (în secunde) în funcție de valoarea intraanestezică a  $ETCO_2$ , respectiv, pentru starea de normocapnie (31,8 [28,8 – 34,8] vs. 33,0 [30,0 – 35,9],  $p=0,032$ ), hipercapnie ușoară (30,6 [27,9 – 33,3] vs. 31,4 [28,8 – 34,0],  $p=0,016$ ) și hipercapnie moderată (27,7 [24,5 – 30,8] vs. 28,8 [25,7 – 32,0],  $p<0,0001$ ). Observați că, rezultatele postoperatorii ale testului NCT sunt ameliorate față de cele preoperatorii statistic semnificativ, iar mărimea semnificației statistice este proporțională cu gradul de hipercapnie.

În seriile de date cu valori ale  $ETCO_2$ , a fost observat că la unii pacienți capnia creștea rapid intraanestezic, la alții – mai lent. Astfel, s-au analizat rezultatele testului NCT, postoperator vs. preoperator, în funcție de gradientul  $ETCO_2$  (diferența dintre valoarea maximă a  $ETCO_2$  intraanestezic și valoarea  $ETCO_2$  dinaintea inducției), Figura 5. Astfel, pacienții cu un gradient  $ETCO_2 < 15$  mmHg au prezentat valori ale NCT, postoperator vs. preoperator cu diferențe statistic semnificative (31,9 [29,6 – 34,1] vs. 32,7 [30,5 – 35,0],  $p=0,01$ ); în mod analogic – paci-

pending on the intra-anesthetic value of  $ETCO_2$ , respectively, for normocapnia (31.8 [28.8 – 34.8] vs. 33.0 [30.0 – 35.9],  $p=0,032$ ), for mild hypercapnia (30.6 [27.9 – 33.3] vs. 31.4 [28.8 – 34.0],  $p=0,016$ ) and moderate hypercapnia (27.7 [24.5 – 30.8] vs. 28.8 [25.7 – 32.0],  $p<0,0001$ ). You can observe that, the postoperative results of the NCT are improved, statistically improved, when compared with the preoperative results, and the magnitude of the statistical significance is proportional to the degree of hypercapnia.

In data series with  $ETCO_2$  values, it was observed that, in some patients, levels of  $CO_2$  raised rapidly during anesthesia, and in others – more slowly. Thus, NCT results were analyzed, preoperatively vs. postoperatively, depending on the  $ETCO_2$  gradient (difference between the maximal value of  $ETCO_2$  during anesthesia and  $ETCO_2$  value before induction), Figure 5. In this way, patients with an  $ETCO_2$  gradient  $< 15$  mmHg had values of NCT, postoperatively vs. intraoperatively, with statistically significant differences (31.9 [29.6 – 34.1] vs. 32.7 [30.5 – 35.0],  $p=0,01$ ); analogically – patients that had an  $ETCO_2$  gradient  $\geq 15$  mmHg (27.0 [23.9 – 30.3] vs. 28.5 [25.1 – 31.8],



**Fig. 6** Corelarea dintre valorile preoperatorii vs. postoperatorii ale NCT, în funcție de nivelul capniei.  
**Fig. 6** Correlation between preoperative vs. postoperative values of NCT, depending of the capnia levels.

enții care au avut un gradient al  $\text{ETCO}_2 \geq 15$  mmHg (27,0 [23,9 – 30,3] vs. 28,5 [25,1 – 31,8],  $p=0,0007$ ). Și în acest caz, observați performanțe semnificativ ameliorate la pacienții cu gradient „mare” de  $\text{ETCO}_2$  pe durata asistenței anestezice.

Figura 6 prezintă corelația dintre valorile preoperatorii ale testului NCT și cele postoperatorii, în funcție de valoarea capniei: normocapnie sau hipercapnie moderată. Norii de puncte prezintă o dispersie redusă și un grad înalt de corelare, fapt ce înseamnă că există o relație lineară strânsă dintre valorile preoperatorii ale testului NCT și cele postoperatorii, cu o tendință generală spre accelerarea îndeplinirii testului.

## Discuții

Prezentul studiu a avut drept scop compararea statutului neurocognitiv postoperatoriu al pacientului, care a fost ventilat intraanestezic, cu inducerea unei hipercapnii moderate. Unul dintre potențialii factori de bias ale acestui studiu este estimarea capniei prin prisma  $\text{ETCO}_2$  și nu a  $\text{PaCO}_2$ , care este mai exact; în schimb,  $\text{ETCO}_2$  este noninvasiv, continuu și posedă o precizie suficientă pentru majoritatea cazurilor chirurgicale. Un alt factor potențial de bias ar fi durata scurtă a intervenției de colecistectomie laparoscopică, care a fost efectuată la persoane fără comorbidități majore. Posibil, impactul hipercapniei se manifestă mai plenar în funcție de anumite comorbidități sau are un beneficiu potențial pentru anumite intervenții. În cadrul studiului, au fost atinse paliere reduse, absolut inofensive de hipercapnie. Nivelele de  $\text{PaCO}_2$  de 70-80 mmHg par să inducă efecte fiziologice maxime [2], care au fost studiate, în special, la pacienții cu sindrom de detresă respiratorie acută severă [8, 9] sau în chirurgia toracică majoră [10]. Efectele acestor presiuni parțiale de bioxid de carbon nu au fost studiate, în schimb, în cadrul anesteziilor electivă din diferite domenii, în special – în condițiile circuitelor de reabilitare postoperatorie accelerată (*fast-track*).

Cu toate că o testare neurocognitivă complexă necesită utilizarea a cel puțin 5 chestionare diferite, testul NCT pare să posedă o sensibilitate și o specificitate suficient de bună în identificarea disfuncției cognitive subclinice la pacienții cu patologie hepatică [11]. Însă, conform lui Kircheis G. și coaut. (2007), acest test posedă și o mare variabilitate de interpretare subiectivă [12]. În studiul de față, testul NCT a fost selectat pentru simplitatea explicării și executării lui de către pacient.

Astfel, datele obținute ne confirmă că hipercapnia indusă intraanestezic nu influențează negativ statutul neurocognitiv al pacientului, cel puțin, în cazul colecistectomiei laparoscopice. Mai mult decât atât, s-a observat o reducere a timpului de executare a testului postoperatoriu, ceea ce induce concluzia că o hipercapnie moderată, prin creșterea fluxului sanguin cerebral intraoperator, contribuie la păstrarea funcției neurocognitive. Efectul de „învățare” al testului, în cazul NCT poate fi neglijat, deoarece ordinea aranjării numerelor pe foaie este aleatorie. Bineînțeles, semnificația statistică nu înseamnă, neapărat și semnificație cu impact clinic. De aceea, pentru elucidarea definitivă a impactului hipercapniei induse

$p=0,0007$ ). And in this case, it can be easily observed significantly improved performances in patients with “high”  $\text{ETCO}_2$  gradient during anesthesia assistance.

Figure 6 represents the correlation between preoperative and postoperative values of NCT, in relation with the capnia value: normocapnia or moderate hypercapnia. The clouds of points represent a reduced dispersion and a high degree of correlation, fact that proves that there is a strong linear relationship between the pre- and postoperative values of NCT, with a general tendency towards faster test accomplishment.

## Discussion

The present study had the aim to compare the neurocognitive postoperative status of the patient that was mechanically ventilated during anesthesia, and during which moderate hypercapnia was induced. One of the potential bias factors of this study was to estimate capnia through  $\text{ETCO}_2$  values and not  $\text{PaO}_2$  (which is more exact); instead,  $\text{ETCO}_2$  is non-invasive, continuous and has a sufficient accuracy for most of the surgical cases. Another potential bias factor would be the short duration of laparoscopic cholecystectomy surgery that was performed in patients without major comorbidities. It is possible that, the impact of hypercapnia is more plenary manifested depending on different comorbidities or has a potential benefit for certain surgeries. In this study, reduced, absolutely inoffensive levels of hypercapnia have been achieved. Levels of  $\text{ETCO}_2$  equal to 70-80 mmHg seem to induce maximal physiological effects [2], that were especially studied in patients with acute respiratory distress syndrome [8, 9] or in major thoracic surgery [10]. Instead, effects of these levels of carbon dioxide have not been studied in elective anesthesia from other domains, especially – protocols of enhanced recovery after surgery.

Even though a complex neurocognitive testing requires 5 different questionnaires to be used, the NCT seems to have a good enough sensibility and specificity in identification of sub-clinical cognitive dysfunction in patients with hepatic pathology [11]. However, according to Kircheis G. *et al.* (2007), this test has a big, subjective variability of interpretation and accomplishment by the patient.

Thereby, obtained data confirms that, induced hypercapnia during surgery does not negatively influence the neurocognitive status of the patient, at least, in cases of laparoscopic cholecystectomies. More than that, it was observed that postoperatively, the time required for test accomplishment is shorter; fact that allows us to conclude that a moderate hypercapnia contributes to neurocognitive function preservation, by means of intraoperative raised cerebral flow. The effect of “learning” the test, in cases of NCT can be neglected, because the order of number arrangement on the paper is random. Obviously, statistical significance does not necessarily mean clinical impact significance. That is why, in order to definitively elucidate the impact of induced hypercapnia during surgery on the neurocognitive status of the patient, multicentric randomized clinical trials are necessary, with minimum 5 different tests to be

intraanestezic asupra statutului neurocognitiv al pacientului, sunt necesare studii randomizate multicentrice, cu aplicarea a minim 5 teste diferite, la persoane ventilate artificial cu nivele de CO<sub>2</sub> peste 50 mmHg, beneficiare de intervenții chirurgicale mai ample, din diferite domenii.

### Concluzii

Ventilarea pulmonară artificială cu hipercapnie moderată (ETCO<sub>2</sub>=45-55 mmHg), indusă și menținută intraanestezic, nu afectează funcția neurocognitivă a pacientului postoperatoriu, după colecistectomia laparoscopică. Mai mult decât atât, funcția neurocognitivă postoperatorie, pe fundal de hipercapnie moderată, indusă intraanestezic, pare să fie ameliorată, probabil din cauza menținerii unei perfuzii cerebrale sporite.

### Declarația de conflict de interese

Autorii declară lipsa conflictului de interese, financiare sau nonfinanciare, asociate cu această lucrare.

### Contribuția autorilor

Conceptul și designul studiului – AB și VR; elaborarea protocolului de cercetare – AB, VR, GS; colectarea datelor primare – VR, PR; numerizarea datelor – GS; analiza statistică – AB; scrierea versiunii primare a manuscrisului – AB, PR; discutarea și redactarea manuscrisului – AB, GS, PR, VR. Toți autorii au citit și aprobat versiunea finală a manuscrisului.

applied, in patients that underwent artificial ventilation with levels of CO<sub>2</sub> above 50 mmHg during extensive surgeries from different domains.

### Conclusions

Mechanical ventilation with moderate hypercapnia (ETCO<sub>2</sub>=45-55 mmHg), induced and maintained during surgery, does not affect the postoperative neurocognitive function of the patient that underwent laparoscopic cholecystectomy. More than that, the postoperative neurocognitive function, on a background of moderate hypercapnia, induced during anesthesia, seems to be improved, probably due to maintenance of an enhanced cerebral perfusion.

### Declaration of conflict of interests

Authors declare lack of any conflict of interests, financial or nonfinancial, associated with this study.

### Authors' contribution

Concept and design of the study – AB and VR; elaboration of the research protocol – AB, VR, GS; primary data collection – VR, PR; digitization of data – GS; statistical analysis – AB; writing of the primary version of the manuscript – AB, PR; discussion and redaction of the manuscript – AB, GS, PR, VR. All authors have read and approved the final version of the manuscript.

### Referințe / references

1. Sakata D., Gopalakrishnan N., Orr J., White J., Westenskow D. Rapid recovery from sevoflurane and desflurane with hypercapnia and hyperventilation. *Anesth. Analg.*, 2007; 105: 79-82.
2. Ito H., Kanno I., Ibaraki M., Hatazawa J., Miura S. Changes in human cerebral blood flow and cerebral blood volume during hypercapnia and hypocapnia measured by positron emission tomography. *J. Cereb. Blood Flow Metab.*, 2003; 23: 665-70.
3. Akça O., Kurz A., Fleischmann E., Buggy D., Herbst F., Stocchi L. et al. Hypercapnia and surgical site infection: a randomized trial. *Br. J. Anaesth.*, 2013; 111 (5): 759-767.
4. Razis P. Carbon dioxide – a survey of its use in anaesthesia in the UK. *Anaesthesia*, 1989; 44: 348-51.
5. Hosseinzadeh H., Pouranvari H., Japarpour R. Effect of induced hypercapnia on the time of emergence from propofol anesthesia in elective surgery. *J. Urmia Univ. Med. Sci.*, 2015; 26 (1): 39-46.
6. Piyvsh M., Drummond P., Drummond J. Cerebral physiology and the effects of anesthetic drugs. In: Miller RD, editor. *Miller's Anesthesia*, 7<sup>th</sup> ed. Philadelphia: Churchill Livingstone; 2010. p. 308.
7. Marhong J., Fan E. Carbon dioxide in the critically ill: too much or too little of a good thing? *Respir. Care*, 2014; 59 (10): 1597-605.
8. Curley G., Laffey J., Kavanagh B. CrossTalk proposal: there is added benefit to providing permissive hypercapnia in the treatment of ARDS. *J. Physiol.*, 2013; 591 (11): 2763-5.
9. Curley G., Hayes M., Laffey J. Can 'permissive' hypercapnia modulate the severity of sepsis-induced ALI/ARDS? *Critical Care*, 2011; 15: 212
10. Morisaki H., Serita R., Innami Y., Kotake Y., Takeda J. Permissive hypercapnia during thoracic anaesthesia. *Acta Anaesthesiol. Scand.*, 1999; 43 (8): 845-9.
11. Weissenborn K., Rückert N., Hecker H., Manns M. The number connection tests A and B: interindividual variability and use for the assessment of early hepatic encephalopathy. *J. Hepatol.*, 1998; 28 (4): 646-53.
12. Kircheis G., Fleig W., Görtelmeyer R., Grafe S., Häussinger D. Assessment of low-grade hepatic encephalopathy: a critical analysis. *J. Hepatol.*, 2007; 47 (5): 642-50.

ARTICOL DE CERCETARE

## Evaluarea durerii după tratamentul chirurgical combinat al pacienților cu metastaze spinale: studiu prospectiv, consecutiv, descriptiv

Andrei Olaru<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>*Catedra de ortopedie și traumatologie, Universitatea de Stat de Medicină și Farmacie „Nicolae Testemițanu, Chișinău, Republica Moldova.*

**Data primirii manuscrisului: 08.05.2017**  
**Data acceptării spre publicare: 05.05.2017**

### Autor corespondent:

*Andrei Olaru, asistent universitar*  
*Catedra de ortopedie și traumatologie*  
*Universitatea de Stat de Medicină și Farmacie „Nicolae Testemițanu”*  
*bd. Ștefan cel Mare și Sfânt, 165, Chișinău, Republica Moldova, MD-2004*  
*e-mail: spinalmetastases@mail.ru*

### Ce nu este cunoscut, deocamdată, la subiectul abordat

Nu au fost studiate, comparativ, efectele metodelor combinate de tratament chirurgical minim invaziv (chifoplastie, vertebroplastie + Coblation™; vertebroplastie + radioterapie) cu metodele de vertebroplastie și radioterapie (aplicate în monoterapie), asupra durerii la pacienții cu metastaze spinale.

### Ipoteza de cercetare

Tratamentul combinat (vertebroplastie + Coblation™; vertebroplastie + radioterapie) oferă un control mai eficient al sindromului algic decât tratamentele aplicate în monoterapie (vertebroplastia sau radioterapia).

### Noutatea adusă literaturii științifice din domeniu

Metodele combinate de tratament chirurgical minim invaziv (chifoplastie, vertebroplastie + Coblation™; vertebroplastie + radioterapie) al pacienților cu metastaze spinale, oferă un control mai bun al sindromului algic până la un an postintervențional, comparativ cu radioterapia (aplicată în monoterapie).

### Rezumat

**Introducere.** În prezenta cercetare, a fost studiată, comparativ, influența metodelor combinate de tratament chirurgical minim invaziv (chifoplastie, vertebroplastie + Coblation™; ver-

RESEARCH ARTICLE

## Pain assessment after combined surgical treatment of patients with spinal metastases: prospective, consecutive, descriptive study

Andrei Olaru<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>*Chair of orthopedics and traumatology, Nicolae Testemitanu State University of Medicine and Pharmacy, Chisinau, Republic of Moldova.*

**Manuscript received on: 08.05.2017**  
**Accepted for publication on: 05.06.2017**

### Corresponding author:

*Andrei Olaru, assistant professor*  
*Chair of orthopedics and traumatology*  
*Nicolae Testemitanu State University of Medicine and Pharmacy*  
*165, Stefan cel Mare si Sfânt ave., Chisinau, Republic of Moldova, MD-2004*  
*e-mail: spinalmetastases@mail.ru*

### What is not known yet, about the topic

There are no relevant data, known by comparative research of the effects of minimally invasive combined surgical methods (kyphoplasty, vertebroplasty + Coblation™, vertebroplasty + radiotherapy) with vertebroplasty and radiotherapy methods (applied in monotherapy) on pain in patients with spinal metastases.

### Research hypothesis

Combined treatment (vertebroplasty + Coblation™, vertebroplasty + radiotherapy) provides a more effective control of algic syndrome, than treatments applied in monotherapy (vertebroplasty or radiotherapy).

### Article's added novelty on this scientific topic

Combined methods of minimally invasive surgical treatment (kyphoplasty, vertebroplasty + Coblation™, vertebroplasty + radiotherapy) of patients with spinal metastases, provides a better control of algic syndrome up to a post-interventional year, compared with radiotherapy (applied in monotherapy).

### Abstract

**Introduction.** In this study, were study comparatively, the influence of minimally invasive surgical methods (kyphoplasty, vertebroplasty + Coblation™, vertebroplasty + radiothera-

tebroplastie + radioterapie) vs. metoda de radioterapie (aplicată în monoterapie), asupra durerii la pacienții cu metastaze spinale.

**Material și metode.** În studiu au fost înrolați 142 de pacienți, aflați la evidență în Cancer Registrul Republicii Moldova și diagnosticați cu metastaze în coloana vertebrală. Participanții înrolați au fost divizați în grupuri, în funcție de metoda chirurgicală combinată de care au beneficiat. Astfel, la 27 (19,0%) de pacienți li s-a efectuat chifoplastie, la 29 (20%) de pacienți s-a practicat vertebroplastie + Coblation™, iar în 33 (23,2%) de cazuri s-a practicat vertebroplastie + radioterapie. Alți 53 (37,3%) de pacienți au beneficiat exclusiv de radioterapie la coloana vertebrală cu scop de calmare a durerii și de control tumoral local; aceștia au constituit lotul de control. Autoevaluarea intensității durerii a fost efectuată cu ajutorul scorului vizual-analitic. Datele sunt prezentate sub formă de valori absolute și relative, medie și deviere standard sau interval de încredere de 95%. Teste statistice aplicate: t-Student, U Mann-Whitney, ANOVA.

**Rezultate.** Tehnicile chirurgicale minim invazive combinate, comparativ cu metoda de radioterapie (aplicată în monoterapie), au redus semnificativ mai mult din intensitatea durerii, din consumul de analgezice, începând cu prima săptămână de la finalizarea tratamentului și pe întreaga durată de monitorizare de 12 luni postintervențional.

**Concluzii.** La pacienții cu metastaze în coloana vertebrală, metodele minim invazive combinate de vertebroplastie au fost mai eficiente în reducerea intensității durerii postoperatorii și al necesarului de analgezice până la 12 luni postintervențional decât radioterapia izolată. Analiza comparativă a metodelor combinate de tratament chirurgical studiate, au demonstrat un control eficient al sindromului algic la distanță de 12 luni, oferind posibilitatea continuării tratamentului de fond și ameliorând, astfel, calitatea vieții și speranța de viață a pacienților respectivi.

**Cuvinte cheie:** metastaze spinale, vertebroplastie, chifoplastie, Coblation™, radioterapie, calitatea vieții, prognostic vital.

## Introducere

Importanța afecțiunilor oncologice în societatea și medicina contemporană este dictată de incidența lor crescândă în populație, gravitatea și prognoza lor, pierderile economice ale pacientului și ale societății, în întregime [1-3].

Deși incidența prin cancer în Republica Moldova este la un nivel comparativ mai redus decât media europeană, numărul cazurilor noi înregistrate sunt în creștere continuă. Astfel, doar în ultimii zece ani, incidența prin cancer a crescut de la 193,4 în 2005, la 266,4 de cazuri noi la 100 mii de populație, în 2015, ocupând locul doi printre principalele cauze de deces (după maladiile aparatului circulator). Numai în anul 2015, au fost luați la evidență 9391 de bolnavi primari, ceea ce este în creștere cu circa o mie de cazuri, comparativ cu anul 2014, când au fost înregistrați 8860 de bolnavi. Potrivit datelor din anul 2015, cele mai multe cazuri de îmbolnăvire de cancer în

py) with the radiotherapy method (applied in monotherapy) on pain in patients with spinal metastases.

**Material and methods.** In this study have been included 142 patients, registered in the Cancer Registry of the Republic of Moldova and diagnosed with the spine metastases. The participants, included in the study, were divided into groups according to the combined surgical method by which they were treated. Thus, at 27 (19.0%) patients were treated with kyphoplasty, 29 (20.0%) patients were treated with vertebroplasty + Coblation™ and in 33 (23.2%) cases with vertebroplasty + radiotherapy. Other 53 (37.3%) patients, who were given pure spine radiotherapy for pain relief and local tumor control, were the control group. Self-assessment of pain intensity was performed with visual-analogue score. The data is presented as absolute and relative values, average and standard deviation or 95% confidence interval. Applied statistical tests: t-Student, U Mann-Whitney, ANOVA.

**Results.** Combined minimally invasive surgical techniques, comparatively with the radiotherapy method (applied in monotherapy) have significantly reduced the pain intensity, the analgesic consumption, since the first week after finishing the treatment and for the entire 12-month post-intervention monitoring period.

**Conclusions.** In patients with vertebral column metastases, the minimally invasive combined methods of vertebroplasty, were more effective in reducing the intensity of post-operative pain and the need for analgesics up to 12 months postinterventive than isolated radiotherapy. The comparative analysis of the studied combined surgical treatment methods, demonstrated effective control of the algic syndrome at 12 months apart, offering the possibility of continuing background therapy and thus improving the quality of life and life expectancy of the patients.

**Key words:** spinal metastases, vertebroplasty, kyphoplasty, Coblation™, radiotherapy, quality of life, vital prognosis.

## Introduction

The importance of oncological affections, in contemporary society and medicine, is dictated by their increasing incidence in the population, their severity and prognosis, the economic losses of the patient and society as a whole [1-3].

Although the incidence of cancer in the Republic of Moldova is lower than the european average, the number of newly registered cases is steadily increasing. Thus, over the last ten years, cancer incidence has increased from 193.4 in 2005, to 266.4 new cases per 100000 population, in 2015, occupying the second place among the main causes of death of the population (after deaths from diseases of the cardiovascular system). Only in 2015, were registered 9391 primary patients, which is increasing by about one thousand cases, compared to 2014, when were registered 8860 patients. According to the data from 2015, most of the cases of cancer in the Republic

Republica Moldova au fost înregistrate pentru cancerul colorectal – (12,9%), urmat de cancerul glandei mamare (10,9%), al pielii (9,8%), cancerul pulmonar (9,5%) și hemoblastoze (7,1%). Rata mortalității pentru toate tipurile de cancer, în anul 2015 în Republica Moldova a constituit 136,9 de decese la 100 mii de populație (peste 6000 de persoane, anual) [4].

Caracteristic țării noastre este diagnosticarea tardivă. În peste jumătate din cazuri, pacienții sunt depistați în stadiul III-IV de avansare, cu metastaze răspândite, inclusiv, în coloana vertebrală. Acest fapt influențează negativ șansele de supraviețuire ale persoanelor diagnosticate cu maladii oncologice, nefiindu-le asigurat accesul la tratamente eficiente și la abordarea clinică multidisciplinară [5].

Manifestările clinice ale metastazelor în coloana vertebrală sunt variabile. Uneori, pacienții cu focare metastatice vertebrale pot fi asimptomatici, primele semne apărând numai după dezvoltarea fracturilor patologice. Totuși, cea mai răspândită manifestare clinică a focarului metastatic vertebral este durerea de spate, care poate avea un caracter difuz sau localizat, în funcție de răspândirea procesului metastatic în coloană. Durerile reprezintă cauza primordială de disconfort la 30-40% dintre pacienții suferinzi de tumori maligne în stadiile inițiale și pot anticipa cu 2-6 luni manifestările imagistice ale focarelor metastatice din coloana vertebrală. În cazul diseminării tumorale avansate, sindromul algic persistă la 55-100% dintre pacienți. Unii autori au demonstrat că există o anumită corelație dintre frecvența și intensitatea sindromului algic și histotipul tumorii primare [6-11].

Principalul obiectiv în tratamentul pacientului oncologic cu metastaze în coloana vertebrală este calmarea durerilor de spate. Calitatea analgeziei influențează direct calitatea vieții, fortifică capacitățile psihice și fizice de a continua tratamentul oncologic special [12].

Numeroase publicații au demonstrat o reducere a intensității durerilor de spate la pacienții cu metastaze spinale, atât în cazul aplicării tehnicilor chirurgicale minim invazive, cât și în utilizarea metodelor radioterapeutice de tratament [13-28]. În același timp, nu au fost identificate studii în care să fie comparate rezultatele obținute în urma tratamentelor aplicate.

Reieșind din cele enumerate anterior, am definit drept scop cercetarea comparativă a influenței metodelor combinate de tratament chirurgical minim invaziv (chifoplastie, vertebroplastie + Coblation™; vertebroplastie + radioterapie) cu metoda de radioterapie (aplicată în monoterapie), asupra durerii la pacienții cu metastaze spinale.

## Material și metode

Studiul realizat este de tip clinic, analitic, prospectiv, care a evaluat rezultatele tratamentului a 142 de pacienți cu metastaze în coloana vertebrală, care prezentau risc de fractură patologică sau cu fracturi patologice vertebrale deja produse, fără manifestări neurologice grave, tratați în perioada 2012-2015. Studiul a fost efectuat în conformitate cu principiile etice ale Declarației de la Helsinki și, în fiecare caz, a fost obținut consimțământul informat. Protocolul studiului a fost avizat favorabil de către Comitetul de Etică a Cercetării al USMF

of Moldova, were those of colorectal cancer – (12.9%), followed by breast cancer (10.9%), skin cancer (9.8%), lung cancer (9.5%) and hemoblastosis (7.1%). The mortality rate in the Republic of Moldova, in 2015, for all types of cancer, was 136.9 deaths per 100000 population (over 6000 people, annually) [4].

Characteristic for our country is late tumor detection. In over half of the cases, patients are detected with tumors in III-IV stage of advancement, with already established metastases, including the spine. This has a negative impact on the chances of survival of people diagnosed with oncological diseases, with no access to effective therapy and the multidisciplinary clinical management [5].

Clinical manifestations of the spine metastasis are various. Sometimes, patients with metastatic vertebral foci may be asymptomatic, and these foci may appear only after the development of pathological fractures. However, the most widespread clinical manifestation of the vertebral metastatic foci, is back pain, which may be diffuse or localized, depending on the spread of the metastatic process in the spinal column. Pain is the primary cause of discomfort in 30-40% of patients with malignant tumors in the initial stages and can anticipate 2-6 months of imagistic manifestations of metastatic foci in the spinal column. In the case of advanced tumor dissemination, algic syndrome persists in 55-100% of patients. Some authors have demonstrated that there is a certain correlation between the frequency and intensity of the algic syndrome and the primary tumor histotype [6-11].

The main objective in the treatment of the oncological patient with the spine metastases, is back pain relief. The quality of analgesia influences directly the quality of life, strengthens the mental and physical capacities to continue the special oncological treatment [12].

Various publications, have demonstrated a reduction in the intensity of back pain in patients with spinal metastases, both for the application of minimally invasive surgical techniques and the use of radiotherapy treatment methods [13-28]. At the same time, there were no studies in which were compared the obtained results from the applied treatment.

Based on the above, we have defined as a goal the comparative research of the influence of combined minimally invasive surgical methods (kyphoplasty, vertebroplasty + Coblation™, vertebroplasty + radiotherapy) with the radiotherapy method (applied in monotherapy) on pain in patients with spinal metastases.

## Material and methods

This research is clinically, analytically, prospectively, which evaluated the treatment results of 142 patients with spinal metastasis, who were at risk of pathological vertebral fractures, installed without serious neurological manifestations, treated during the 2012-2015 period. The study was conducted in accordance with the ethical principles of the Helsinki Declaration and in each case was obtained an informed consent. The protocol of the study has been advised by the Research Ethics Committee of the USMF „Nicolae Testemitanu” (report no. 13,

„Nicolae Testemițanu” (proces-verbal nr. 13 din 28.01.2013, președinte CEC – Mihail Gavriiliuc, dr. hab. șt. med., prof. univ.).

Drept criterii de includere a participantului în cercetare, au servit:

- acordul pacientului pentru participarea în studiu;
- vârsta >18 ani;
- prezența durerilor de spate cu o intensitate mai mare de 50 de puncte (în intervalul de 0-100 puncte pe SVA), refractare la medicația nespecifică (AINS);
- fractură patologică, secundară atingerii tumorale metastatice, cu un volum >50% din volumul corpului vertebral sau >25%, dar cu implicarea pediculului vertebral;
- confirmare imagistică prin metode contemporane (CT și/sau RMN);
- fără manifestări neurologice speciale;
- unghi de cifotizare locală >15° și/sau tasare vertebrală >¼ din înălțimea corpului vertebral (criteriile de stabilitate vertebrală fiind apreciate după scara SINS);
- speranța de viață >3 luni, apreciată după scara Tokuhashi.

Criterii de excludere din studiu au servit:

- prezența unei fracturi patologice vertebrale cu un colaps mai mare de 70%;
- compresie medulară simptomatică la nivelul fracturii (pareză profundă, plegie);
- tratamente suportate anterior la locul fracturii patologice vertebrale (în special, radioterapie);
- infecții locale (osteomielită, abces epidural sau discită);
- alergii la componentele cimentului osos;
- patologii cardio-pulmonară severă, coagulopatie necontrolabilă;
- refuzul pacientului de a participa la cercetare.

După aplicarea acestor criterii, au fost selectați 142 de pacienți, aflați la evidență în Cancer Registrul Republicii Moldova și diagnosticați cu metastaze în coloana vertebrală. Optzeci și nouă (62,7%) dintre participanții incluși în studiu, au fost divizați în grupuri, în funcție de metoda chirurgicală combinată, prin care au fost tratați și, anume: la 27 (19%) dintre pacienți li s-a efectuat chifoplastie (KP), la 29 (20%) dintre pacienți s-a practicat vertebroplastie + Coblation™ (VP+Co), iar în 33 (23,2%) din cazuri s-a practicat vertebroplastie + radioterapie (VP+RxT). Alți 53 (37,3%) de pacienți, care au beneficiat exclusiv de radioterapie la coloana vertebrală cu scop de ameliorare a durerilor și de control tumoral local, au constituit lotul de control.

Toate evaluările clinico-paraclinice și tehnicile de tratament, practicate pe parcurs, au fost efectuate de aceeași echipă.

#### *Evaluarea durerii și consumului de analgezice*

În cadrul prezentei cercetări, obiectivul major a fost studierea influenței tehnicilor chirurgicale combinate supra durerii. Pentru documentarea obiectivă a sindromului algic, pacienților li s-a propus să-și aprecieze intensitatea durerii după scala vizual-analogică de evaluare a durerii (SVA), aplicată pe parcursul a câtorva interviuri efectuate înainte de tratament, la 1 săptămână, la 1; 3; 6; 9 și 12 luni după tratament.

from 28.01.2013, CEC president – Mihail Gavriiliuc, PhD, university professor.)

The criteria for inclusion of the participant in the research served:

- patient consent for participation in the study;
- participant's age over 18 years;
- presence of back pain with an intensity greater than 50 points (0-100 range on VAS) refractory to non-specific medication (NSAIDs);
- pathological fracture secondary to metastatic tumor with a >50% of the vertebral body volume or >25%, but with the involvement of the vertebral pedicle;
- imagistic confirmation by contemporary methods (CT and/or MRI);
- without special neurological manifestations;
- local cornering angle >15° and / or spinal compression >¼ from the height of the vertebral body (the criteria for vertebral stability being assessed on the SINS scale);
- life expectancy >3 months, appreciated by the Tokuhashi scale.

Exclusion criteria from the study served:

- the presence of a pathological vertebral fracture with a collapse of more than 70%;
- symptomatic bone marrow compression at the fracture level (deep paresis, plegia);
- previously treatments at the place of the vertebral pathological fracture (especially radiotherapy);
- local infections (osteomyelitis, epidural abscess or discitis);
- allergy to the components of bone structure;
- severe cardio-pulmonary pathology, uncontrollable coagulopathy,
- the patient's refusal to participate in the research.

After applying these criteria, were selected 142 patients, registered in the Cancer Registry of the Republic of Moldova and diagnosed with spine metastases. Eighty nine (62.7%) participants included in the study, were divided into groups according to the combined surgical method they were treated, namely: 27 (19%) patients were treated with kyphoplasty (KP), 29 (20%) patients were treated with vertebroplasty + Coblation™ (VP+Co) and vertebroplasty + radiotherapy (VP+RxT) was used in 33 (23.2%) cases. Other 53 (37.3%) patients, who were given pure spine radiotherapy for pain relief and local tumor control, constituted the control group.

All clinical and paraclinical assessments and treatment techniques, practiced along the way, were performed by the same team.

#### *Evaluation of pain and the use of analgesics*

In the present study, the main objective was to study the influence of combined surgery techniques on pain. For objective documentation of algic syndrome, patients were offered to assess their pain intensity by the visual-analogue pain assessment scale (VAS), applied during several pre-treatment interviews, 1 week after finishing the treatment, and at 1; 3; 6; 9 and 12 months.



Totodată, la examinarea obiectivă a eficacității tratamentului, se ținea cont de refuzul pacientului de analgezice, de reluarea activităților cotidiene și de durata de menținere a efectului terapeutic.

În acest context, a fost documentat, în dinamică, consumul de analgezice și tipul acestora, conform scorului OMS: 0 – durere absentă, niciun analgezic nu este necesar; I – durere ușoară, care necesită medicație analgezică non-opioidă. De obicei, se administrează AINS cu sau fără terapie adjuvantă; II – durere moderată, care necesită asocierea de analgezice opioide slabe la analgezicele non-opioide sau, alternativ, asociații cu analgezice opioide, cu sau fără terapie adjuvantă; III – durere severă, în care opioidul slab este înlocuit cu un opioid puternic, în asociație cu un analgezic neopioid, cu sau fără terapie adjuvantă.

Tratamentul adjuvant al durerii este definit ca fiind acea medicație, asociată terapiei cu opioizi sau alte medicamente antalgice, care nu are acțiune primară analgezică, dar are rol de potențare a efectului acestor medicamente (antidepresante, anticonvulsivante, steroizi, neuroleptice etc.). Alegerea tipului de medicație adjuvantă depinde de tipul de durere prezentă la pacient și de eventualele simptome, asociate durerii, care trebuie combătute.

#### Evaluarea statică

În scopul procesării statistice a materialului acumulat pe durata studiului, a fost elaborată o bază de date digitală cu ajutorul programului „Statistical Package for the Social Science” (SPSS, Inc., Chicago, IL, 2012), versiunea 21.0 pentru MS Windows (Licența № 20130626-3), unde au fost codificate, introduse și stocate datele din fișele de examinare a participantului la studiu.

Prelucrarea statistică s-a efectuat cu ajutorul soft-ului licențiat IBM SPSS Statistics v. 21 și programului Microsoft Excel din pachetul Microsoft Office 2007. În baza acestor soft-uri, au fost calculate valorile medii, deviațiile și erorile standard, testele t-Student, u-Mann-Whitney, în funcție de tipul de distribuție al datelor. Prag de semnificație statistică a fost considerat un  $p < 0,05$ .

Pentru estimarea gradului de asociere dintre diverși factori non-parametrici, au fost aplicați testul de corelație Pearson, testul non-parametric Wilcoxon și coeficienții non-parametrici de corelație a rangurilor Spearman sau Friedman. Gradul de concludență a relațiilor corelative dintre parametrii evaluați s-a calculat prin coeficientul de corelație. Dependența statistică dintre parametrii calitativi s-a prezentat prin tabele de contingență, iar pentru verificarea ipotezei de independență a liniilor și coloanelor, s-a folosit criteriul  $\chi^2$ .

#### Rezultate

Participanții la studiu au avut vârsta medie de  $59,8 \pm 10,6$  de ani, cu limitele între 33 și 85 de ani. Repartizarea după gen a fost de 62 (43,7%) de bărbați și 80 (56,3%) de femei, raportul de sexe (masc/fem) fiind de 1:1,29. Cincizeci și opt (40,8%) dintre pacienți au provenit din mediul rural și 84 (59,2%) – din mediul urban, majoritar din mun. Chișinău – 68 (80,9%) de cazuri.

De menționat, numărul maximal de participanți în studiu a

At the same time, in the objective examination of the efficacy of the patients' treatment has been considered the patient's refusal of analgesics, the resumption of the daily activities and the length of the therapeutic effect.

Thus, were dynamically documented, the analgesic consumption and their type, according to the WHO score: 0 – no pain, no analgesics medication, no analgesic is necessary; I – mild pain, requires non-opioid analgesics medication. Usually are administered NAIDs with or without adjuvant therapy; II – moderate pain, weak opioid analgesics will be associated with non-opioid analgesics or alternatively associations with narcotic analgesics, with or without adjuvant therapy; III – severe pain, replaces the weak opioid with a strong opioid in association with a nonopioid analgesic, with or without adjuvant therapy.

Adjuvant treatment of pain is defined as the drug associated with opioid therapy or other analgesic drugs that does not have primary analgesic activity, but it aims to potentiate the effect of these drugs (antidepressants, anticonvulsants, steroids, neuroleptics etc.). Choosing the type of adjuvant medication depends on the type of pain, present in the patient and the possible pain-related symptoms to be treated.

#### Statistic evaluation

For the purpose of statistical processing of the material accumulated during the study, was developed a digital database, using the „Statistical Package for Social Science” (SPSS, Inc., Chicago, IL, 2012), version 21.0 for MS Windows (License No. 20130626-3), where were encoded, entered and stored the participant's data from examination records.

Statistical processing was performed using the licensed IBM SPSS Statistics v. 21 software and the Microsoft Excel 2007 Microsoft Office suite. Based on these software, were calculated average values, deviations and standard errors, t-Student test, u-Mann-Whitney, depending on the symmetry of the data dispersion, with the level of significance  $p < 0.05$ .

To evaluate assessment of dependency between various non-parametric factors, were applied the Pearson correlation index, the non-parametric Wilcoxon test and the non-parametric correlation coefficients of the Spearman or Friedman ranks. The degree of concluding correlative relationships, between the evaluated parameters, was calculated by the correlation coefficient. The statistical dependence, between the qualitative parameters, was presented by contingency tables, and the criterion  $\chi^2$  was used to verify the hypothesis of line and column independence.

#### Results

The study participants had an average age of  $59,8 \pm 10,6$  years, ranging from 33 to 85 years. The gender breakdown was 62 (43.7%) and 80 (56.3%) females, the gender ratio (masc/fem) being 1:1.29. Fifty-eight (40.8%) patients came from the rural area and 84 (59.2%) – from the urban area, most of them from Chisinau – 68 (80.9%) cases.

It is worth mentioning, that the maximum number of participants in the study was divided into the 50 and 70-years-

fost reprezentat de categoria de vârstă de 50-70 de ani, vârstă, în care se produc o serie de modificări substanțiale în homeostazia organismului uman și care crează condiții favorabile pentru dezvoltarea bolilor oncologice. În același timp, chiar dacă aveau stabilit un diagnostic oncologic, acești pacienți erau persoane active social și profesional.

Durata anamnesticii oncologice pozitive a variat de la 0 luni până la 312 luni, media fiind de  $32,2 \pm 43,8$  de luni.

Toți participanții la studiu au fost repartizați pe grupuri, ținând cont de etiologia tumorilor primare, diseminate în coloana vertebrală și de gradul lor de agresivitate (Tabelul 1).

**Tabelul 1.** Repartizarea pacienților conform nozologiei oncologice primare.

Tipul tumorii primare și gradul de malignitate	abs	%
<i>Cu viteză rapidă de creștere</i>		
▪ tumori canceroase ale tractului gastrointestinal	20	14,0
▪ cancer pulmonar	17	12,0
▪ tumori fără focar primar determinat	3	2,1
▪ melanom	1	0,7
▪ mielom	1	0,7
<i>Cu viteză medie de creștere</i>		
▪ cancer renal	7	4,9
▪ tumori din sfera ORL	2	3,8
▪ cancer de col uterin	4	2,8
<i>Cu viteză lentă de creștere</i>		
▪ cancer mamar	56	39,4
▪ cancer de prostată	31	21,8
Total	142	100,0

Marea majoritate a pacienților – 139 (97,9%) – au beneficiat de tratament sistemic al focarului tumoral primar; 3 (2,1%) dintre pacienți nu au primit niciun tratament sistemic.

Dintre cei care au primit tratamente anterioare, 95 (66,9%) de pacienți au urmat tratamente combinate (intervenție chirurgicală la focarul primar + cure de polichimioterapie și/sau radioterapie); 18 (12,7%) pacienți au urmat tratament combinat nechirurgical (cure de polichimioterapie și/sau radioterapie); 15 (10,6%) pacienți au urmat, cel puțin, o cură de RxT la focarul tumoral primar, iar 9 (6,3%) pacienți au urmat, cel puțin, o cură de polichimioterapie. Doi (1,4%) pacienți au beneficiat doar de tratament chirurgical la focarul tumoral primar.

Tratamentul pacientului oncologic cu metastaze spinale este un proces complex și dinamic, care necesită reevaluări frecvente ale intensității sindromului algic pentru verificarea eficacității terapiei administrate și facilitarea ajustării dozelor. Pentru un control eficient al durerii, trebuie evaluate dimensiunile ei fizice, psiho-sociale și impactul funcțional.

Intensitatea durerii, în funcție de tipurile de tratamente aplicate și de etapa de înregistrare a datelor, este prezentată în Tabelul 2.

La momentul examinării primare, toți pacienții prezentau drept acuză de bază durerea de spate, cu sau fără iradiere în teritoriile somato-metamerice corespunzătoare segmentului vertebral afectat, evaluate la peste 50 de puncte ale SVA. Gradul de intensitate al durerii depindea de gravitatea procesului patologic în segmentul afectat. La pacienții care nu aveau fracturi patologice, durerile aveau un caracter cronic, fără o legătură strânsă cu eforturile axiale și, uneori, scădeau în inten-

old age group, at which there are substantial changes in the human homeostasis, which create favorable conditions for the development of oncological diseases. At the same time, even if they had an oncology diagnosis, these patients were socially and professionally active.

The duration of the positive oncological anamnesis of the patients, ranged from 0 months to 312 months, the average being of  $32.2 \pm 43.8$  months.

All participants in the study were divided into groups, taking into account the etiology of primary tumors, disseminated in the spine and their aggressiveness (Table 1).

**Table 1.** Distribution of patients by etiology of primary tumors.

Type of primary tumor and degree of malignancy	abs	%
<i>With rapid growth rate</i>		
▪ cancer tumors of gastrointestinal tract	20	14.0
▪ lung cancer	17	12.0
▪ tumors without primary determined foci	3	2.1
▪ melanoma	1	0.7
▪ myeloma	1	0.7
<i>With average growth rate</i>		
▪ renal cancer	7	4.9
▪ otorhinolaryngology sphere tumors	2	3.8
▪ uterine cervical cancer	4	2.8
<i>With a slow growth rate</i>		
▪ breast cancer	56	39.4
▪ prostate cancer	31	21.8
Total	142	100.0

The vast majority of patients – 139 (97.9%) – were subjected to systemic treatments at the primary tumoral foci and 3 (2.1%) patients received no systemic treatment.

Of those receiving previous treatments, 95 (66.9%) patients, followed combined treatments (surgery at primary focus + polychemotherapy and/or radiotherapy cures), 18 (12.7%) patients followed combined treatment (polychemotherapy and/or radiotherapy cures), 15 (10.6%) patients followed at least one RxT cure at the primary tumoral foci, and 9 (6.3%) patients followed at least one polychemotherapy cure. Two (1.4%) patients were subjected only to surgical treatment at the primary tumoral foci.

Treatment of the oncological patient with spinal metastases is a complex and dynamic process that requires frequent reassessment of algic syndrome, to check the efficacy of administered therapy and to facilitate dose adjustment. For effective pain control, its dimensions (physical, functional, psychosocial) must be assessed.

The intensity of pain, depending on the types of treatments applied and the data recording phase, is presented in Table 2.

At the time of the primary examination, all patients presented a back pain, with or without irradiance, in the somato-metameric territories corresponding to the affected vertebral segment, assessed at over 50 VAS points. The degree of pain intensity, depended on the severity of the pathological process in the affected segment. In patients without pathological fractures, the pain has chronic character, without a close connection with the axial efforts and sometimes decreased in intensity on their own. In patients with vertebral pathological

**Tabelul 2.** Intensitatea durerii (puncte SVA), în funcție de tipul tratamentului aplicat și de etapele de înregistrare a datelor.  
**Table 2.** Pain intensity (VAS points), depending on the type of treatment applied and the data recording phases.

Etape / phases	RxT <sup>†</sup>	SX <sup>‡</sup>	KP <sup>#</sup>	VP+Co <sup>¶</sup>	VP+RxT <sup>§</sup>
până la tratament <i>before the treatment</i>	67,92±7,93 [50; 80]	70,79±8,69 [50; 90]	69,26±8,74 [60; 90]	71,03±9,39 [50; 90]	71,82±8,08 [60; 90]
la 1 săptămână <i>at 1 week</i>	57,17±10,63 [30; 70]	46,52±11,39 [20; 80]	47,04±10,31 [30; 70]	46,90±11,37 [20; 80]	45,76±12,51 [20; 70]
la 1 lună <i>at 1 months</i>	48,49±11,50 [20; 70]	34,94±10,57 [10; 70]	35,56±9,34 [20; 50]	34,83±9,50 [20; 70]	34,55±12,52 [10; 60]
la 3 luni <i>at 3 months</i>	39,25±13,71 [10; 70]	21,69±10,79 [0; 60]	24,23±9,02 [0; 40]	22,41±10,23 [10; 60]	22,41±9,88 [0; 50]
la 6 luni <i>at 6 months</i>	34,34±20,62 [0; 80]	12,02±9,56 [0; 50]	15,24±7,50 [0; 40]	14,62±8,12 [0; 40]	14,80±9,63 [0; 50]
la 9 luni <i>at 9 months</i>	25,53±22,02 [0; 70]	11,71±15,70 [0; 60]	22,86±17,73 [0; 60]	20,50±15,72 [0; 60]	16,43±14,99 [0; 60]
la 12 luni <i>at 12 months</i>	27,19±20,83 [0; 80]	18,14±19,73 [0; 90]	23,57±17,37 [0; 60]	24,29±20,87 [0; 90]	22,63±20,23 [0; 80]

Notă: datele sunt prezentate sub formă de valori medii ± deviere standard [extreme]. <sup>†</sup>- radioterapie; <sup>‡</sup>- tratament chirurgical; <sup>#</sup>- chifoplastie; <sup>¶</sup>- vertebroplastie + Coblation<sup>™</sup>; <sup>§</sup>- vertebroplastie + radioterapie.

Note: data are presented as average ± standard deviation [extremes]. <sup>†</sup>- radiotherapy; <sup>‡</sup>- surgical treatment; <sup>#</sup>-kyphoplasty; <sup>¶</sup>- vertebroplasty + Coblation<sup>™</sup>; <sup>§</sup>- vertebroplasty + radiotherapy.

sitate de la sine. La pacienții cu fracturi patologice vertebrale, durerile surveneau acut, în urma producerii fracturii și depindeau direct de solicitarea axială, având un caracter permanent și sporeau în intensitate pe măsura progresării patologiei.

După aprecierea intensității sindromului algic pe durata studiului, pacienții au fost divizați, convențional, în grupuri, în funcție de severitatea durerilor, apreciate în baza SVA: fără durere (0-19 p), durere ușoară (20-39 p), durere moderată (40-69 p), durere puternică (70-89 p), durere severă (90-100 p) (Figura 1).

Analiza datelor din Figura 1 a pus în evidență faptul că, începând cu prima săptămână după aplicarea tratamentelor, în toate loturile s-au înregistrat o scădere a numărului de pacienți cu dureri puternice și severe, marea lor majoritate trecând în grupele cu dureri moderate și/sau ușoare. Totuși, această tendință a fost mai evidentă la pacienții tratați chirurgical, care s-a menținut timp de 6 luni postoperator.

Astfel, la 6 luni distanță, 100% dintre pacienții tratați chirurgical au menționat o ameliorare vădită a intensității durerilor vs. 47 (88,7%) de pacienți, care au urmat doar cura de RxT, dintre care 3 (6,4%) pacienți au menționat o scădere neimportantă a intensității durerilor (<10 mm pe SVA). Alți 4 (7,5%) pacienți, tratați prin RxT, au apreciat aceiași intensitate a durerilor ca și până la tratament, iar 2 (3,8%) pacienți au menționat o agravare nesemnificativă a durerilor (>10 mm pe SVA), comparativ cu cele de până la tratament.

Deoarece în intervalul de 6-12 luni, la unii pacienți, din cauza unor evenimente patologice (pneumonii, agravare neurologică, fracturi patologice ale scheletului axial și periferic, hemoragii etc.) a decompensat maladia de bază, s-a înregistrat o creștere a intensității durerilor, fapt ce a necesitat intervenții terapeutice suplimentare.

În aceste circumstanțe, la examinarea de la 12 luni, au fost

fractures, the pain occurred acutely after the fracture production, and were directly dependent on the axial stress, having a permanent character and increasing in intensity as the pathology progressed.

Estimating the intensity of the algic syndrome, during the study, patients were conventionally divided into groups according to the severity of the pain, assessed on the VAS basis: no pain (0-19 p), mild pain (20-39 p), moderate pain (40-69 P), strong pain (70-89 p), severe pain (90-100 p) (Figure 1).

Data analysis in Figure 1, highlighted the fact that starting with the first week after the initiation of the treatments, in both groups was found a decrease in the number of patients with strong and severe pain, the vast majority of them being in groups with moderate and / or mild pain. However, this trend was more evident in surgically treated patients, thus maintaining it in both groups up to 6 months.

Therefore, at 6 months after, 100% of the surgically treated patients noted a marked improvement in pain intensity vs. 47 (88.7%) patients who followed only the RxT cure, of which 3 (6.4%) patients, reported an unimportant decrease in pain intensity (<10 mm on VAS). Other 4 (7.5%) patients, treated with RxT, rated the same pain intensity as before the treatment, and 2 (3.8%) patients reported an insignificant pain worsening (>10 mm on VAS) compared to those before the treatment.

Because, within 6-12 months, some patients, due to pathological events (pneumonia, neurological aggravation, axonal and peripheral skeletal fractures, haemorrhages etc.), has decompensated the underlying disease, and also was found an increase in pain intensity, which has required additional therapeutic efforts.

In this case, at the 12-month examination, were evaluated 70 (78.7%) surgically treated patients and only 32 (60.4%)

evaluați 70 (78,7%) de pacienți tratați chirurgical și doar 32 (60,4%) de pacienți, tratați prin RxT. Restul pacienților fie decedaseră, fie nu s-au prezentat din cauza agravării maladiei de bază. Dintre acei care s-au prezentat, la 12 (17,15%) pacienți tratați chirurgical s-a apreciat o scădere ne semnificativă a intensității durerilor, comparativ cu evaluarea de la 6 luni. La pacienții tratați prin RxT, s-a apreciat o scădere a intensității durerilor la 8 (25%) dintre ei, comparativ cu evaluarea de la 6 luni. La 5 pacienți din acest subgrup, durerea s-a redus ne semnificativ.

La alți 32 (45,7%) de pacienți tratați chirurgical, s-a determinat o creștere a intensității durerilor, comparativ cu evaluarea de la 6 luni; dintre ei, 15 (46,9%) au prezentat o creștere ne semnificativă. La 16 (50%) pacienți tratați prin RxT, s-a determinat o creștere a intensității durerilor, comparativ cu evaluarea de la 6 luni; dintre ei, 10 (31,2%) au prezentat o creștere ne semnificativă.

Evaluarea intensității durerilor de la 12 luni a pus în evidență faptul că 26 (37,2%) de pacienți, tratați chirurgical, au prezentat aceeași intensitate a durerilor, comparativ cu evaluarea de la 6 luni. Iar în grupul de pacienți tratați prin RxT, 8 (25%) pacienți prezentau aceeași intensitate a durerilor, comparativ cu evaluarea de la 6 luni. La 2 (2,9%) pacienți tratați chirurgical și la 4 (12,5%) pacienți, tratați prin RxT, nu s-a determinat o evoluție clară a intensității durerilor la distanță de 12 luni, aceasta păstrându-se în limita valorilor de până la tratament, indiferent de tratamentele aplicate.

În pofida faptului că la distanță de 12 luni, în loturile de studiu s-a atestat o ușoară creștere a intensității sindromului algic, comparativ cu valorile obținute la evaluarea de la 6 luni, trendul de ameliorare a durerilor s-a menținut, neidentificându-se nicio diferență statistică între acestea.

Dinamica intensității durerii (puncte pe SVA) față de etapa

patients treated with RxT. Others were either deceased or failed due to worsening of the underlying disease. Of those presented, 12 (17.15%) patients, treated surgically, it was found an insignificant decrease in pain intensity, as compared to the 6-month assessment. At patients treated with RxT, we assessed a decrease in pain intensity at 8 (25%) patients, compared to the 6-month assessment. Of these, 5 patients showed an insignificant decrease.

In another 32 (45.7%) surgically treated patients, was determined an increase in pain intensity, compared with the 6-month assessment, of which 15 (46.9%) patients showed an insignificant increase. In 16 (50%) patients, treated with RxT, was determined an increase in pain intensity, compared to the 6-month assessment, 10 (31.2%) of them showing an insignificant increase.

The evaluation of pain intensity at 12 months, revealed that 26 (37.15%) patients, treated surgically, had the same pain intensity as compared to the 6-month assessment. And in the RxT treated group, 8 (25%) patients had the same pain intensity as compared to the 6-month assessment. At 2 (2.9%) surgically treated patients and at 4 (12.5%) patients treated with RxT, a clear evolution of pain intensity at 12-month distances, was not established, however, it has remained within the same limits up to treatment, regardless of the previous treatments.

Despite the fact, that at 12 months, in both groups was registered a slight increase in the intensity of the algic syndrome, compared to the obtained values at the 6-month evaluation, the pain-relieving trend remained in both groups, without any statistical difference between them.

Dynamics of pain intensity (VAS points) over the treatment

**Tabelul 3.** Dinamica intensității durerii (puncte pe SVA) față de etapa de până la tratament, în funcție de tipul tratamentului aplicat.

**Table 3.** Pain intensity dynamics (VAS points) versus before treatment stage, depending on the type of treatment applied.

Etapa de timp Follow up	RxT <sup>†</sup>	SX <sup>‡</sup>	KP <sup>#</sup>	VP+Co <sup>¶</sup>	VP+RxT <sup>§</sup>
la 1 săptămână at 1 week	-10,76±6,75	-24,27±10,1	-22,22±8,01	-24,14±10,18	-26,06±11,44
la 1 lună at 1 month	-8,68±3,94	-11,57±4,98	-11,48±6,02	-12,07±4,91	-11,21±4,15
la 3 luni at 3 months	-9,25±6,75	-13,26±5,17	-11,92±4,02	-12,41±5,77	-14,83±5,09
la 6 luni at 6 months	-4,31±10,63*	-9,66±8,04	-11,91±6,02	-8,85±8,16	-9,13±8,48
la 9 luni at 9 months	+2,67±12,02**	+0,49±12,76**	+7,27±14,21**	+6,0±11,43*	-2,14±9,75**
la 12 luni at 12 months	+9,17±11,39*	+10,0±12,39	+12±15,49*	+14,67±15,98*	+12,5±10,55*
dinamica totală (pretratament – 12 luni) total dynamics (pretreatment – 12 months)	-34,82±17,62	-52,29±18,66	-48,57±14,6	-45,71±21,35	-50±19,15

Notă: datele sunt prezentate sub formă de valori medii ± eroare standard. <sup>†</sup>– radioterapie; <sup>‡</sup>–tratament chirurgical; <sup>#</sup>–chifoplastie; <sup>¶</sup>– vertebroplastie + Coblation™; <sup>§</sup>– vertebroplastie + radioterapie. \*– p<0,05; \*\*– p<0,01.

Note: data are presented as average ± standard error. <sup>†</sup>– radiotherapy; <sup>‡</sup>– surgical treatment; <sup>#</sup>–kyphoplasty; <sup>¶</sup>– vertebroplasty + Coblation™; <sup>§</sup>– vertebroplasty + radiotherapy. \*– p<0.05; \*\*– p<0.01.

de până la tratament, în funcție de tipul tratamentului aplicat, este prezentată în Tabelul 3.

Conform Tabelului 3, în loturile studiate, tendința de reducere semnificativă a intensității durerilor s-a menținut până la termenul de 9 luni, după care, către 12 luni de monitorizare, această diferență a diminuat.

Compararea statistică a grupelor de pacienți tratați chirurgical a stabilit că aplicarea tehnicii de KP a ameliorat intensitatea durerilor cu  $-48,57 \pm 14,6$  puncte SVA, tehnica VP+Co – cu  $-45,71 \pm 21,34$  puncte SVA, iar tehnica VP+RxT – cu  $-50,0 \pm 19,15$  puncte SVA.

Analiza impactului tehnicilor chirurgicale minim invazive asupra intensității sindromului algic în subgrupele de pacienți tratați chirurgical nu a identificat diferențe statistice semnificative. Cu toate acestea, în subgrupul de pacienți tratați prin metoda VP+RxT, la distanță de 12 luni după tratament, s-a observat un control mai eficient al durerilor, comparativ cu pacienții tratați prin celelalte tehnici chirurgicale minim invazive. Din cele enumerate anterior, putem afirma că tehnicile chirurgicale minim invazive au avut un impact curativ mult mai puternic asupra intensității sindromului algic, comparativ cu metoda RxT, în monoterapie.

La pacienții cercetați au fost evidențiate trei tipuri de durere: de oase (axială), radiculară și cu caracter mixt. Evoluția durerilor date la o distanță de 6 și 12 luni, în funcție de tratamentul efectuat, este prezentată în Figura 2. Astfel, în lotul chirurgical au predominat pacienții cu dureri radiculare și de tip mixt, pe când în lotul tratat prin RxT – durerile axiale (de oase). La evaluarea de la 6 luni după aplicarea tratamentelor, 65 (73%) dintre pacienții tratați chirurgical nu au prezentat dureri vs. 9 (17%) pacienți, tratați prin RxT. La un an distanță, 45 (63,8%) de pacienți tratați chirurgical nu au prezentat dureri vs. 11 (34,4%) pacienți, tratați prin RxT.

Așadar, la 6 luni distanță după aplicarea tratamentelor, în loturile studiate s-a evidențiat o scădere a numărului de pacienți cu dureri axiale. Referitor la grupul de pacienți tratați prin RxT, în lotul de bază, 2 (2,2%) pacienți au prezentat dureri axiale la 6 luni după tratament vs. 5 (5,6%) pacienți, înainte de tratament; în lotul de control – 6 (11,3%) pacienți au prezentat dureri axiale la 6 luni după tratament vs. 17 (32,1%) pacienți, înainte de tratament.

La distanță de un an după aplicarea tratamentelor, însă, în ambele loturi a crescut numărul pacienților cu dureri axiale cu câte un caz. Astfel, în lotul de pacienți tratați chirurgical – 3 (4,3%) persoane au prezentat dureri axiale, iar în cel tratat prin RxT – 7 (21,9%). De menționat că majorarea numărului de pacienți cu dureri axiale nu a însemnat și menținerea intensității durerilor la nivelul de până la tratament.

La 6 luni distanță, după aplicarea tratamentelor, în grupul de pacienți cu dureri de tip radicular, s-a observat o creștere neimportantă a numărului de cazuri în ambele loturi: de la 16 (18%) la 17 (19,1%) pacienți, în lotul tratat chirurgical, și de la 13 (24,5%) la 17 (32,1%) cazuri, în lotul tratat prin RxT. La distanță de un an, în ambele loturi s-a înregistrat o scădere a numărului de pacienți cu dureri de tip radicular. Însă, în lotul de pacienți tratați prin RxT, numărul acestora a scăzut considerabil, de la 17 (19,1%) la 2 (6,3%). Aceasta se explică prin faptul

stage, depending on the type of applied treatment, is shown in Table 3.

According to Table 3, in the studied groups, the tendency to significantly reduce pain intensity, was maintained until the 9-month period, after which, to 12 months of monitoring, this difference diminished.

Statistical evaluation, among surgically treated patient groups, determined that KP technique improved pain intensity by  $-48.57 \pm 14.6$  VAS points, VP+Co practice improved pain intensity by  $-45.71 \pm 21.34$  VAS points and the VP+RxT technique – by  $-50.0 \pm 19.15$  VAS points.

Analysis of the impact of minimally invasive surgical techniques on algal syndrome intensity, in subgroups of surgically treated patients, did not reveal significant statistical differences. However, in the subgroup of patients treated with the VP+RxT method, 12 months after treatment, was observed a better control of pain, compared to patients treated by other minimally invasive surgical procedures. From the above, we can say that minimally invasive surgical techniques had a much stronger curative impact on algal syndrome, compared to RxT in monotherapy.

Depending on the prevalence of pain in the investigated patients, we highlighted three types of subjective pain: bone or axillary pain, radicular pain and mixed pain. The evolution of pain at 6 and 12 months, depending on the treatment, is shown in Figure 2. Thus, in the surgical group, predominated the patients with radicular and mixed type pain, while in the group treated with RxT – axial pain (bone). At the 6-month post-treatment evaluation, 65 (73%) surgically treated patients did not show any pain vs. 9 (17%) patients treated with RxT. At one year's distance, 45 (63.8%) surgically treated patients did not show any pain vs. 11 (34.4%) patients treated with RxT.

So, 6 months after application of the treatments, the studied groups showed a decrease in the number of patients with axial pain. In the group of patients treated with RxT, in the basic group, 2 (2.2%) patients had axial pain after 6 months of treatment vs. 5 (5.6%) patients before treatment, and in the control group – 6 (11.3%) patients experienced axial pain at 6 months of treatment vs. 17 (32.1%) patients before treatment.

But at one year after treatment, the number of patients with axial pain in both groups increased by one case. Thus, in the group of patients treated surgically – 3 (4.3%) patients had axial pain, and in the group of patients treated with RxT – 7 (21.9%). It should be noted, that the increase in the number of patients with axial pain, did not mean maintaining pain intensity up to treatment.

At 6 months after treatment, in the group of patients with radicular pain type, there was a notable increase in the number of cases registered in both groups: from 16 (18%) to 17 (19.1%) patients in the group of patients treated surgically and from 13 (24.5%) to 17 (32.1%) cases in the group of patients treated with RxT. At one year's notice, there was a decrease in the number of patients with radicular pain type in both groups. However, the number of patients treated with RxT decreased considerably from 17 (19.1%) to 2 (6.3%) patients. This is explained by the fact that a number of patients,

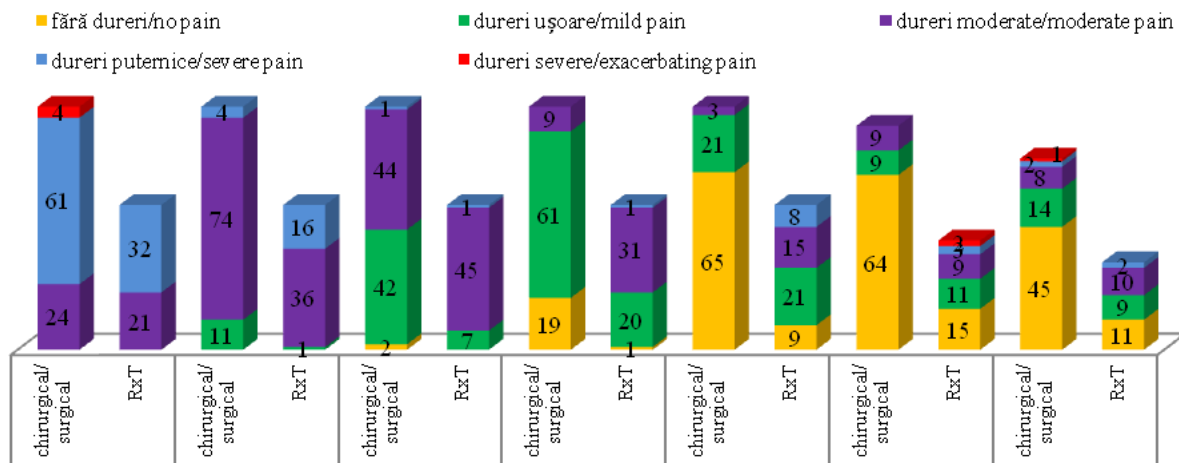


Fig. 1 Distribuția intensităților durerii în loturile chirurgical vs. radioterapie pe durata monitorizării.

Fig. 1 Distribution of pain intensity in surgical vs. radiotherapy groups during follow up.

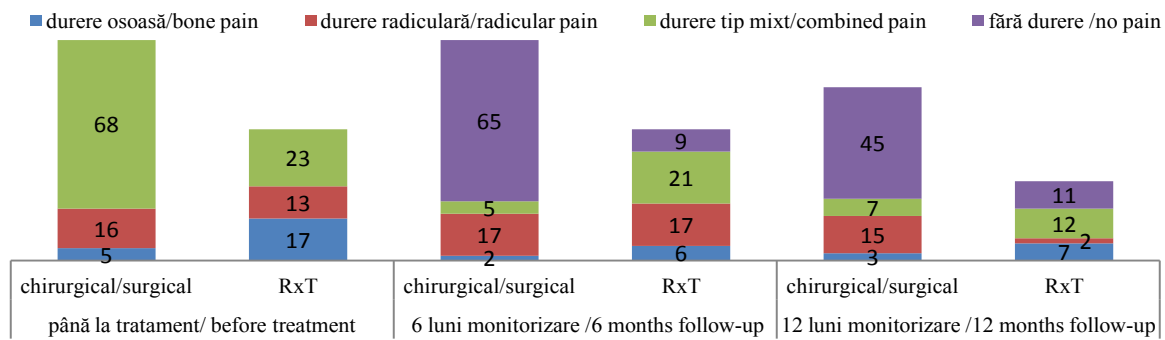


Fig. 2 Repartizarea pacienților în funcție de tipul de durere, înainte, la 6 și la 12 luni după tratament.

Fig. 2 Patients' distribution according to pain types, before, at 6 and at 12 months after treatment.

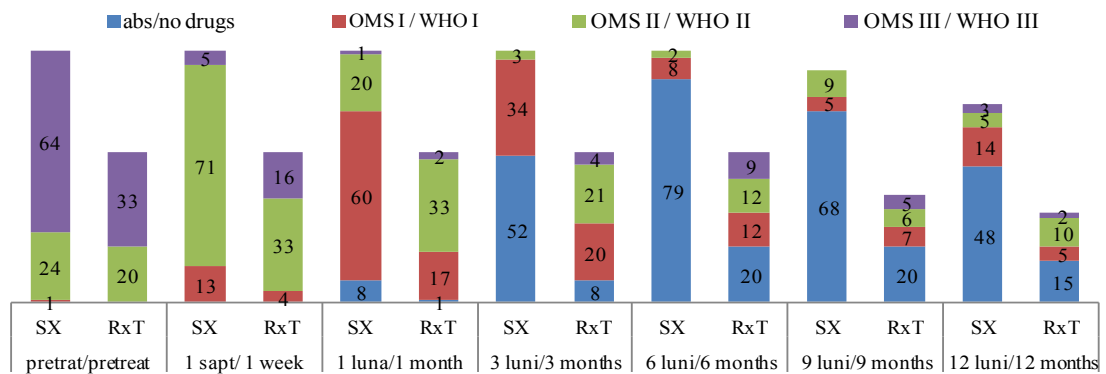


Fig. 3 Aplicarea palierelor OMS de analgezie în loturile de tratament chirurgical vs. radioterapie, pe durata monitorizării.

Fig. 3 Use of WHO analgesic ladder in surgical vs. radiotherapy treatment groups of patients during follow up.

că o serie de pacienți, pe fundalul tratamentului simptomatic, au necesitat reluarea RxT la coloana vertebrală.

Totodată, la 6 luni distanță după aplicarea tratamentelor, în lotul chirurgical s-a înregistrat o scădere extrem de importantă (de peste 13 ori) a numărului de pacienți cu dureri de tip mixt, de la 68 (76,4%) de cazuri la 5 (5,6%) cazuri, spre deosebire de lotul tratat prin RxT, unde s-a observat o scădere ne semnificativă a numărului de pacienți cu dureri de tip mixt – de la 23 (43,4%) la 21 (39,6%) de cazuri. La un an distanță, însă, în lotul chirurgical s-a determinat o creștere a numărului de pacienți cu dureri de tip mixt, de la 5 (5,6%) la 7 (10%) cazuri. Pe când, în lotul RxT, s-a observat o scădere a numărului de pacienți cu dureri de tip mixt, de la 21 (39,6%) la 12 (37,5%) cazuri.

Tot în acest context, dintre cei 115 (81%) pacienți, care au prezentat dureri nocturne până la tratament, în lotul chirurgical, la 6 luni distanță, le-au prezentat 11 (12,4%) pacienți vs. 73 (63,5%) de pacienți, de până la tratament; iar în lotul RxT, rezultatele au fost, respectiv, 19 (35,8%) vs. 42 (36,5%). În mod analogic, la 12 luni distanță vs. până la tratament, rezultatele au fost, pentru lotul chirurgical și cel RxT, respectiv: 6 (8,6%) vs. 73 (63,5%) și 8 (25%) vs. 42 (36,5%).

Pentru evaluarea influenței sindromului algic asupra calității vieții, a fost documentată dinamica consumului de analgezice și tipului acestora, conform palierelelor OMS. Începând cu prima săptămână după tratamentele aplicate, în ambele loturi, consumul de analgezice a scăzut, tendința menținându-se pentru următoarele șase luni. Mai mult decât atât, începând cu prima lună, o serie de pacienți au renunțat definitiv sau parțial la medicația analgezică, micșorând dozele efective administrate nictemeral sau, chiar trecând la altă categorie, mai ușoară, de analgezice (de obicei, AINS). Această tendință s-a dovedit a fi mult mai puternică la pacienții tratați chirurgical, comparativ cu cei tratați prin RxT, menținându-se pe durata primelor 12 luni de monitorizare.

Totuși, în intervalul 6-12 luni, o parte dintre pacienți se aflau în faza terminală a maladiei de bază, din cauza decompensării somatice. Acești pacienți prezentau dureri severe și necesitau tratament simptomatic, inclusiv cu analgezice opioide (Figura 3).

Consumul de analgezice și tipul acestora au corelat direct ( $r > 0,7$ ;  $p < 0,05$ ) cu durata anamneșticului pozitiv de boală oncologică, cu durata sindromului algic și nu au depins de tipul tratamentelor aplicate anterior.

Astfel, tehnicile chirurgicale minim invazive combinate, comparativ cu metoda RxT în monoterapie, au redus semnificativ consumul de analgezice și au modificat tipul acestora, începând cu prima săptămână de monitorizare postintervențională.

Între subgrupurile de pacienți tratați chirurgical, nu au fost evidențiate diferențe statistice semnificative în consumul de analgezice pe durata monitorizării.

## Discuții

Apariția durerilor osoase vertebrale, secundare afectării tumorale, este răspunsul la acțiunea locală atât a factorilor histochimici, cât și celor mecanici, care stimulează terminațiile

against administered symptomatic treatment, required a repeated RxT of the vertebral column.

At the same time, 6 months after the treatment, in the group of patients treated surgically, there was an extremely significant decrease (more than 13 times) of patients with mixed pain type at 68 (76.4%) cases in 5 (5.6%) cases, as opposed to the group of patients treated with RxT, where there was an insignificant decrease in the number of patients with mixed pain type – from 23 (43.4%) cases to 21 (39.6%) cases. But a year after, the number of patients with mixed pain type increased from 5 (5.6%) to 7 (10%) cases. While in the group of patients treated with RxT there was a decrease in the number of patients with mixed pain type from 21 (39.6%) cases to 12 (37.5%) cases.

In this context, out of the 115 (81%) patients, that have nocturnal pain before the treatment, only 11 (12.4%) patients from the group of patients treated surgically at 6 months after, experienced nocturnal pain vs. 73 (63.5%) patients before the treatment, and in the group of patients treated with RxT, 19 (35.8%) patients vs. 42 (36.5%). Analogously, at 12 months away vs. Before the treatment, the results were, for the surgical group and RxT group, respectively: 6 (8.6%) vs. 73 (63.5%) and 8 (25%) vs. 42 (36.5%).

In order to assess the influence of the algal syndrome on the quality of life, was documented the dynamics of analgesic consumption and their type according to the WHO ladder. Starting with the first week after the applied treatment, in both groups the consumption of analgesics decreased, this has been keeping in dynamics for the next six months. Moreover, starting with the first month, a number of patients have given up definitively or in part to analgesic medication, reducing effective doses, administered per 24 hours, or even changing to another easier class of analgesics, (usually NSAIDs). This trend proved to be much stronger in the surgically treated patients compared to those treated with RxT, and was maintained during the first 12 months of follow-up.

However, between 6 and 12 months, some patients were in the terminal phase of the underlying disease due to somatic decompensation. These patients experienced severe pain and required symptomatic treatment, including palliative opioid analgesic support (Figure 3).

Consumption of analgesics and their type correlated directly ( $r > 0.7$ ;  $p < 0.05$ ) with the duration of the positive history of oncological disease, duration of the algic syndrome and did not depend on the type of treatments applied previously.

Therefore, combined minimally invasive surgical techniques, compared to the RxT in monotherapy, significantly reduced analgesic consumption and have changed their type, starting with the first week after treatment.

There were no statistically significant differences in analgesic consumption during monitoring over the subgroups of patients treated surgically.

## Discussion

The appearance of spinal bones pain, caused by tumoral invasion, is the response of the local action of both histochemi-

nervoase ale periostului. La fazele inițiale, nociceptorii sunt stimulați de amine biogene, factorii activatori ai osteoclastelor, dar și de substanțe generatoare de osteoliză. Odată cu dezvoltarea procesului tumoral, crește presiunea intraosoasă în focarul distructiv, are loc amplificarea procesului de osteoliză și compresia țesuturilor adiacente, inclusiv, a terminațiilor nervoase. Solicitarea mecanică a osului modificat patologic, deformat și instabil, de asemenea, generează impulsii nociceptive aferente [6-9].

Tratamentul pacienților cu metastaze în coloana vertebrală reprezintă o problemă actuală, aflată la interfața mai multor discipline clinice (oncologie, ortopedie, neurochirurgie și radioterapie). Faptul generează discuții în contradictoriu referitor la aplicabilitatea fiecărui procedeu terapeutic: corecția deformației vertebrale și recuperarea funcțiilor coloanei vertebrale, decompresia medulei spinale sau controlul tumoral prin polichimioterapie și/sau RxT, hormonoterapie, tratamente imunomodulante. Controversele persistă din cauză că pe parcursul unei perioade destul de îndelungate, s-a menținut o doctrină conservatoare referitoare la tratamentul categoriei date de pacienți [13].

În anii 1960-1970, metoda de elecție în tratamentul focarelor metastatice vertebrale era RxT, atât ca monoterapie, cât și în asociere cu procedee chirurgicale de decompresie. Rezultatele demonstau o eficiență satisfăcătoare, rata complicațiilor după radioterapie fiind similară celor după tratamentul chirurgical. Aceasta se explică prin faptul că metoda de bază de tratament chirurgical era laminectomia decompresivă, rezultatele căreia nu diferă esențial de cele ale RxT [20, 28].

Deoarece metodele conservative de tratament ale sindromului algic la pacientul cu metastaze în coloana vertebrală nu oferă un control adecvat al durerii, s-a impus căutarea unor metode chirurgicale paliative de control al acesteia. Este vorba, în primul rând, de diminuarea sindromului algic, stabilizarea focarului de fractură patologică vertebrală și obținerea unui control tumoral local de durată, utilizând metode noi, minim invazive de tratament, în speranța că toate acestea vor asigura o sporire a calității vieții pacientului oncologic.

## Concluzii

La pacienții cu metastaze în coloana vertebrală, metodele minim invazive combinate de vertebroplastie au fost mai eficiente în reducerea intensității durerii postoperatorii și al necesarului de analgezice până la 12 luni postintervențional decât radioterapia izolată. Analiza comparativă a metodelor combinate de tratament chirurgical studiate, au demonstrat un control eficient al sindromului algic la distanță de 12 luni, oferind posibilitatea continuării tratamentului de fond și ameliorând, astfel, calitatea vieții și speranța de viață a pacienților respectivi.

## Declarația de conflict de interes

Autorul declară lipsa conflictului de interes.

cal and mechanical factors that stimulate nerve endings of the periosteum. In the initial stages, algal receptors are stimulated by biogenic amines, osteoclast activating factors, and osteolysis-generating substances. With the development of the tumor process, the intraosseous pressure increases in the destructive focus, occur the osteolysis process and the compression of adjacent tissues, including nerve endings. The mechanical demand of pathologically modified, deformed and unstable bone also generates related algal impulses [6-9].

The treatment of patients with the spine metastases is an actual problem, with the limit of tangency of several clinical disciplines (oncology, orthopedics, neurosurgery and radiotherapy). This fact lead to major disputes over the applicability of each therapeutic method: the correction of the vertebral deformity and recovery of spinal coloumn functions, spinal decompression or tumor control by polychemotherapy and/or RxT, hormonotherapy, immunomodulatory treatment. The described phenomenon, may possibly persist due to the fact that over a long period of time a has been mentioned a conservative doctrine on the treatment of this category of patients [13].

In the 1960-1970 years, the elective method in the treatment of metastatic vertebral foci was RxT, both as monotherapy and in combination with surgical decompression procedures. The results of these treatment demonstrated satisfactory efficacy, the rate of complications after radiotherapy being similar to those after surgical treatment. This is explained by the fact that the basic method of surgical treatment was decompressive laminectomy, the results of which do not differ essentially from those of RxT [20,28].

Because, conservative methods in treatment of algic syndrome of the patient with spine metastasis, do not provide adequate pain control, it has been necessary to seek palliative surgical methods for controlling it. First of all, it is about alleviating the algic syndrome, stabilizing the pathological vertebral fracture and obtaining a long-term local tumor control using new, minimally invasive treatment methods, hoping that all this will ensure an increase in the quality of life of the oncological patient

## Conclusions

In patients with vertebral column metastases, the minimally invasive combined methods of vertebroplasty, were more effective in reducing the intensity of postoperative pain and the need for analgesics up to 12 months postintervenive, than isolated radiotherapy. The comparative analysis of the studied combined surgical treatment methods, demonstrated effective control of the algic syndrome at 12 months apart, offering the possibility of continuation of background treatment and thus improving the quality of life and life expectancy of the patients.

## Declaration of conflict of interests

The author declares no conflict of interest.



**Referințe / references**

1. Klimo P, Schmidt M. Surgical management of spinal metastases. *The Oncologist*, 2004, 9 (2): 188-196.
2. National Collaborating Centre For Cancer. Metastatic spinal cord compression: diagnosis and management of patients at risk of or with metastatic spinal cord compression. UK, 2008; 121 p.
3. Heary R., Bono C. Metastatic spinal tumors. *Neurosurg Focus*, 2001; 11 (6): e1.
4. Galbur O. Raport cu privire la evaluarea demografică a populației în republică (după vârstă, gender, mediu, tendințele pentru următorii 10 ani) și analiza morbidității în Republica Moldova, țările învecinate și Uniunea Europeană, tendințele și schimbările în ultimii 7 ani. 2010: 33 p.
5. Programul Național de control al cancerului pentru anii 2016-2025. *Monitorul Oficial al Republicii Moldova*, 2016; 441 (451): 15 p.
6. Mercadante S. Malignant bone pain: pathophysiology and treatment. *Pain*, 1997. 69 (1-2): 1-18.
7. Ripamonti C., Fulfarò F. Pathogenesis and pharmacological treatment of bone pain in skeletal metastases. *The Quarterly Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging*, 2001; 45 (1): 65.
8. Costa L., Major, Pierre P. Effect of bisphosphonates on pain and quality of life in patients with bone metastases. *Nature Clinical Practice Oncology*, 2009; 6 (3): 163-174.
9. Tseng Y., Yang S., Tu P. *et al.* Minimally invasive vertebroplasty in the treatment of pain induced by spinal metastatic tumor. *Minimally Invasive Neurosurgery*, 2008; 51 (5): 280-284.
10. Kassamali R., Ganeshan A., Hoey E. *et al.* Pain management in spinal metastases: the role of percutaneous vertebral augmentation. *Ann. Oncol.*, 2011; 22 (4): 782-6.
11. Fourney D., Nader R. *et al.* Percutaneous vertebroplasty and kyphoplasty for painful vertebral body fractures in cancer patients. *J. Neurosurg.*, 2003; 98 (1 Suppl): 21-30.
12. Groppa S., Belii A. Durerea – o problemă globală, multidisciplinară, actuală. *Akademios. Științe medicale*, 2011; 4 (23): 86-94.
13. Jacofsky D., Papagelopoulos P., Sim F. Advances and challenges in the surgical treatment of metastatic bone disease. *Clin. Orthop. Relat. Res.*, 2003 (415 Suppl): S14-8.
14. Prologo J., Buethel J., Mortell K. *et al.* Coblation for metastatic vertebral disease. *Diagn. Interv. Radiol.*, 2013; 19 (6): 508-15.
15. Wilson D., Owen S., Corkill R. Coblation vertebroplasty for complex vertebral insufficiency fractures. *Eur. Radiol.*, 2013; 23 (7): 1785-90.
16. Kastler B., Jacamon M., Aubry S. *et al.* Combined bipolar radiofrequency and cementoplasty of bone metastases. *J. Radiol.*, 2007; 88 (9 Pt 2): 1242-7.
17. Georgy B. Metastatic spinal lesions: state-of-the-art treatment options and future trends. *Am. J. Neuroradiol.*, 2008; 29: 1605-1611.
18. Gangi A., Guth S., Imbert J. *et al.* Percutaneous vertebroplasty: indications, technique, and results. *Radiographics*, 2003; 23: e10.
19. Qian Z., Sun Z., Yang H. *et al.* Kyphoplasty for the treatment of malignant vertebral compression fractures caused by metastases. *J. Clin. Neurosci.*, 2011; 18 (6): 763-7.
20. Falavigna A., Righesso NO., Ioppi A. *et al.* Metastatic tumor of thoracic and lumbar spine: prospective study comparing the surgery and radiotherapy vs. external immobilization with radiotherapy. *Arq. Neuropsiquiatr.*, 2007; 65 (3b): 889-95.
21. Halpin R., Bendok B., Liu J. Minimally invasive treatments for spinal metastases: vertebroplasty, kyphoplasty, and radiofrequency ablation. *J. Support Oncol.*, 2004; 2(4): 339-51.
22. Patel B., DeGroot H. Evaluation of the risk of pathologic fractures secondary to metastatic bone disease. *Orthopedics*, 2001; 24: 612-617.
23. Chi J., Gokaslan Z. Vertebroplasty and kyphoplasty for spinal metastases. *Curr. Opin. Support Palliat. Care*, 2008; 2: 9-13.
24. Jha R., Hirsch A., Yoo A. *et al.* Palliation of compression fractures in cancer patients by vertebral augmentation: a retrospective analysis. *J. Neurointerv. Surg.*, 2010; 2 (3): 221-8.
25. Boehling N., Grosshans D., Allen P. *et al.* Vertebral compression fracture risk after stereotactic body radiotherapy for spinal metastases. *J. Neurosurg. Spine*, 2012; 16: 379-386.
26. Saliou G., Kocheida M., Lehmann P. *et al.* Percutaneous vertebroplasty for pain management in malignant fractures of the spine with epidural involvement. *Radiology*, 2010; 254: 882-890.
27. Georgy B., Wong W. Plasma-mediated radiofrequency ablation assisted percutaneous cement injection for treating advanced malignant vertebral compression fracture. *Am. J. Neuroradiol.*, 2007; 28: 700-705.
28. Matsumura A., Hoshi M., Takami M. *et al.* Radiation therapy without surgery for spinal metastases: clinical outcome and prognostic factors analysis for pain control. *Global Spine Journal*, 2012; 2 (3): 137-142.

ARTICOL DE CERCETARE

## Rolul densitometriei prin tomografie computerizată în evaluarea rezultatelor tratamentului prin litotriție extracorporeală cu unde de șoc al calculilor renoureterali: studiu prospectiv, descriptiv

Andrei Bradu<sup>1†\*</sup>, Emil Ceban<sup>1†</sup>

<sup>1</sup>Catedra de urologie și nefrologie chirurgicală, Universitatea de Stat de Medicină și Farmacie „Nicolae Testemițanu”, Chișinău, Republica Moldova.

Data primirii manuscrisului: 26.04. 2017

Data acceptării spre publicare: 05.06. 2017

### Autor corespondent:

Andrei Bradu, doctorand

Catedra de urologie și nefrologie chirurgicală

Universitatea de Stat de Medicină și Farmacie „Nicolae Testemițanu”

bd. Ștefan cel Mare și Sfânt, 165, Chișinău, Republica Moldova, MD-2004

e-mail: andrei.bradu@usmf.md

### Ce nu este cunoscut, deocamdată, la subiectul abordat

Importanța densitometriei calculului renoureteral în evaluarea rezultatelor tratamentului prin litotriție extracorporeală cu unde de șoc, deocamdată, nu a fost studiată.

### Ipoteza de cercetare

Numărul necesar de ședințe de litotriție extracorporeală cu unde de șoc pentru tratamentul calculilor renoureterali ar fi dependent de densitatea lor, în unitați Hounsfield, apreciată la tomografia computerizată.

### Noutatea adusă literaturii științifice din domeniu

A fost demonstrat că densitatea în unitați Hounsfield este un determinant al numărului necesar de ședințe de litotriție extracorporeală cu unde de șoc.

### Rezumat

**Introducere.** De la introducerea metodei de litotriție extracorporeală cu unde de șoc, în anii 1980, această tehnologie a devenit una din principalele metode de tratament a litiazei renoureterale. Pentru evaluarea ratei de succes, aprecierea densității calculului prin tomografie computerizată se bucură de cea mai mare popularitate. Scopul acestei lucrări a fost de a evalua eficacitatea aprecierii densității calculului în evalu-

RESEARCH ARTICLE

## The role of computed tomography densitometry in assessing the outcomes of extracorporeal shock wave lithotripsy of reno-ureteral calculi: prospective, descriptive study

Andrei Bradu<sup>1†\*</sup>, Emil Ceban<sup>1†</sup>

<sup>1</sup>Chair of urology and surgical nephrology, Nicolae Testemițanu State University of Medicine and Pharmacy, Chisinau, Republic of Moldova.

Manuscript received on: 26.04.2017

Accepted for publication on: 05.06.2017

### Corresponding author:

Andrei Bradu, PhD fellow

Chair of urology and surgical nephrology

Nicolae Testemițanu State University of Medicine and Pharmacy

165, Ștefan cel Mare și Sfânt ave., Chisinau, Republic of Moldova, MD-2004

e-mail: andrei.bradu@usmf.md

### What is not known yet, about the topic

The research of the importance of calculus densitometry in the evaluation of treatment outcomes by extracorporeal shock wave lithotripsy is not yet studied.

### Research hypothesis

The required number of extracorporeal shock wave lithotripsy sessions for the treatment of reno-ureteral calculi would depend on the density in Hounsfield units at computed tomography.

### Article's added novelty on this scientific topic

It has been demonstrated that the density in Hounsfield units is a determinant of the required number of extracorporeal shock wave lithotripsy sessions.

### Abstract

**Introduction.** Since the introduction of the extracorporeal shock wave lithotripsy in the 1980s, this method has become one of the main methods of treatment of reno-ureteral lithiasis. To evaluate the success rate, the computed tomography, used to assess the calculus density, is among the most popular procedures. The purpose of this study is to evaluate the efficacy of calculus density in assessing treatment outcomes of

area rezultatelor tratamentului prin litotriție extracorporală (ESWL) cu unde de șoc al calculilor renoureterali.

**Material și metode.** În studiu au fost incluși 60 de pacienți cu litiază renoureterală cu diametru de 0,5-2,0 cm, diagnosticată prin tomografie computerizată cu estimarea densității calculului, care au fost tratați prin litotriție extracorporală. În timpul procedurii de litotriție extracorporală, au fost aplicate 4000 de impulsuri pe ședință, cu un maxim de energie de 3,0 kV. Numărul de ședințe a variat de la una până la trei. Ulterior, pacienții au fost invitați la vizite de control, în dinamică, timp de 1 lună.

**Rezultate.** Din numărul total de pacienți, incluși în studiu, 39/60 (65%) au fost cu rată de „stone free” după prima ședință de tratament. S-a observat o relație liniară față de rata mare de „stone free” și densitatea calculului. Toți acești pacienți au avut densitatea calculului  $\leq 600$  unități Hounsfield (UH). La 11/60 (18%) pacienți s-au aplicat două ședințe de ESWL; aceștia au avut densitatea calculului cuprinsă între 600-1000 UH. La restul pacienților, 10/60 (17%), au fost aplicate trei ședințe de ESWL; aceștia au avut densitatea calculului cuprinsă între 1000-1200 UH. Rata de „stone free”, după trei ședințe de ESWL, a fost de 92%. Toți pacienții, care au avut reușită în tratament, au prezentat calculi cu densitate de până la 1000 UH. La 6 pacienți procedura de tratament a eșuat; toți au prezentat calculi cu dimensiunea de maxim 17 mm și cu densitatea de 1000-1200 UH, aceștia fiind referiți către alte metode de tratament.

**Concluzii.** Aprecierea densității calculului până la litotriție permite o estimare mai exactă a numărului de ședințe necesare pentru atingerea ratei maxime de succes. De asemenea, cunoașterea exactă a densității calculului poate ajuta la alegerea metodei optime de tratament din prima intenție.

**Cuvinte cheie:** litiază renoureterală, densitometrie, EWSL.

## Introducere

Urolitiază, ca patologie, se plasează pe primul loc în structura maladiilor urologice, având o frecvență cuprinsă între 1-5% din populația generală. Litotriția extracorporală a fost introdusă în practica medicală în anul 1980 de Chaussy C. *et al.* [1], și reprezintă o metodă modernă, minim invazivă, care este utilizată pe larg în tratamentul litiază renoureterale de până la 2 cm [2]. Principiul metodei constă în dezintegrarea calculilor, care se produce cu unde de șoc, emise înafara organismului și care, apoi, penetrează tesuturile, fără ca acestea să fie lezate. Actualmente, aproximativ 80-90% din calculii renoureterali, au indicație de rezolvare prin ESWL, 8-10% – prin tehnici endourologice (nefrolitotomie percutanată, ureteroscopie antero- și retrogradă) și doar 1-2% – pe cale chirurgicală clasică [3]. Rezultatele tratamentului prin ESWL depind de mai mulți factori, cum ar fi: diametrul calculului, localizarea și compoziția lui, fragilitatea, tipul generatorului litotriptorului, prezența obstrucției sau infecției [3]. După introducerea de către Dretler S. [4] a conceptului de fragilitate și compoziție a calculului, acestea au devenit valori factoriale, extrem de importante în evaluarea ratei de eficacitate, care determină rezultatele tratamentului prin ESWL [4].

reno-ureteral calculi by extracorporeal shock wave lithotripsy (ESWL).

**Material and methods.** In this study, 60 patients with reno-ureteral lithiasis of 0.5-2.0 cm were diagnosed by means of computed tomography, the calculi density being performed. The patients were treated by extracorporeal lithotripsy. During the extracorporeal lithotripsy, 4000 pulses per session were applied with a maximum energy of 3.0 kV. The number of sessions ranged from one to three sessions. Subsequently, the patients were monitored and followed up for 1 month.

**Results.** Of the total number of patients enrolled in the research study 39/60 (65%) were “stone free” after the first treatment session. We observed a linear proportion between the high “stone free” rate and the calculus density, all of these patients had the calculus density  $\leq 600$  Hounsfield units (HU). In 11/60 (18%) patients, two ESWL sessions were applied and they had the calculus density of 600-1000 HU. In 10/60 (17%) patients, three sessions of ESWL were applied, and they had the calculus density between 1000 and 1200 HU. The rate of “stone free” after three ESWL sessions was 92%. All patients who had the therapy success rate, had the calculus density of up to 1000 HU. In 6 patients, the treatment procedure failed, all of them had calculi with the maximum size of 17 mm and the density of 1000-1200 HU, they being referred to other methods of treatment.

**Conclusions.** The use of calculus densitometry before lithotripsy offers the possibility to estimate more accurately the number of required sessions in order to obtain a maximal success rate. Also, exact information about the calculus density may help finding the most optimal treatment method from the beginning.

**Key words:** reno-ureteral lithiasis, densitometry, EWSL.

## Introduction

Urolithiasis as a disease is ranked first in the structure of urological diseases, with a frequency of 1-5% of the general population. Extracorporeal lithotripsy was introduced into medical practice in 1980 by Chaussy C. *et al.* [1], and is a minimally invasive modern method that is extensively used in the treatment of reno-ureteral lithiasis of up to 2 cm [2]. The principle of the method consists in the disintegration of the stones produced by shock waves outside the body, penetrating the tissues without affecting them. At present, approximately 80-90% of reno-ureteral calculi have indications for ESWL resolution, 8-10% by endourologic techniques (percutaneous nephrolithotomy, antero- and retrograde ureteroscopy) and only 1-2% by classical surgical procedure [3]. The results of ESWL treatment depend on several factors such as: calculus diameter, calculus location, its composition, fragility, type of lithotripter generator, and the presence of obstruction or infection [3]. After introduction by Dretler S. [4] of the concept of calculus fragility and composition, these have become factorial values, extremely important in assessing the efficacy rate that influences the outcome of ESWL treat-

Evaluarea compoziției și fragilității calculului se poate face prin aplicarea diferitor tehnici din cadrul examenului CT, care este extrem de util pentru stabilirea diagnosticului de litiază renoureterală, mai ales, în cazul calculilor radiotransparenți. Măsurarea densității calculului în UH a fost folosită, la început, cu scop de a-i diferenția de tumori, cheaguri de sânge [4]. Datorită sensibilității și specificității diagnostice extrem de înalte a CT în cazul litiazei renoureterale, comparativ cu radiografia renovezicală simplă sau urografia intravenoasă, actualmente, aceasta devine și o metodă de elecție în stabilirea tacticii de tratament a litiazei renoureterale. Unul dintre cei mai importanți parametri, în acest sens, este densitatea calculului în UH [3]. Cunoașterea densității calculului până a începe tratamentul ESWL este foarte importantă, deoarece faptul permite estimarea probabilității ratei de „stone free”, cu reducerea numărului de complicații și a costurilor de tratament, cu evitarea, de multe ori, a unor încercări inutile [5].

### Material și metode

Studiul clinic a fost efectuat în Clinica de urologie, dializă și transplant renal a USMF „Nicolae Testemițanu”. Proiectul de cercetare a fost aprobat de Comitetul de Etică a Cercetării al USMF „Nicolae Testemițanu” (proces verbal nr. 49/40 din data de 10.05.2016). Toți pacienții înrolați au semnat un acord informat.

Criteriile de includere în studiu au fost:

- persoană adultă ( $\geq 18$  ani);
- semnarea acordului informat de înrolare în studiu;
- stabilirea diagnosticului prin CT, cu aprecierea densității calculului.

Criterii de excludere:

- contraindicații pentru efectuarea procedurii de litotritie extracorporală;
- afecțiuni renală sau hepatică;
- prezența infecției urinare;
- diabet zaharat necontrolat medicamentos;
- refuzul pacientului de a participa în studiu.

În studiu au fost incluși 60 de pacienți care s-au prezentat pentru tratament cu litiază renoureterală, diagnosticată prin tomografie computerizată, cu estimarea densității calculului. Parametrii principali care au fost studiați (densitatea calculului, rata de „stone free”, numărul de ședințe de litotritie extracorporală), au fost numerizați într-o bază de date pe platforma Excel.

Cercetarea s-a axat, preponderent, pe evaluarea densității calculilor la pacienții care au fost tratați prin ESWL, cu urmărirea ratei de „stone free”, în funcție de dimensiunea și densitatea calculului.

Protocolul CT (spiralată) a inclus secțiuni continue prin calcul, de 3 mm, utilizând un soft setat la fereastra de 300-400 UH, respectiv, la 120 kV și 240 mA. Tomograful utilizat: *Somatom Plus, Siemens Medical Solutions, Germania*. Dimensiunea longitudinală a calculului a fost calculată, utilizând grosimea de colimatare, intervalul de reconstrucție și numărul de imagini, în care calculul a putut fi vizualizat. Diametrul maxim și densitatea medie a calculului au fost calculate computerizat.

[4]. To assess calculus fragility and composition, various techniques were used by means of CT. This is extremely useful to establish the diagnosis of reno-ureteral lithiasis especially for radiotransparent calculi. At the beginning, calculus density measuring in HU has been used to differentiate calculi from tumour and blood clots [4]. Due to the extremely high precision of CT in the diagnosis of reno-ureteral lithiasis compared to other diagnostic methods such as kidney and bladder X-ray or intravenous urography, CT is currently required to be used as a method of choice in diagnosing of reno-ureteral lithiasis and choosing the treatment tactics. One of the most important parameters is the calculus density measured in UH [3]. It is vital to know the calculus density prior to ESWL treatment, to increase the “stone free” rate, reduce the number of complications and costs, and to avoid unnecessary procedures [5].

### Material and methods

The clinical study was performed in the Clinic of urology, dialysis and renal transplantation of *Nicolae Testemitanu* State University of Medicine and Pharmacy (SUMPh). The research project and protocol were approved by the Ethics Committee of *Nicolae Testemitanu* SUMPh (verbal process no. 49/40, May 10, 2016). All subjects who participated in the clinical trial signed the informed consent.

The inclusion criteria in the study were:

- adults ( $\geq 18$  years);
- signed informed consent for participation in the study;
- CT scan with the calculus density assessment.

Exclusion criteria:

- contraindications for extracorporeal lithotripsy;
- kidney or liver disease;
- presence of urinary infection;
- diabetes mellitus uncontrolled by medication;
- patient's refusal to participate in the study.

There were 60 patients enrolled in the study, for the treatment of reno-ureteral lithiasis diagnosed with computed tomography and mandatory calculus density assessment. The main parameters studied (calculus density, “stone free” rate, number of extracorporeal lithotripsy sessions) were structured with the mandatory inclusion in an Excel database.

The research mainly focused on the assessment of the calculi density in patients treated by ESWL with the “stone free” rate tracking, depending on the size and density of the calculus.

The CT protocol included 3 mm continuous sections through the calculus, using a software set at the level of 300 and 400 HU, and at 120 kV and 240 mA, respectively, on a spiral CT (*Somatom Plus, Siemens Medical Solutions, Germany*). The longitudinal dimension of the calculus was calculated using the collimation thickness, the reconstruction interval and the number of images in which the calculus could be viewed. The maximum diameter and average density of the calculus were calculated using the computerized method.

Toți pacienții au beneficiat de tratament prin ESWL, aplicând litotriptorul de generația II (*Modulith SLK, Storz Medical, Germania*). Fragmentarea calculului în timpul ESWL a fost monitorizată prin ghidaj fluoroscopic sau ecografic. Voltajul maxim aplicat în timpul ședinței de ESWL asupra calculilor a fost de 3,0 kV. În timpul fiecărei sesiuni de ESWL, au fost aplicate 4000 de impulsuri. În cazul ședințelor repetate, intervalul dintre ele a fost de 3-5 zile. După fiecare ședință de ESWL, se efectua o radiografie digitală simplă de control. Fragmentele de calcul de dimensiuni  $\leq 5$  mm au fost definite drept reziduale, clinic ne semnificative, iar pacienților li s-a administrat tratament conservativ pentru expulzia lor.

Datele sunt prezentate sub formă de valori absolute și relative, sau sub formă de medie și deviere-standard. Statistică descriptivă.

## Rezultate

Caracterizarea generală a lotului de studiu, precum și rezultatele principale sunt prezentate în Tabelul 1.

**Tabelul 1.** Datele demografice și principalele rezultate ale studiului ( $n=60$ )

Indicatorii	$n$ (%)
<i>Vârsta, ani (m<math>\pm</math>DS)</i>	47,5 $\pm$ 12,0
▪ 18-30 ani	17/60 (28%)
▪ 31-60 ani	30/60 (50%)
▪ 60 ani	13/60 (22%)
Bărbați	37/60 (62%)
<i>Poziționare</i>	
▪ pe dreapta	24/60 (40%)
▪ pe stânga	21/60 (35%)
▪ bilateral	15/60 (25%)
<i>Localizare</i>	
▪ rinichi	27/60 (45%)
▪ ureter superior	17/60 (28%)
▪ ureter mediu	7/60 (12%)
▪ ureter inferior	9/60 (15%)
<i>Număr de calculi</i>	
▪ singular	45 (75%)
▪ $\geq 2$	15 (25%)

La întreg lotul, rata de „stone free” după prima ședință de ESWL a fost de 39/60 (65%). S-a observat o relație liniară dintre rata de „stone free” și densitatea calculului (Figura 1). Toți acești pacienți „stone free”, după prima ședință, au avut densitatea calculului  $\leq 600$  UH. La 11/60 (18%) din pacienți, s-au aplicat două ședințe de ESWL; aceștia au avut o densitate a calculului cuprinsă între 600-1000 UH. Și la 10/60 (17%) din pacienți, au fost aplicate trei ședințe de ESWL, aceștia au avut o densitate a calculului cuprinsă între 1000-1200 UH. Cumulativ, după trei ședințe ESWL, rata „stone free” a fost de 92%. Toți pacienții cu reușită de tratament, au avut calculi cu densitate de până la 1000 UH. La 6 pacienți procedura ESWL a eșuat, ei prezentând o densitate a calculului de 1000-1200 UH. Pacienții respectivi au urmat, ulterior, alte metode de tratament.

All patients were subjected to ESWL treatment, applying the second-generation lithotripter (*Modulith SLK, Storz Medical, Germany*). The fragmentation of the calculus during the ESWL treatment was monitored by fluoroscopy or ultrasound guidance. The maximum voltage during the ESWL session was 3.0 kV. During each ESWL session, 4000 pulses were applied with an interval of 3-5 days between sessions. The follow-up procedure assessment was monitored by performing a digital radiography, this being done after each ESWL session. The calculus fragments  $\leq 5$  mm were defined as clinically insignificant residual fragments, and patients were given conservative treatment for their expulsion.

Data is presented in absolute and relative values, or in mean values and standard deviation. Descriptive statistics.

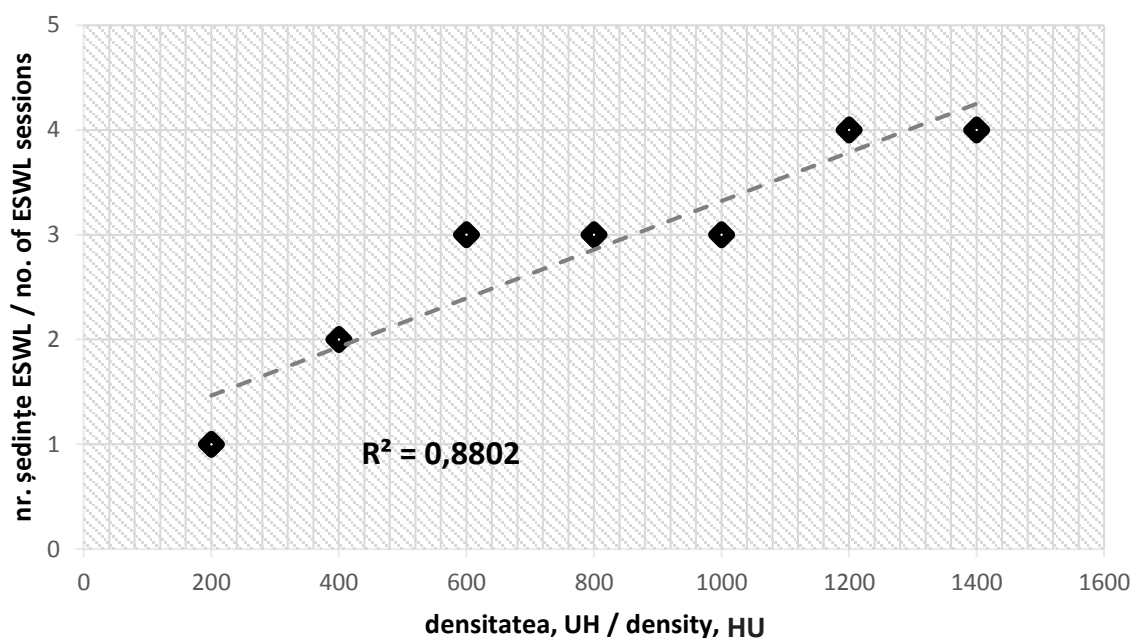
## Results

General characteristics of the study group, as well as main obtained results are presented in the Table 1.

**Table 1.** Demographic data and main results of the study ( $n=60$ )

Indicators	$n$ (%)
<i>Age, years (m<math>\pm</math>SD)</i>	47.5 $\pm$ 12.0
▪ 18-30 years	17/60 (28%)
▪ 31-60 years	30/60 (50%)
▪ 60 years	13/60 (22%)
Males	37/60 (62%)
<i>Position</i>	
▪ right	24/60 (40%)
▪ left	21/60 (35%)
▪ bilateral	15/60 (25%)
<i>Localisation</i>	
▪ kidney	27/60 (45%)
▪ superior ureter	17/60 (28%)
▪ medium ureter	7/60 (12%)
▪ inferior ureter	9/60 (15%)
<i>Number of calculi</i>	
▪ singular	45 (75%)
▪ $\geq 2$	15 (25%)

Of the total number of patients included in the research study, a „stone free” rate is found in 39/60 (65%) cases, after the first treatment session. We observed a linear proportion between the high free „stone free” rate and the calculus density (Figure 1). These patients had the calculus density  $\leq 600$  Hounsfield Units (HU). In 11/60 (18%) patients two ESWL sessions were applied with the calculus density of 600-1000 HU. In 10/60 (17%) patients three ESWL sessions were applied with the density of 1000-1200 HU. Of the total number of patients, the „stone free” rate after three ESWL sessions was 92%. All patients who achieved the therapy success rate had the calculus density of up to 1000 HU. In 6 patients, with the calculus density of 1000-1200 HU, the treatment procedure failed, they being referred to other methods of treatment.



**Fig. 1** Relația dintre densitatea calculului și numărul de ședințe ESWL, necesare pentru obținerea „stone free”.

**Fig. 1** The relationship between stone density and the number of ESWL sessions required to get „stone free” state.

## Discuții

Rezultatul și succesul unei proceduri de ESWL este măsurat în termeni de fragmentare a calculului, de rată de „stone free” și de grad de eliminare a fragmentelor de calcul. Fragmentarea unui calcul depinde, în mare măsură, de capacitatea de a-i prezice compoziția, mărimea și densitatea [5]. Efectuarea densitometriei calculului prin CT este o metodă neinvazivă și oferă o informație mult mai amplă față de radiografia convențională. Segal A. și colab. [6] (1978), au măsurat densitatea calculilor urinari și au raportat valori de 50-120 „unități CT”, aproximativ echivalente cu 100-240 UH. Într-un studiu, realizat de Federle M. și colab. [7] (1981), calculul a fost identificat ca un obiect de densitate mare (370-586 UH). Calculii de oxalat de calciu și cistină au avut valori de atenuare mai mari decât cei din acid uric sau xantină.

Mostafavi M. și colab. [8] (1998), au sugerat că structura chimică a calculilor urinari ar putea fi determinată din valorile absolute CT, măsurate la 120 kV, și valorile CT cu dublă tensiune, măsurate la 80 și 120 kV (UH la 80 kV minus UH la 120 kV). Valoarea absolută CT la 120 kV ar putea identifica compoziția chimică a calculilor acidului uric, struvitelui și oxalatului de calciu, iar utilizarea valorii CT cu dublă tensiune a fost capabilă să diferențieze oxalatul de calciu de brushită și struvit din cistină. Mai târziu, într-un studiu *in vitro*, Saw K. [9] (2000), a raportat că numărul de unde de șoc, necesare pentru fragmentarea calculului, este corelat cu dimensiunea (volum, greutate, diametru) lui.

Într-un studiu, Nakada S. [10] (2000), a comparat atenuarea și raportul de dimensiune/atenuare, cu rezultatele analizei chimice ale calculului și a descoperit o diferență semnificativă între calculii de acid uric (344±152 UH) și calculii de oxalat de

## Discussion

The ESWL outcome and success are measured in terms of the calculus fragmentation with the “stone free” rate and the degree of elimination of the calculus fragments. The fragmentation of the calculus largely depends on the ability to predict its composition, size, and density [5]. Calculus densitometry performed by CT is a non-invasive method and provides much wider information than conventional radiography. Segal A. *et al.* [6] measured the urinary calculi density and reported values of 50-120 “CT units”, approximately equivalent to 100-240 HU. In a study carried out by Federle M. *et al.* [7] (1981), the calculus was identified as a high-density object (370-586 HU), and calculi of calcium oxalate and cystine had mitigation values higher than uric acid or xanthine calculi.

Mostafavi M. *et al.* [8] (1998), suggested that the chemical composition of urinary calculi could be determined from the absolute CT values measured at 120 kV and the double voltage CT values measured at 80 and 120 kV (HU at 80 kV minus HU at 120 kV). The absolute CT value at 120 kV could identify the chemical composition of calculi of uric acid, struvite and calcium oxalate, while the use of double-voltage CT value was able to differentiate calcium oxalate from brushite and struvite from cystine. Later, in an *in vitro* study, Saw K. [9] (2000) reported that the number of shock waves required for the calculus fragmentation is correlated with the size (volume, weight, diameter).

In a study, Nakada S. [10] (2000) compared the attenuation and size/attenuation ratio with the results of the chemical analysis of the calculus and found a significant difference between uric acid calculi (344±152 HU) and calcium oxalate calculi (652±490 HU). Using the attenuation/size ratio of >80,

calciu ( $652 \pm 490$  UH). Folosind un prag al raportului atenuare/dimensiune de  $>80$ , valoarea predictivă negativă a fost de 99% precum că un calcul ar fi predominant din oxalat de calciu.

Până în prezent, puține studii clinice au comparat densitatea *in vivo* a calculilor cu rezultatul ESWL. Într-un studiu, efectuat pe 30 de pacienți, Joseph P. [11] (2002) a constatat că pacienții cu calculi de 950 UH și care au suportat 7500 de unde de șoc fără fragmentare, ar trebui să urmeze alte proceduri chirurgicale [11]. Mai recent, Pareek G. (2003), a corelat densitatea cu rata de „stone-free”, într-un studiu efectuat pe 50 de pacienți, concluzionând că 36% dintre pacienții cu fragmente reziduale au avut o densitate medie de  $\geq 900$  UH, în comparație cu media de 500 UH, care au avut-o ceilalți 74% dintre pacienții „stone-free” [12]. Cu toate acestea, ei nu au corelat densitatea calculului cu fragmentarea. Alți autori au observat că 80% dintre pacienții cu calculi cu densitate  $\leq 750$  UH au avut nevoie de trei sau mai puține ședințe de ESWL și 88% dintre ei au fost „stone-free” [13]. În schimb, dintre pacienții cu calculi de  $>750$  UH, 72% au necesitat trei sau mai multe ședințe. Cel mai bun rezultat a fost la pacienții care au avut calculi  $\leq 1,1$  cm și o densitate de  $>750$  UH; 35% dintre ei au avut nevoie de trei sau mai puține ședințe și rata „stone-free” a fost de 90%. La pacienții cu un calcul de  $>750$  UH și diametrul  $>1,1$  cm, 23 (77%) dintre ei au avut nevoie de trei sau mai multe ședințe, iar rata „stone-free” a fost de doar 60% [13].

Pacienții cu o densitate medie a calculilor  $>1000$  UH au avut de 10,5 ori mai multe șanse de a necesita trei sau mai multe ședințe, decât pacienții cu densități medii ale calculilor  $\leq 600$  UH [14]. Prin urmare, pentru calculii de  $\leq 1000$  UH, indiferent de dimensiune ( $<2$  cm), ESWL ar trebui să fie tratamentul preferat. În cele din urmă, studiu dat deschide, de asemenea, posibilitatea unui rezultat mai bun al ESWL pentru calculii de  $>2,0$  cm și  $\leq 1000$  UH [15].

## Concluzii

Densitometria CT este o metodă neinvazivă și utilizarea ei înainte de procedura de ESWL poate ajuta la determinarea densității medii a calculului, care-i poate prezice fragilitatea, prin urmare, rezultatul tratamentului. Acest fapt ar putea ajuta la planificarea tratamentelor alternative la pacienții cu un rezultat probabil nesatisfăcător și la creșterea eficienței ESWL, reducând, astfel, costul tratamentului și evitând procedurile inutile.

## Declarația conflictului de interese

Nimic de declarat.

## Contribuția autorilor

AB a elaborat protocolul de cercetare, colectarea datelor, prelucrarea statistică, scrierea manuscrisului. EC a conceput studiul, a participat la design-ul studiului, la colectarea datelor și a contribuit la redactarea manuscrisului. Materialul a fost citit și aprobat de către ambii autori.

the negative predictive value was 99% that a calculus would predominantly be from calcium oxalate.

So far, few clinical trials have compared the *in vivo* density of the calculi with the ESWL result. In a study performed on 30 patients, Joseph P. [11] (2002) found that in patients with 950 HU calculi, 7500 shock waves did not cause fragmentation, therefore other surgical procedures should be considered [11]. More recently, Pareek G. (2003) correlated the density with the “stone-free” rate in a study of 50 patients, concluding that 36% of patients with residual fragments had an average density  $\geq 900$  HU, compared to the mean of 500 HU in 74% of the “stone-free” patients [12]. However, they did not correlate the calculus density with fragmentation. Other authors noted that 80% of patients with calculi with the density  $\leq 750$  HU needed three or fewer ESWL sessions, and 88% were “stone-free” [13]. In contrast, of patients with  $>750$  HU calculi, 72% required three or more sessions. The best result was in patients with calculi  $\leq 1.1$  cm and density  $>750$  HU; 35% needed three or fewer sessions, and the “stone-free” rate was 90%. In patients with the calculus  $>750$  HU and diameter  $>1.1$  cm, 23 (77%) needed three or more sessions, and the “stone-free” rate was only 60% [13].

Patients with a mean calculi density  $>1000$  HU had 10.5 times more chances to be subjected to three or more sessions than patients with the mean calculi density  $\leq 600$  HU [14]. Therefore, we recommend that for calculi  $\leq 1000$  HU, regardless of size ( $<2$  cm), ESWL should be the treatment of choice. Finally, this study also opens the possibility of a better ESWL result for calculi  $>2.0$  cm and  $\leq 1000$  HU [15].

## Conclusions

The CT densitometry is a noninvasive method and its use prior to ESWL can help determine the average calculus density, which can predict the fragility, hence the treatment outcome. This could help plan alternative treatments for patients with a potentially unsatisfactory outcome and increase ESWL efficacy, thereby reducing treatment costs and avoid unnecessary procedures.

## Declaration of conflict of interests

Nothing to declare.

## Contribution of authors

AB has developed the research protocol, data collection, statistical processing and manuscript writing. EC designed the study, collected data and contributed to the manuscript writing. The material has been read and approved by both authors.

**Referințe / references**

1. Chaussy C., Brendel W., Schniedt E. Extracorporeally induced destruction of kidney stones by shock waves. *Lancet*, 1980; 2: 1265-8
2. Dretler S. Stone fragility – a new therapeutic distinction. *J. Urol*, 1988; 139: 124.
3. Oșan V., Simion C. Litotriția extracorporală în tratamentul litiazei renoureterale. Tg. Mureș, 2005, 157 p.
4. Dretler S., Spencer B. CT and stone fragility. *J. Endourol.*, 2001; 15: 31-6.
5. Mostafavi M., Ernst R., Saltzman B. Accurate determination of chemical composition of urinary calculi by spiral computerized tomography. *J. Urol.*, 1998; 159: 673-5.
6. Segal A., Spataro R., Linke C., Frank I., Rabinowitz R. Diagnosis of nonopaque calculi by computed tomography. *Radiology*, 1978; 129: 447-50.
7. Federle M., McAninch J., Kaiser J., Goodman P., Roberts J., Mall J. Computed tomography of urinary calculi. *Am. J. Roentgenol.*, 1981; 136: 255-8.
8. Mostafavi M., Ernst R., Saltzman B. Accurate determination of chemical composition of urinary calculi by spiral computerized tomography. *J. Urol.*, 1998; 159: 673-5.
9. Saw K., McAteer J., Fineberg N. *et al.* Calcium stone fragility is predicted by helical CT attenuation values. *J. Endourol.*, 2000; 14: 471-4.
10. Nakada S., Hoff D., Attai S., Heisey D., Blankenbaker D., Pozniak M. Determination of stone composition by noncontrast spiral computed tomography in the clinical setting. *Urology*, 2000; 55: 816-9.
11. Joseph P., Mandal A., Singh S., Mandal P., Sankhwar S., Sharma S. Computerized tomography attenuation value of renal calculus: can it predict successful fragmentation of the calculus by extracorporeal shock wave lithotripsy? A preliminary study. *J. Urol.*, 2002; 167: 1968-71.
12. Pareek G., Armenakas N., Fracchia J. Hounsfield units on computerized tomography predict stone-free rates after extracorporeal shock wave lithotripsy. *J. Urol.*, 2003; 169: 1679-81.
13. Manu R. Litotriția extracorporală cu unde de șoc (ESWL). *Tratat de urologie* (Editor: Sinescu I., Gluck G.). Editura Medicală, 2008; vol. 2: 1091.
14. Parienty R., Ducellier R., Pradel J., Lubrano J., Coquille F., Richard F. Diagnostic value of CT numbers in pelvocalyceal filling defects. *Radiology*, 1982; 145: 743-7.
15. Bon D., Dore B., Irani J., Marroncle M., Aubert J. Radiographic prognostic criteria for extracorporeal shock-wave lithotripsy. *Urology*, 1996; 48: 556-61.



## ARTICOL DE CERCETARE

## Influența unor compuși bioactivi autohtoni asupra indicilor metabolismului glucidic în țesutul osos în osteopatiile experimentale

Veronica Sardari<sup>1\*</sup>, Olga Mihalciuc<sup>1†</sup>, Inna Șveț<sup>1†</sup>,  
Lilia Andronache<sup>1†</sup>, Olga Tagadiuc<sup>2†</sup>, Valentin Gudumac<sup>1†</sup>

<sup>1</sup>Laboratorul de biochimie, Universitatea de Stat de Medicină și Farmacie „Nicolae Testemițanu”, Chișinău, Republica Moldova;

<sup>2</sup>Catedra de biochimie și biochimie clinică, Universitatea de Stat de Medicină și Farmacie „Nicolae Testemițanu”, Chișinău, Republica Moldova.

Data primirii manuscrisului: 06.04.2017  
Data acceptării spre publicare: 04.06.2017

### Autor corespondent

Veronica Sardari, dr. șt. med., cercet. șt. super.

Laboratorul de biochimie

Universitatea de Stat de Medicină și Farmacie „Nicolae Testemițanu”

bd. Ștefan cel Mare și Sfânt, 165, Chișinău, Republica Moldova, MD-2004

e-mail: veronica.sardari@usmf.md

### Ce nu este cunoscut, deocamdată, la subiectul abordat

Lipsește datele ce relevă modificările enzimelor glicolitice, ale ciclului pentozo-fosfat și ciclului Krebs, precum și efectele unor compuși biologici activi (CBA) autohtoni asupra metabolismului glucidic în țesutul osos, în osteopatiile induse prin administrarea diferitor compuși toxici – CCl<sub>4</sub> și etilenglicol.

### Ipoteza de cercetare

Compușii biologici activi autohtoni ar putea exercita o influență semnificativă asupra metabolismului glucidic în țesutul osos în osteopatii, fapt ce ar permite elaborarea unor noi strategii de tratament și prevenție a patologiilor respective.

### Noutatea adusă literaturii științifice din domeniu

Au fost evidențiate mecanismele biochimice ale acțiunii unor CBA autohtoni asupra metabolismului glucidic în țesutul osos în osteopatiile experimentale, fapt ce argumentează utilitatea folosirii lor în prevenția și tratamentul acestor patologii.

### Rezumat

**Introducere.** Actualmente, un interes sporit a trezit utilizarea diferitor compuși bioactivi (CBA) autohtoni, care ar putea exercita o influență semnificativă asupra proceselor metabolice. Dereglările metabolismului glucidic joacă un rol

## RESEARCH ARTICLE

## Influence of some local bioactive compounds on indices of carbohydrate metabolism in bone tissue in experimental osteopathies

Veronica Sardari<sup>1\*</sup>, Olga Mihalciuc<sup>1†</sup>, Inna Svet<sup>1†</sup>,  
Lilia Andronache<sup>1†</sup>, Olga Tagadiuc<sup>2†</sup>, Valentin Gudumac<sup>1†</sup>

<sup>1</sup>Laboratory of biochemistry, Nicolae Testemitanu State University of Medicine and Pharmacy, Chisinau, Republic of Moldova;

<sup>2</sup>Chair of biochemistry and clinical biochemistry, Nicolae Testemitanu State University of Medicine and Pharmacy, Chisinau, Republic of Moldova.

Manuscript received on: 06.04.2017  
Accepted for publication on: 04.06.2017

### Corresponding author:

Veronica Sardari, PhD, superior scientific researcher

Laboratory of biochemistry

Nicolae Testemitanu State University of Medicine and Pharmacy

165, Stefan cel Mare si Sfant ave., Chisinau, Republic of Moldova, MD-2004

e-mail: veronica.sardari@usmf.md

### What is not known yet, about the topic

There are lacking data regarding the changes of glycolytic, pentose-phosphate cycle and the Krebs cycle enzymes in bone disorders and the effects of local bioactive compounds (BAC) on bone carbohydrate metabolism in osteopathies induced by some toxic compounds – CCl<sub>4</sub> and ethylene glycol.

### Research hypothesis

Local active biological compounds could exert a significant influence on bone carbohydrate metabolism in osteopathies, which would enable the development of new treatment and prevention strategies of the bone pathologies.

### Article's added novelty on this scientific topic:

The biochemical mechanisms of action of some local biological active compounds on bone carbohydrate metabolism in experimental osteopathies have been highlighted in this article, which argues their usefulness in the prevention and treatment of these pathologies.

### Abstract

**Introduction.** Nowadays increased interest aroused towards local bioactive compounds (BAC), which could exert significant influence on metabolic processes. Disorders of carbohydrate metabolism play an important role in the patho-

important în patogenia multor afecțiuni, inclusiv, în maladiile sistemului osos. Scopul studiului a fost cercetarea influenței unor compuși bioactivi autohtoni asupra metabolismului glucidic în țesutul osos, în osteopatiile experimentale (OP), argumentarea utilității folosirii lor în prevenția și tratamentul patologiei osoase.

**Material și metode.** *Osteopatia toxică* a fost indusă prin intoxicarea cu tetraclorură de carbon ( $\text{CCl}_4$ ) și etilenglicol (EG) în două serii de experiențe. Evaluarea *indicilor metabolismului glucidic* a inclus determinarea activității enzimelor glicolitice – hexokinazei (HK), lactat dehidrogenazelor lactat- și piruvat-dependente (LDH-L, LDH-P), ciclului pentozo-fosfaților (glucozo-6-fosfat dehidrogenazei – G-6-PDH) și ciclului Krebs (malat dehidrogenazei catabolice NAD-dependente – MDH-NADd). În studiu au fost cercetați CBA autohtoni – CMD-4, CMD-8, CMJ-23, CMJ-26, CMJ-33 și remedii, obținute din *Spirulina platensis* – BioR și BioR-Ge. Rezultatele obținute au fost evaluate statistic conform criteriului t-Student, precum și cel nonparametric „U” Mann-Witney, cu ajutorul programului *StatsDirect Statistical Software* (StatsDirect Ltd, Marea Britanie).

**Rezultate.** În OP indusă prin intoxicarea cu  $\text{CCl}_4$  și EG, s-au constatat modificări pronunțate ale funcționalității enzimelor metabolismului glucidic studiate. În OP  $\text{CCl}_4$ -indusă, activitatea tuturor enzimelor cercetate s-a redus în țesutul osos și s-a majorat funcționalitatea HK. Medicația cu CBA a OP induse cu  $\text{CCl}_4$ , a determinat redresarea activității HK și, de asemenea, restabilirea sau inducerea funcționalității LDH, G-6-PDH și MDH-NADd în țesutul osos. În OP EG-indusă, s-a constatat o amplificare esențială a HK și G-6-PDH. BioR a manifestat o acțiune normalizantă asupra funcționalității HK, iar BioR-Ge, CMD-4, CMD-8 și CMJ-23 au prevenit creșterea sau diminuează substanțial activitatea G-6-PDH. Medicația cu BioR și CMD-4 a redus semnificativ funcționalitatea MDH-NADd, ceea ce ar putea afecta asigurarea energetică a celulei.

**Concluzii.** Rezultatele cercetării sugerează că CBA autohtoni ar putea oferi noi terapii unice și remedii eficiente în diverse afecțiuni ale oaselor.

**Cuvinte cheie:** osteopatii experimentale, compuși bioactivi, metabolism glucidic, dehidrogenaze, tetraclorură de carbon, etilenglicol.

## Introducere

Cercetările din ultimii ani, orientate spre studiul epidemiologiei, cauzelor, patogenezei maladiilor sistemului osos, au determinat rolul diferitor modificări ale homeostaziei în evoluția și pronosticului bolii, au fost elaborate și propuse noi metode de tratament [1-4].

S-a stabilit că în țesutul osos procesul glicolitic are o amploare deosebită, desfășurându-se mult mai intens decât în ficat [5-8]. Dat fiind faptul că glicoliza în condiții anaerobe este unicul proces ce asigură cu energie procesele biosintetice în multe țesuturi, inclusiv, în țesuturile mineralizate, un interes deosebit prezintă cercetarea enzimelor glicolitice, care reglează viteza glicolizei în celulele proliferative și sunt, în deosebi, importante în procesele proliferării și diferențierii tisulare.

genesis of many diseases, including the bone one. The aim of the study was to investigate the influence of local bioactive compounds on bone carbohydrate metabolism in experimental osteopathies (OP), and argumentation of their utility in prevention and treatment of bone pathology.

**Material and methods.** *Toxic osteopathy* was induced in two series of experimental animals by carbon tetrachloride ( $\text{CCl}_4$ ) and ethylene glycol (EG) intoxication. Assessment of carbohydrate metabolism markers included the determination of the activity of glycolysis (hexokinase (HK), lactate- and pyruvate-dependent lactate dehydrogenases – LDH-L, LDH-P), of pentose-phosphate cycle (glucose-6-phosphate dehydrogenase – G-6-PDH) and of the Krebs cycle enzymes (catabolic NAD-dependent malate dehydrogenase – NADd-MDH). The local BAC – CMD-4, CMD-8, CMJ-23, CMJ-26 and CMJ-33, and remedies obtained from *Spirulina platensis* – BioR, BioR-Ge, were studied. Statistical analysis was performed using t-Student and “U” Mann-Witney criterias with statistical *StatsDirect Software* program (StatsDirect Ltd, UK).

**Results.** Significant changes in the activity of studied carbohydrate metabolism enzymes were found in OP induced by  $\text{CCl}_4$  and ethylene glycol (EG) intoxication. The activity of all studied enzymes in the bone was decreased, while the HK – increased in  $\text{CCl}_4$ -induced OP. Local BAC decreased the activity of HK and restored or induced the activity of LDH, G-6-PDH and NADd-MDH in the bone of animals with  $\text{CCl}_4$ -induced OP. Essential amplification of HK and G-6-PDH occurred in EG-induced OP. BioR normalized the activity of HK, while BioR-Ge, CMD-4, CMD-8 and CMJ-23 substantially diminished the G-6-PDH activity. Medication with BioR and CMD-4 decreased conclusively the activity of NADd-MDH.

**Conclusions.** The findings of the research suggest that local BAC might provide unique new therapies and effective remedies for various bone diseases.

**Key words:** experimental osteopathies, bioactive compounds, carbohydrate metabolism, dehydrogenases, carbon tetrachloride, ethylene glycol.

## Introduction

Recent researches of epidemiology, causes and pathogenesis of bone diseases, determined the role of different homeostasis changes in the evolution and prognosis of the disease. New methods of treatment have been developed and proposed [1-4].

It has been established that glycolysis is more intense in the bone than in the liver [5-8]. Since the glycolysis under anaerobic conditions is the only process which provides energy for biosynthetic processes in many tissues, including mineralized one, of particular interest is the research of glycolytic enzymes, which regulates the rate of glycolysis and are particularly important in the processes of cell proliferation and tissue differentiation.

În studiile științifice cu referință la problema în cauză, lipsesc date ce relevă modificările enzimelor glicolitice, ciclului pentozo-fosfat și ciclului Krebs în osteopatiile induse prin administrarea diferitor compuși toxici –  $\text{CCl}_4$  și etilenglicol. Rămân departe de a fi soluționate problemele elaborării metodelor eficiente de tratament și de corecție ale dereglărilor metabolice, caracteristice patologiei osoase [2, 4, 9].

În acest aspect, un interes deosebit îl prezintă bazele Schiff și complexele lor cu unele metale de tranziție, precum și bioremediile, obținute din cianobactera *Spirulina platensis* prin sinteză dirijată – BioR, BioR-Ge (conține microelementul Ge cu proprietăți terapeutice valoroase). Multiple studii anterioare au evidențiat efectele terapeutice ale acestora în maladiile diferitor organe [10, 11].

Elucidarea aspectelor noi ale activității compușilor menționați și ale mecanismelor biochimice de acțiune asupra organismului este actuală și de perspectivă pentru diversificarea arsenalului de remedii de înaltă eficiență, necesare corecției dereglărilor metabolice în diferite maladii.

Pornind de la aceste premize, scopul studiului a fost de a cerceta mecanismele de acțiune ale unor compuși bioactivi autohtoni (baze Schiff noi, combinația lor cu metale 3d), precum și ale unor substanțe de origine cianobacteriană asupra metabolismului glucidic în țesutul osos la modelarea osteopatiei experimentale, argumentarea utilității folosirii lor în prevenția și tratamentul patologiei osoase.

## Material și metode

Cercetarea a fost aprobată de Comitetul de Etică a Cercetării a USMF „Nicolae Testemițanu” (aviz din 20 iunie 2011).

În studiu au fost utilizați compușii bioactivi (CBA) autohtoni (baze Schiff noi, combinațiile lor cu metale 3d) și remedii, obținute din biomasa cianobacteriei *Spirulina platensis*. Compușii CMD-4, CMD-8, CMJ-23, CMJ-26 și CMJ-33 au fost oferți de prof. univ., șef Catedră Chimie Anorganică a USM, academician Aurelian Gulea [12]. Remediile – BioR și BioR-Ge, au fost oferite de prof. univ., directorul Institutului de Microbiologie și Biotehnologie al AȘ a Moldovei, academician Valeriu Rudic.

*Osteopatia (OP) toxică* a fost indusă prin intoxicarea șobolanilor cu  $\text{CCl}_4$  [13, 14] și etilenglicol, în două serii de experiențe.

În *prima serie* de experiențe, cercetarea a fost efectuată pe un eșantion de 45 de șobolani albi, masculi, linia Wistar, cu masa 180-220 g, divizați în 7 loturi a câte 5-6 animale în fiecare. Animalele au fost divizate în următoarele loturi experimentale:

- (1) martor (6 animale intacte, cărora li s-a administrat ulei de măsline, 1,0 ml/kilocorp, bisăptămânal, timp de 8 săptămâni);
- (2) animale cu OP, indusă prin administrarea soluției 50% de  $\text{CCl}_4$  în ulei de măsline, în doza de 1,0 ml/kilocorp, bisăptămânal, timp de 8 săptămâni;
- (3) animale cu OP + CMD-4;
- (4) animale cu OP + CMD-8;
- (5) animalele cu OP + CMJ-23;

Scientific studies regarding the concerned problem lack data about the changes of bone glycolysis, pentose-phosphate cycle and the Krebs cycle enzymes in the osteopathies induced by different toxic compounds, including  $\text{CCl}_4$  and ethylene glycol. Remain far from solving the problem of development of effective methods of correction of metabolic disorders characteristic for bone pathology [2, 4, 9].

Schiff bases and their complexes with some transition metals and bioremediations obtained from cyanobacteria *Spirulina platensis* by directed synthesis - BioR and BioR-Ge (contains microelement Ge with valuable therapeutic properties) are of special interest in this respect. Multiple previous studies have shown their therapeutical effects in the diseases of different organs [10, 11]. Investigations in experimental pathologies contribute to the understanding of the mechanisms involved in their pathogenesis and the development of new directions in diagnosis and treatment of these diseases.

Elucidation of the new aspects of the activity of BAC and of the biochemical mechanisms of action on the organism is actual and has future application for the diversification of high efficiency remedies arsenal necessary for correction of metabolic disorders in different diseases.

Starting from these premises *aim of the study* was to investigate the mechanisms of action of some local bioactive compounds (new Schiff bases, their combination with 3d metals), as well as of some substances of cyanobacterial origin, on bone carbohydrate metabolism in experimental osteopathy, for argumentation of their usefulness in the prevention and treatment of bone pathology.

## Material and methods

The research was approved by the Research Ethics Committee of the *Nicolae Testemițanu* State University of Medicine and Pharmacy (minute of June 20, 2011).

In this study have been used the local bioactive compounds (BAC) (new Schiff bases, their combinations with 3d metals) and remediations obtained from cyanobacteria *Spirulina platensis* biomass. Compounds CMD-4, CMD-8, CMJ-23, CMJ-26 and CMJ-33 have been provided by the univ. prof., Head of Department of Inorganic Chemistry of State University of Moldova, academician Gulea Aurelian [12]. Remediations – BioR and BioR-Ge, have been provided by the univ. prof., director of the Microbiology and Biotechnology Institute of Academy of Science of Moldova, academician Valeriu Rudic.

*Toxic osteopathy (OP)* was induced by  $\text{CCl}_4$  [13, 14] and ethylene glycol in two series of experiments.

In the *first series* of experiments the research was conducted on a sample of 45 Wistar line male rats with 180-220 g mass, divided into 7 groups of 5-6 animals in each. The animals were divided into the following experimental groups:

- (1) control (6 intact animals, whom was administered 1.0 ml/kg body weight of olive oil, twice a week for 8 weeks);
- (2) animals with OP induced by administration of 50%  $\text{CCl}_4$  solution in olive oil in a dose of 1.0 ml/kg body weight, twice a week for 8 weeks;

- (6) animale cu OP + CMJ-26;
- (7) animale cu OP + CMJ-33.

În această serie de experiențe, toate substanțele au fost dizolvate în soluție fiziologică ce conținea 1% gelatină, apoi, au fost administrate i.m. timp de 14 zile, doza zilnică constituind 0,1 mg/kilocorp pentru CMD-4, CMD-8, CMJ-23, CMJ-26 și CMJ-33. Animalelor din lotul martor și lotul cu OP, în decursul la 14 zile, li se injecta i.m. soluție fiziologică, ce conținea 1% gelatină.

În a doua serie de experiențe, activitatea biologică a CBA autohtoni a fost evaluată pe un lot de 45 de șobolani albi, masculi, linia Wistar, cu masa 160-180 g, divizați în 7 loturi a câte 5-7 animale:

- (1) martorul – 6 animale intacte;
- (2) animale cu OP, indusă prin administrarea etilenglicolului în doza de 1 g/kilocorp per os, zilnic, pe parcursul a 30 de zile;
- (3) animale cu OP + BioR;
- (4) animale cu OP + BioR-Ge;
- (5) animale cu OP + CMD-4;
- (6) animale cu OP + CMD-8;
- (7) animale cu OP + CMJ-23.

Toate substanțele au fost diluate în sol. fiziologică, ce conținea 1% gelatină și, apoi, administrate i.m., timp de 14 zile, doza zilnică constituind 0,1 mg/kilocorp. Animalelor din lotul martor și lotul cu OP, în decursul a 14 zile, li se injecta i.m. soluție fiziologică, ce conținea 1% gelatină.

Cercetarea țesuturilor mineralizate prezintă anumite dificultăți, de aceea, pregătirea omogenatelor osoase a fost efectuată în felul următor: oasele femurale au fost extrase, eliberate de țesuturile adiacente, fărâmițate în câteva fragmente, după care, măduva osoasă a fost înlăturată prin spălări repetate cu soluție glaciară de 0,9% de NaCl. În continuare, oasele femurale au fost supuse triturării în azot lichid, până la starea de pulbere, în piuliță de porțelan cu pisălog și cântărite pe balanța de torsiune. În calitate de mediu de dispersare, a fost folosită soluția de 0,16 mM EDTA, pH 7,4. Astfel, concentrația finală a omogenatului a constituit 10%. Pentru distrugerea completă a membranelor celulare, omogenatele osoase, după prelucrarea cu triton X-100 în concentrație finală de 0,1%, au fost supuse ciclurilor de congelare/dezghetare (repetate de 3 ori).

Determinarea activității enzimatice s-a efectuat în supernatantul obținut la centrifugarea omogenatului osos la 5000 tur/min, timp de 10 min. Ulterior, supernatantul obținut a fost transferat în eprubete Eppendorf și păstrat în stare congelată la temperatura de -40°C.

Evaluarea indicilor metabolismului glucidic a inclus determinarea activității enzimelor glicolitice – hexokinazei (HK), lactatdehidrogenazelor lactat- și piruvat-dependente (LDH-L, LDH-P), ciclului pentozo-fosfaților (glucozo-6-fosfat dehidrogenazei – G-6-PDH) și ciclului Krebs (malat dehidrogenazei catabolice NAD-dependente – MDH-NADd) prin metode descrise anterior [15, 16].

Toate procedeele de determinare a activității enzimelor și a conținutului de substanțe au fost executate după tehnici,

- (3) animals with OP + CMD-4;
- (4) animals with OP + CMD-8;
- (5) animals with OP + CMJ-23;
- (6) animals with OP + CMJ-26;
- (7) animals with OP + CMJ-33.

In this series of experiments, the BAC – CMD-4, CMD-8, CMJ-23, CMJ-26 and CMJ-33, have been dissolved in 0.89% saline solution containing 1% gelatin, then have been administered i.m. in the daily dose of 0.1 mg/kg body weight for 14 days. Animals from the control and OP groups were injected i/m 0.89% saline solution containing 1% gelatin for 14 days.

In the second series of experiments, the local BAC have been evaluated on a group of 45 Wistar male rats with 160-180 g mass, divided into 7 groups of 5-7 animals each:

- (1) the control – 6 intact animals;
- (2) animals with OP, induced by oral ethylene glycol administration in dosage of 1 g/kg body weight, daily, for 30 days;
- (3) animals with OP + BioR;
- (4) animals with OP + BioR-Ge;
- (5) animals with OP + CMD-4;
- (6) animals with OP + CMD-8;
- (7) animals with OP + CMJ-23.

All substances have been diluted in the 0.9% saline solution containing 1% gelatin and then administered i.m. for 14 days, the daily dose being 0.1 mg/kg body weight. Animals from the control and OP groups were injected i.m. 0.9% saline solution containing 1% gelatin for 14 days.

The research of mineralized tissues presents certain difficulties, due to the high amount of minerals. Thus the preparation of bone homogenates was performed in the following way: the femurs were removed from adjacent tissues, minced into several fragments and the bone marrow was removed by repeated washings with glaciated 0.9% NaCl solution. Further, femurs were triturated in liquid nitrogen until the powder state in the porcelain mortar with pestle and weighed on the electronic balance. 0.16 mM EDTA solution, pH 7.4, was used as dispersing medium till the final concentration of the homogenate of 10%. For the complete destruction of cell membranes, bone homogenates, after processing with triton X-100 with the final concentration of 0.1%, were subjected to 3 freezing/defrosting cycles.

Enzyme activity assay was carried out in the supernatant obtained after the centrifugation of bone homogenate at 5000 revs/min for 10 min. Subsequently, the obtained supernatant was transferred to Eppendorf tubes and stored in the frozen state at temperature -40°C.

Assessment of carbohydrate metabolism included the determination of the activity of glycolytic enzymes – hexokinase (HK), lactate dehydrogenases lactate- and pyruvate-dependent (LDH-L, LDH-P), of pentose-phosphate cycle (glucose-6-phosphate dehydrogenase – G-6-PDH) and of the Krebs cycle (catabolic NAD-dependent malate dehydrogenase – NADd-MDH) by previously described methods [15, 16].

Enzyme activity and substances content assay have been executed by techniques adapted to multi-modal hybrid rider

adaptate la riderul hibrid multi-modal cu microplăci Synergy H1 (Hybrid Reader, BioTek Instruments, SUA).

Rezultatele obținute au fost evaluate statistic conform criteriului t-Student, precum și celui nonparametric „U” Mann-Witney cu ajutorul programului *StatsDirect Statistical Software* (StatsDirect Ltd, Marea Britanie).

## Rezultate

Influența CBA autohtoni asupra activității enzimelor glicolitice, ciclului pentozo-fosfaților și ciclului Krebs în țesutul osos în OP CCl<sub>4</sub>-indusă sunt reflectate în datele statistice din Tabelul 1.

La animalele cu OP CCl<sub>4</sub>-indusă, se produce o amplificare pregnantă a HK, ce depășea cu 85% (p<0,05) valorile martorului.

Administrarea CMD-4 pe fundal de OP CCl<sub>4</sub>-indusă, influențează neimportant gradul de inducție a HK în țesutul osos; activitatea acestei enzime menținându-se la nivelul înregistrat la animalele cu OP.

În același timp, tratamentul cu CMD-8, CMJ-23, CMJ-33 și CMJ-26 induce o diminuare statistic semnificativă a activității HK, antecedent crescute la animalele cu OP CCl<sub>4</sub>-indusă, enzima manifestând tendința certă de restabilire până la valorile animalelor intacte (Tabelul 1).

Din datele prezentate în Tabelul 1, rezultă că în OP se înregistrează o reducere veridică a LDH-L cu 44% (p<0,05) și o diminuare statistic nerelevantă a LDH-P cu 19%.

Astfel, se atestă o creștere veridică, cu 72%-85% (p<0,05),

with microplates Synergy H1 (Hybrid Reader, BioTek Instruments, USA).

Statistical analysis was performed using t-Student and “U” Mann-Witney criterias with *Statistical StatsDirect Software* program (StatsDirect Ltd, UK).

## Results

Influence of local BAC on the activity of glycolysis, pentose-phosphate cycle and the Krebs cycle enzymes in the bone in CCl<sub>4</sub>-induced OP are reflected in the statistical data of Table 1.

Significant amplification of HK activity, which exceeded by 85% (p<0.05) the control values, was identified in animals with CCl<sub>4</sub>-induced OP. Administration of CMD-4 did not significant influence the degree of induction of bone HK, the activity of this enzyme being maintained at the level registered in animals with CCl<sub>4</sub>-induced OP.

At the same time, treatment with CMD-8, CMJ-23, CMJ-33 and CMJ-26 induced statistically conclusive decrease of the antecedent increased HK activity in animals with CCl<sub>4</sub>-induced OP, enzyme activity manifesting a clear trend of restoring to the values of intact animals (Table 1).

Data presented in the Table 1 shows that there has been a definite reduction of LDH-L by 44% (p<0.05) and a statistically irrelevant decrease of LDH-P by 19% in CCl<sub>4</sub>-induced OP. Administration of CMD-4 and CMD-8 determined a increase by 72%-85% (p<0.05) of LDH-L activity in animals with CCl<sub>4</sub>-induced OP, which practically was not different from the values registered in reference animals. Medication with CMJ-26,

**Tabelul 1.** Influența CBA autohtoni asupra activității enzimelor glicolitice, ciclului pentozo-fosfaților și ciclului Krebs în țesutul osos în OP CCl<sub>4</sub>-indusă.

**Table 1.** Influence of local BAC on the activity of glycolytic enzymes, pentozo-phosphate cycle and the Krebs cycle in the bone tissue in CCl<sub>4</sub>-induced OP.

Grupurile de studiu / Study groups	HK, μkat/g.prot	LDH-L, mkat/g.prot	LDH-P, μkat/g.prot	G-6-PDH, nkat/g.prot	MDH-NADd, μkat/g.prot
Martor / Control	43,2±11,8 (100%)	26,5±0,9 (100%)	7,06±0,4 (100%)	210,5±39,7 (100%)	1,5±0,1 (100%)
CCl <sub>4</sub>	79,8±6,4* (185%)	14,8±2,2' (56%)	5,7±0,8 (81%)	114,4±13,4* (54%)	1,0±0,1* (66%)
CCl <sub>4</sub> + CMD-4	71,7±3,6* (166%)	25,4±3,1# (96%)	7,23±0,6 (102%)	172,4±51,3 (82%)	1,5±0,1## (100%)
CCl <sub>4</sub> + CMD-8	57,0±5,3# (132%)	27,4±3,3# (103%)	8,2±0,4 (116%)	181,7±41,4 (86%)	1,4±0,1 (93%)
CCl <sub>4</sub> + CMJ-23	51,9±6,0# (120%)	33,8±2,4*## (127%)	8,1±0,2 (115%)	85,7±10,1 (41%)	1,5±0,1 (100%)
CCl <sub>4</sub> + CMJ-33	48,6±2,4# (113%)	32,2±3,0## (121%)	7,5±0,3 (106%)	214,9±52,5 (102%)	1,6±0,1# (101%)
CCl <sub>4</sub> + CMJ-26	48,9±2,4## (113%)	31,5±3,0## (119%)	7,6±0,30 (108%)	163,7±48,5 (78%)	1,5±0,1# (100%)

*Notă:* \* – diferență statistic semnificativă cu lotul-martor (\* – p<0,05; \*\* – p<0,01); # – diferență statistic semnificativă cu lotul CCl<sub>4</sub> (# – p<0,05; ## – p<0,01).  
*Note:* \* – statistically significant difference with the control group (\* – p<0.05; \*\* – p<0.01); # – statistically significant difference compared to CCl<sub>4</sub> group (# – p<0.05; ## – p<0.01).

a activității LDH-L la animalele cu OP după administrarea compușilor CMD-4 și CMD-8, care, practic, nu se deosebea de valorile înregistrate la animalele de referință. Medicația cu compușii CMJ-26, CMJ-23 și CMJ-33 conduce nu numai la restabilirea funcționalității enzimei, dar și la o sporire veridică, cu 112%-118% ( $p < 0,01$ ) a activității LDH-L, în raport cu valorile animalelor cu OP.

S-a stabilit că în OP  $\text{CCl}_4$ -indusă, activitatea G-6-PDH scade relevant cu 46% ( $p < 0,05$ ), în raport cu valorile animalelor intacte.

În lotul de animale cu OP, sub influența compușilor CMD-4, CMD-8, și CMJ-33, activitatea enzimei, practic, se restabilește până la valorile animalelor intacte. Totodată, medicația cu CMJ-23 și CMJ-26 influențează slab funcționalitatea G-6-PDH, modificările depistate fiind statistic neconcludente ( $p > 0,05$ ).

Rezultatele cercetărilor demonstrează că în OP  $\text{CCl}_4$ -indusă, are loc o suprimare marcată a activității MDH-NADd cu 34% ( $p < 0,05$ ), în comparație cu valorile specifice pentru animalele intacte. Administrarea CBA testați conduce la redresarea funcționalității MDH-NADd, practic, până la indicii animalelor intacte.

Influența medicației cu CBA asupra metabolismului glucidic în țesutul osos la modelarea osteopatiei indusă de intoxicația cu etilenglicol (EG) este reflectată în datele statistice din Tabelul 2.

Din datele expuse în tabel, constatăm că modificările activității LDH-L și LDH-P atât în lotul cu OP, cât și cele supuse medicației cu CBA testați, s-au dovedit a fi fără relevanță statistică.

CMJ-23 and CMJ-33 led not only to the restoring of enzyme activity, but also to a significant increase by 112%-118% ( $p < 0.01$ ) of LDH-L activity compared to the values specific for animals with OP.

It has been found that G-6-PDH activity was relevant decreased by 46% ( $p < 0.05$ ) in the  $\text{CCl}_4$ -induced OP compared with the values of intact animals. CMD-4, CMD-8, and CMJ-33 restored the enzyme activity practically to the levels of intact animals in the group of animals with OP. At the same time, medication with CMJ-23 and CMJ-26 did not influence significant the G-6-PDH activity, detected changes being statistically inconclusive ( $p > 0.05$ ).

The research results demonstrated that the MDH-NADd activity had been significantly suppressed by 34% ( $p < 0.05$ ) in  $\text{CCl}_4$ -induced OP compared to specific values of intact animals. Administration of the tested BAC led to the restoration of the MDH NADd functionality practically to the indices of the intact animals.

The influence of medication with BAC on bone carbohydrate metabolism in osteopathy induced by the intoxication with ethylene glycol (EG) is reflected in the statistical data in Table 2.

Data presented in the Table 2 reveal that the changes of LDH-L and LDH-P activities both in the OP group and in that treated with the tested BAC were statistically irrelevant.

In animals with ethylene glycol induced OP occurred an essential amplification of hexokinase activity that exceeded by 67% ( $p < 0.05$ ) the control values.

**Tabelul 2.** Influența CBA autohtoni asupra activității enzimelor glicolitice, ciclului Krebs și pentozo-fosfat în țesutul osos în OP indusă cu etilenglicol.

**Table 2.** Influence of the local BAC on the glycolytic enzymes, Krebs cycle and pentose-phosphate pathway activity in the bone tissue in ethylene glycol induced OP.

Grupuri de studiu / Study groups	HK, μkat/g.prot	LDH-L, mkat/g.prot	LDH-P, μkat/g.prot	G-6-PDH, nkat/g.prot	MDH-NADd, μkat/g.prot
Martor / Control	28,1±2,0 (100%)	9,3±1,11 (100%)	3,2±0,3 (100%)	153,0±14,9 (100%)	0,8±0,1 (100%)
EG	46,8±5,5* (167%)	10,6±1,0 (114%)	3,4±0,30 (106%)	268,4±69,5* (175%)	0,8±0,1 (101%)
EG + BioR	33,2±6,4 (118%)	8,0±0,4 (87%)	2,4±0,1 (74%)	304,5±38,6** (199%)	0,5±0,02*** (67%)
EG + BioR-Ge	38,3±3,9 (136%)	9,5±2,1 (102%)	3,1±0,7 (95%)	116,0±47,3 (76%)	0,8±0,10 (100%)
EG + CMD-4	39,0±5,4 (139%)	7,4±1,2 (80%)	2,3±0,3 (70%)	80,6± 13,5** (53%)	0,4±0,04* (69%)
EG + CMD-8	49,5±6,7* (176%)	7,5±1,3 (81%)	2,5±0,5 (78%)	135,0±43,9* (88%)	0,7±0,1 (88%)
EG + CMJ-23	43,2±5,6* (156%)	10,2±0,7 (110%)	3,3±0,3 (102%)	194,8±29,6 (127%)	0,9±0,1 (109%)

Notă: \*- diferență statistic semnificativă cu lotul-martor (\*-  $p < 0,05$ ; \*\*-  $p < 0,01$ ); #- diferență statistic semnificativă cu lotul etilenglicol (#-  $p < 0,05$ ; ##-  $p < 0,01$ ).  
Note: \*- statistically significant difference with the control group (\*-  $p < 0.05$ ; \*\*-  $p < 0.01$ ); #- statistically significant difference compared to etilenglicol group (#-  $p < 0.05$ ; ##-  $p < 0.01$ ).

La animalele cu OP etilenglicol-indusă, se produce o amplificare esențială a hexokinazei, ce depășea cu 67% ( $p < 0,05$ ) valorile martorului.

CBA autohtoni diminuează moderat și nesemnificativ statistic activitatea HK, antecedent crescută sub influența intoxicației cu etilenglicol. Doar remediul BioR influențează mai potent procesele de redresare a HK, funcția căreia s-a redus cu 30%, comparativ cu valorile depistate la animalele netratate și care se deosebea puțin de valorile de referință. Totodată, remediul BioR-Ge și compusul CMD-4 doar tind să reducă activitatea HK la animalele cu OP toxică, care s-a menținut sporită cu 36-39% peste valorile lotului martor. În același timp, compușii CMD-8 și CMJ-23 mențin crescută activitatea HK la animalele cu OP, aceasta depășind cu 76%, și, respectiv, 56% valorile martorului ( $p < 0,05$  în ambele cazuri).

Intoxicația cu etilenglicol produce o amplificare pregnantă, cu 75% ( $p < 0,05$ ), a activității G-6-PDH în țesutul osos față de parametrii de referință. Medicația cu biopreparatul BioR asigură un spor notabil al activității enzimei, aceasta dublându-și forța catalitică; CMJ-23 și CMD-8 reduc activitatea enzimei antecedent crescută până la valorile specifice lotului martor, iar BioR-Ge și CMD-4 inhibă hiperactivitatea G-6-PDH cu 57% și 70% ( $p < 0,05$ ), în raport cu animalele cu OP.

Activitatea MDH-NAD dependente nu se modifică în OP etilenglicol-indusă. Medicația cu CMD-4 și BioR descrește concludent funcționalitatea MDH-NAD dependente în OP etilenglicol-indusă cu 31-33% ( $p < 0,05$ ), comparativ cu indicii lotului martor.

## Discuții

Sporirea activității HK cu 85% în OP  $\text{CCl}_4$ -indusă și cu 67% în OP indusă cu etilenglicol, reflectă accelerarea proceselor fosforilării monozaharidelor în țesutul osos, care, ulterior, pot fi metabolizate în glicoliză sau ciclul pentozo-fosfat.

Activitatea HK la administrarea CMD-4, pe fundal de OP  $\text{CCl}_4$ -indusă, precum și la administrarea CMD-8 și CMJ-23 în OP indusă cu etilenglicol, s-a menținut la nivelul înregistrat la animalele cu patologia netratată, fapt ce indică la proprietatea acestor compuși de a menține la nivel sporit procesele fosforilării monozaharidelor în țesutul osos.

Creșterea activității HK în OP, stabilite în cercetările noastre constituie, probabil, reacția de adaptare, ce urmează să intensifice aportul de energie și, astfel, să accelereze procesele reparatorii. Nu excludem, însă, faptul, că hiperfuncția HK rezultă din acțiunea activatorilor sau suspendarea acțiunii inhibitorilor enzimei, sau prin transformarea reciprocă a diverselor variante conformaționale ale enzimei menționate [6, 11, 17].

Dacă HK este inițiatorul proceselor metabolizării glucidelor, atunci LDH-P este izoforma enzimei care catalizează conversia piruvatului în lactat – reacția finală a scindării anaerobe a glucozei, iar izoforma lactatdehidrogenazei LDH-L – catalizează conversia lactatului în piruvat, acesta din urmă incluzându-se în glicoliza aerobă. Diminuarea activității LDH-L relevă scăderea intensității glicolizei aerobe.

Rezultatele studiului efectuat relevă proprietatea compușilor testați de a înlătura supresia lactatdehidrogenazelor, cu

Local BAC decreased moderately and statistically insignificant the antecedent increased by the ethylene glycol poisoning activity of HK. Only BioR more potent affected the recovery of HK, which function was reduced by 30% compared to the detected in untreated animals and that was close to the reference values. At the same time, BioR-Ge and CMD-4 induced only a trend of HK activity reduction in animals with toxic OP, which was remained increased by 36-39% over the control group values. CMD-8 and CMJ-23 maintained elevated the activity of HK in animals with OP, which exceeded by 76%, and, respectively, 56% the control values ( $p < 0.05$  in both cases).

Ethylene glycol intoxication produced significant amplification by 75% ( $p < 0.05$ ) of G-6-PDH activity in the bone compared to the reference level. Medication with BioR induced the twice increase of enzyme activity, CMJ-23 and CMD-8 reduced antecedent increased enzyme activity till the values specific for the control group, while BioR-Ge and CMD-4 diminished the activity of G-6-PDH by 57% and 70% ( $p < 0.05$ ) compared to animals with OP.

Activity of MDH NAD-dependent did not change in ethylene glycol induced OP. Medication with CMD-4 and BioR conclusively decreased the NAD-dependent MDH in ethylene glycol induced OP by 31-33% ( $p < 0.05$ ) compared to the control group levels.

## Discussion

The increase of HK activity by 85% in  $\text{CCl}_4$ -induced OP and by 67% in ethylene glycol induced OP reflects the acceleration of the monosaccharides phosphorylation processes in the bone, which can subsequently be metabolized in the glycolysis or pentose-phosphate cycle.

The activity of HK at the administration of CMD-4 in  $\text{CCl}_4$ -induced OP and at the administration of CMD-8 and CMJ-23 in OP induced by ethylene glycol, was maintained at the level registered in animals with the untreated pathology, indicating the property of these compounds to maintain at high level the processes of the monosaccharide phosphorylation in the bone.

Increased activity of HK in OP established in our research is, probably, an adaptation reaction, which is ment to increase the energy production and thus to accelerate reparative processes. We do not exclude that HK hyperfunction results from the activators action or cancelation of the enzyme inhibitors action, or by the mutual transformation of different conformational variants of the mentioned enzyme [6, 11, 17].

If HK is the initiator of carbohydrate metabolism processes, then LDH-P is the enzyme isoform which catalyzes the conversion of pyruvate to lactate – final reaction of anaerobic oxidation of glucose, but the LDH-L isoform of lactate dehydrogenase – catalyzes the conversion of lactate into pyruvate, the latter being included into aerobic glycolysis. The decrease of LDH-L activity revealed the decreases intensity of the aerobic glycolysis.

The study results reveal the property of the tested compounds to remove the lactate dehydrogenases suppression, especially of LDH-L isoform, responsible for the conversion of lactate to pyruvate with its subsequent oxydation by the

precădere a LDH-L, responsabilă de conversia lactatului în piruvat cu includerea lui ulterioară în glicoliza aerobă. Astfel, CBA cercetați au proprietatea de a ameliora glicoliza aerobă.

De remarcat că administrarea CBA în OP determină și restabilirea LDH-P până la valorile nivelului de referință a enzimăactivității, însă modificările fiind fără relevanță statistică.

Modificările relevate la administrarea compușilor cercetați trebuie calificate ca fiind un complex de mecanisme compensatoare, care întrețin la nivel suficient intensitatea metabolismului glucidic și schimbul energetic în țesutul osos la animalele cu OP experimentală.

Creșterea activității LDH-L sub influența CBA testați, reflectă accelerarea proceselor de oxido-reducere și intensificarea regenerării reparative, prin compensarea carenței energetice celulare instalate în OP CCl<sub>4</sub>-indusă.

Acest proces este o parte a mecanismului adaptiv-compensator al menținerii homeostaziei celulare și a fost remarcat ca unul specific intensificării proceselor regenerative osoase [8, 9, 11, 17]. În aceste mecanisme, un rol important i se atribuie, conform ultimelor date, factorului de inducere a hipoxiei 1 $\alpha$  (HIF1 $\alpha$ ), care stimulează glicoliza anaerobă prin inducerea activității mai multor enzime-cheie, cum ar fi piruvat dehidrogenaza kinaza 1 (PDK1), lactat dehidrogenaza A (LDHA), hexokinaza (HK) și creșterea semnificativă a nivelului de lactat [18-21], iar suprimarea glicolizei blochează formarea osoasă indusă de HIF1 $\alpha$  *in vivo*.

HIF-1 $\alpha$  este unul dintre cei mai importanți factori de reglare a reacțiilor de hipoxie, jucând un rol important în modelarea și remodelarea oaselor și homeostazia țesutului osos. Excesul HIF-1 $\alpha$  în osteoblastele mature prin deleția condiționată a genei von Hippel-Lindau (*VHL*) crește puternic angiogeneza și osteogeneza. Astfel, șoarecii *VHL* cu carență de osteoblaste, au un nivel ridicat de HIF-1 $\alpha$  și de creștere a masei și densității osoase [22].

Scăderea relevantă a activității G-6-PDH în OP CCl<sub>4</sub>-indusă, stabilită în cercetările noastre, ar putea conduce la inhibarea sau la blocarea uneia dintre căile metabolice importante de utilizare a glucozei – ciclul pentozo-fosfaților, diminuând resursele energetice necesare pentru menținerea proceselor anabolice ale celulei. Una din sursele de NADPH+H<sup>+</sup> în organism este ciclul pentozo-fosfaților. NADPH+H<sup>+</sup>, ce deține funcții anabolice, se include în sinteza diversilor biopolimeri și substanțe biologice active (acizi grași, colesterol, aminoacizi, fosfolipide etc.), elemente importante pentru proliferarea și diferențierea osteoblastelor care, la rândul lor vor promova formarea osoasă [23].

Proprietatea CBA autohtoni de a reduce supresia G-6-PDH și chiar de a restabili sau stimula activitatea enzimei la tratarea animalelor cu OP CCl<sub>4</sub>-indusă poate fi apreciată ca un efect osteoregenerator; fenomen mai exprimat la administrarea CMD-4, CMD-8, CMJ-26 și CMJ-33.

Această afirmație este susținută de studiile unor autori, care au stabilit că încărcarea mecanică ciclică *in vivo*, care duce la formarea de os nou, este asociată în osteocite și celulele osoase de suprafață cu creșteri aproape imediate ale activității G-6-PDH și creșteri ulterioare ale producției ARN-ului. Ambele

aerobic pathway. Thus investigated BAC have the property to improve aerobic glycolysis.

The administration of BAC in OP determines the LDH-P recovery to the reference values of enzyme activity, but the changes are not statistic relevant.

The revealed changes after administration of the investigated compounds have to be qualified as a complex of compensating mechanisms that keep at the sufficient level intensity of carbohydrate metabolism and energy production in the bone of animals with experimental OP.

Increased activity of LDH-L under the influence of the tested BAC reflects acceleration of oxido-reductive processes and intensification of reparative regeneration, by compensating cellular energy deficiency installed in CCl<sub>4</sub>-induced OP.

This process is a part of the adaptive-compensatory mechanism of cellular homeostasis maintenance and was noted as specific for intense bone regeneration [8, 9, 11, 17]. In these mechanisms an important role is assigned, according to the latest data, to the hypoxia-inducible factor 1 $\alpha$  (HIF-1 $\alpha$ ), which stimulates anaerobic glycolysis by inducing the activity of several key-enzymes, such as pyruvate dehydrogenase kinase 1 (PDK1), lactate dehydrogenase A (LDHA), hexokinase (HK) and increases significant the lactate level [18-21], while inhibition of glycolysis is blocking bone formation induced by HIF1 $\alpha$  *in vivo*.

HIF-1 $\alpha$  is one of the master regulators of hypoxia reactions, playing an important role in bone remodeling, and homeostasis. And overexpression of HIF-1 $\alpha$  in mature osteoblasts through conditional deletion of the von Hippel-Lindau (*VHL*) gene increases significant angiogenesis and osteogenesis. Studies showed that mice with osteoblasts lacking *VHL* had a high level of HIF-1 $\alpha$  and increased bone mass and density [22].

Relevant decreased activity of G-6-PDH in CCl<sub>4</sub>-induced OP established in our research, could lead to the inhibition or blockage of one of the important glucose metabolic pathways – pentose-phosphate cycle, reducing the resources required to maintain anabolic processes of the cell.

One of the sources of NADPH+H<sup>+</sup> in the body is pentose-phosphate cycle. NADPH+H<sup>+</sup> is required for the synthesis of various biopolymers and biologically active compounds (fatty acids, cholesterol, amino acids, phospholipids etc.), that are important for the proliferation and differentiation of osteoblasts which in turn, will promote bone formation [23].

Property of local BAC to reduce the suppression of G-6-PDH and even to restore or stimulate the activity of the enzyme in animals with CCl<sub>4</sub>-induced OP can be appreciated as an osteoregenerating effect, the phenomenon being more expressed after administration of CMD-4, CMD-8, CMJ-26 and CMJ-33.

This conclusion is supported by some studies which have established that cyclic mechanical loading *in vivo*, that leads to new bone formation, is associated in osteocytes and surface bone cells with almost immediate G-6-PDH activity increase, and later RNA production increase. Both these early loading-related responses can be reproduced in organ culture of adult cancellous bone. Exogenous PGI<sub>2</sub> stimulated both G-6-PDH



răspunsuri timpurii, legate de încărcare, pot fi reproduse în cultura de organ al osului adultului.  $\text{PGI}_2$  exogenă stimulează atât activitatea G-6-PDH cât și încorporarea [3H]-uridinei, în osteocite și în celulele de suprafață. Prostaciclina, dar nu și  $\text{PGE}_2$ , pare să imite creșterea timpurii, asociate cu încărcarea activității G-6-PDH și sinteza ARN-ului *in situ*, în celulele osoase [24].

Intoxicația cu etilenglicol produce o amplificare pregnantă, cu 75% ( $p < 0,05$ ), a activității G-6-PDH, aceasta servind, probabil, un mecanism adaptiv-compensatoriu de menținere a homeostaziei osoase, asigurând cu substrat plastic (NADPH) țesutul osos, afectat de etilenglicol.

Malat dehidrogenaza (MDH) este enzima principală a ciclului Krebs, care catalizează conversia oxaloacetatului și malatului, folosind sistemul coenzimei NAD/NADH. Este o enzimă alosterică, având în calitate de efectori metaboliți, cum ar fi malatul, oxaloacetatul și citratul.

Suprimarea marcată a activității MDH-NADd în OP  $\text{CCl}_4$ -indusă se poate explica, probabil, prin diminuarea cantității substratelor reacției, catalizate de această enzimă și reducerea intensității ciclului Krebs, ca parte componentă a glicolizei aerobe, ceea ce este o dovadă a dereglării îndeplinirii energice a țesutului osos, intoxicat cu  $\text{CCl}_4$ .

Administrarea compușilor cercetați duce la restabilirea nivelului funcțional al MDH-NADd până la valorile animalelor intacte, ceea ce ar putea contribui la îndeplinirea necesităților energetice sporite, prin accelerarea reacțiilor ciclului Krebs și menținerea constantă a raportului dintre formele oxidate și reduse ale NAD-ului [8, 17].

Astfel, CBA autohtoni manifestă o acțiune particulară asupra nivelului activității enzimelor cercetate în țesutul osos. Modificările relevate pot fi apreciate ca manifestări ale proceselor de adaptare pentru menținerea homeostazei celulare optime. Acțiunea selectivă a preparatelor studiate asupra enzimelor tisulare depinde, probabil, de gradul de angajare a lor la diferite etape ale procesului patologic.

Reprogramarea metabolică, indusă de CBA studiați, poate modifica nivelurile de metaboliți cheie (cum ar fi NADPH, acetyl-CoA,  $\alpha$ -cetoglutarat), necesari pentru modificările epigenetice, fapt menționat în mai multe cercetări experimentale [21, 25, 26]. Sunt necesare studii detaliate pentru a explora mecanismele moleculare la nivel de transducție a semnalelor HIF $\alpha$ , WNT, mecanisme bine-cunoscute de inducere a glicolizei aerobe și de stimulare a anabolismului osos [27]. După cum se cunoaște, creșterea glicolizei aerobe reprezintă un mecanism general implicat în diferențierea osteoblastelor ca răspuns la diverși stimuli fiziologici. O mai bună înțelegere a mecanismelor reglării metabolice poate deschide căi pentru dezvoltarea unor noi clase de medicamente anabolice osoase [19, 27].

## Concluzii

- 1) Osteopatia experimentală (OP) indusă prin intoxicația cu  $\text{CCl}_4$  provoacă modificări pronunțate ale metabolismului glucidic, care se manifestă prin amplificarea pregnantă a activității hexokinazei (HK) și reducerea semnificativă a funcționalității lactat dehidrogenazei-lactat-dependente

activity and [3H]-uridine incorporation equally in osteocytes and surface cells. Prostacyclin, but not  $\text{PGE}_2$ , appears to imitate the early loading-related increase in G-6-PDH activity and RNA synthesis in bone cells *in situ* [24].

Ethylene glycol intoxication produced an obvious rise of the G-6-PDH activity by 75% ( $p < 0.05$ ), which probably is an element of the adaptive-compensatory mechanism of bone homeostasis maintenance, ensuring plastic substrate (NADPH) supply for bone damaged by ethylene glycol.

Marked suppression of NADd-MDH activity in  $\text{CCl}_4$ -induced OP is explained, probably, by the reduction of the reaction substrates quantity and of the intensity of the Krebs cycle reactions, as part of aerobic glycolysis, which is a proof of the energy supply disturbance of the bone in  $\text{CCl}_4$  intoxication.

Administration of the investigated compounds led to the restoration of the MDH-NAD-dependent functional level up to the values of intact animals, which could contribute to the coverage of the increased energy requirements, by speeding-up the reactions of the Krebs cycle and the maintaining constant of the ratio between oxidized and reduced forms of NAD [8, 17].

Thus, the local BAC exhibit a particular action on the level of the investigated enzyme activity in the bone. Revealed changes can be appreciated as manifestations of adaptation processes of maintenance of the optimal cellular homeostasis. The selective action of the studied compounds on the tissue enzymes depends, probably, on their engagement degree at the different stages of the pathological process.

Metabolic reprogramming induced by the studied BAC can modify the levels of the key metabolites (such as NADPH, acetyl-CoA,  $\alpha$ -ketoglutarate) required for epigenetic changes, fact mentioned in many experimental studies [21, 25, 26]. Are necessary further detailed studies of the molecular mechanisms at the level of transduction of HIF $\alpha$ , WNT signals, well-known mechanisms aerobic glycolysis induction and bone anabolism stimulation [27]. As it is known, increased aerobic glycolysis represents a general mechanism involved in osteoblast differentiation in response to various physiological stimuli. A better understanding of the mechanisms of metabolic regulation may open ways for the development of new classes of bone anabolic drugs [19, 27].

## Conclusions

- 1) Experimental osteopathy (OP) induced by intoxication with  $\text{CCl}_4$  caused pronounced changes in carbohydrate metabolism, manifested by the significant increase of hexokinase (HK) activity and substantial reduction of lactate-dependent lactate dehydrogenase (LDH-L), glucose-6-phosphate dehydrogenase (G-6-PDH) and malate dehydrogenase NAD-dependent (MDH-NADd) activities.
- 2) Treatment with the local bioactive compounds (BAC) – CMD-4, CMD-8, CMJ-23, CMJ-33 and CMJ-26, proved to be effective due to their properties to maintain at increased values the activity of bone HK and to restore or induce LDH and MDH-NADd functional capacity.

- (LDH-L), glucozo-6-fosfat dehidrogenazei (G-6-PDH) și malat dehidrogenazei-NAD dependente (MDH-NADd).
- 2) Medicația cu compușii bioactivi (CBA) autohtoni – CMD-4, CMD-8, CMJ-23, CMJ-33 și CMJ-26 s-a dovedit a fi eficientă, datorită calităților lor de a menține la valori sporite activitatea HK osoase și, de asemenea, de a restabili sau induce funcționalitatea LDH și MDH-NADd.
  - 3) Studiile efectuate relevă că în OP  $\text{CCl}_4$ -indusă, toți compușii testați, exceptând CMJ-23, fortifică esențial activitatea G-6-PDH osoase, valorile acestui indice revenind în limitele normei.
  - 4) În OP indusă prin intoxicația cu etilenglicol (EG), are loc o amplificare esențială a HK și G-6-PDH, iar CBA testați împiedică, într-o măsură discretă, hiperactivitatea acestor enzime. Doar BioR manifestă acțiune normalizantă asupra funcționalității HK, iar BioR-Ge, CMD-4, CMD-8 și CMJ-23 previn sau diminuează substanțial creșterea activității G-6-PDH în OP indusă cu EG. Medicația cu BioR și CMD-4 descrește concludent funcționalitatea MDH-NADd, ceea ce ar putea afecta îndeplinirea necesităților energetice ale celulei.
  - 5) Rezultatele studiilor întreprinse permit evidențierea unor mecanisme moleculare implicate în răspunsul la tratamentul cu CBA autohtoni, fapt ce deschide posibilități reale de elaborare a unor noi strategii terapeutice eficiente.

#### Abrevieri și notații convenționale

CBA	– compușii bioactivi;
$\text{CCl}_4$	– tetraclorura de carbon;
EDTA	– acid etilendiamintetraacetic;
EG	– etilenglicol;
G-6-PDH	– glucozo-6-fosfat dehidrogenaza;
HIF-1 $\alpha$	– factorul inducibil al hipoxiei 1 $\alpha$ ;
HK	– hexokinase;
LDHA	– lactat dehidrogenaza A;
LDH-L	– lactatdehidrogenaza-lactat-dependență;
LDH-P	– lactatdehidrogenaza-piruvat-dependență;
MDH-NADd	– malat dehidrogenaza-NAD dependentă;
$\text{NAD}^+$	– nicotinamid adenin dinucleotid fosfat oxidat;
NADPH+H	– nicotinamid adenin dinucleotid fosfat redus;
OP <sup>+</sup>	– osteopatia toxică;
PDK1	– kinaza piruvat dehidrogenazei 1.

#### Declarație privind conflictul de interese

Autorii declară lipsa conflictelor de interese.

#### Contribuția autorilor

Elaborarea designu-lui studiului: VG; realizarea testelor de laborator: LA, OM, IS, VS; analiza statistică: VS, LA, OM, IS; interpretarea rezultatelor: VS, OT, VG; scrierea manuscrisului: VS, OT; elaborarea concluziilor: VS, OT, VG; redactarea manuscrisului: OT, VG.

- 3) Conducted studies revealed that in  $\text{CCl}_4$ -induced OP, all tested compounds, except CMJ-23, essentially amplified the activity of bone G-6-PDH, which values returned to the reference one.
- 4) In OP induced by ethylene glycol (EG) intoxication there was identified an essential amplification of HK and G-6-PDH, and the tested BAC prevented the hyperactivity of these enzymes. Only BioR exhibit an action of HK activity normalization, but BioR-Ge, CMD-4, CMD-8 and CMJ-23 prevent or substantially decrease the previously increased activity of G-6-PDH in OP induced by EG. Medication with BioR and CMD-4 conclusively decreased the MDH-NADd activity, which could affect the cell energy needs supply.
- 5) Results of conducted studies allow to highlight the molecular mechanisms involved in the response to the OP treatment with local BAC, which open real possibilities for developing of new effective therapeutic strategies.

#### Abbreviations and conventional notations

BAC	– bioactive compounds;
$\text{CCl}_4$	– carbon tetrachloride;
EDTA	– ethylenediaminetetraacetic acid;
EG	– ethylene glycol;
G-6-PDH	– glucose-6-phosphate dehydrogenase;
HIF-1 $\alpha$	– hypoxia-inducible factor 1 $\alpha$ ;
HK	– hexokinase;
LDHA	– lactate dehydrogenase A;
LDH-L	– lactate-dependent lactate dehydrogenase;
LDH-P	– pyruvate-dependent lactate dehydrogenase;
MDH-NADd	– malate dehydrogenase NAD-dependent;
$\text{NAD}^+$	– oxidized nicotinamide adenine dinucleotide phosphate;
NADPH+H <sup>+</sup>	– reduced nicotinamide adenine dinucleotide phosphate;
OP	– toxic osteopathy;
PDK1	– pyruvate dehydrogenase kinase 1.

#### Declaration of conflicting interests

The authors declare no conflicts of interest.

#### Authors contribution

Design and elaboration of study: VG; laboratory testing: LA, OM, IS, VS; statistical analysis: VS, LA, MO, IS; interpretation of results: VS, OT, VG; writing of the manuscript: VS, OT; conclusion elaboration: VS, OT, VG; manuscript drafting: OT, VG.

**Referințe / references**

1. Barbă O. Sănătatea publică în Moldova. *Anuar statistic al MS RM*, 2009; 332 p.
2. Compston J. Treatments for osteoporosis – looking beyond the horizon. *N. Engl. J. Med.*, 2007; 356: 1878-1880.
3. Raisz L. Pathogenesis of osteoporosis: concepts, conflicts, and prospects. *J. Clin. Invest.*, 2005; 115: 3318-3325.
4. Tagadiuc O. Biochimia țesutului osos – aspecte metabolice în normă și patologii. Chișinău, Elena VI SRL, 2011, 160 p.
5. Dunham J., Shedden R., Catterall A. *et al.* Pentose-shunt oxidation in the periosteal cells in healing fractures. *Calcif. Tissue Res.*, 1977; 23 (1): 77-81.
6. Касавина Б. С., Торбенко В. П. Жизнь костной ткани. М., 1979, 175 с.
7. Мирошников В. М., Табукова Т. В. Характеристика ферментов гликолиза при биостимуляции репаративного остеогенеза. *Вопросы медицинской химии*. Москва: Медицина, 1987; 4: 73-75.
8. Торбенко В. П., Касавина Б. С. Функциональная биохимия костной ткани. Москва, Медицина, 1977.
9. Sardari V. Influența unor biopreparate de origine algală asupra proceselor osteoregenerative în osteoporoză. *Curierul medical*, 2006; 291 (3): 21-24.
10. Gulea A., Poirier D., Pahonțu E., Țapcov V., Bejenari N., Roy J. Inhibitori ai leucemiei mieloide umane în baza compușilor coordinați ai cuprului (II) cu saliciliden-tiosemicarbazide. Brevet de invenție MD3890, 2009. BOPI, 2009;4;35.
11. Sardari V. Contribuții la studiul metabolismului glucidic, remodelării osoase și influenței unor biopreparate algale cu conținut divers de Zn în osteoporoză experimentală. *Autoreferat al tezei de doctor în medicină*. Chișinău, 2008; 24 p.
12. Gulea A., Poirier D., Țapcov V., Pahonțu E. Perclorați de 5-R-Saliciliden-4-feniltiosemicarbazonato (1-)-aquacupru (II) ce posedă proprietăți de inhibitori ai activității enzimei 17 $\alpha$ -HSD (Tipul 1). Brevet de invenție MD Nr. 3996, 2009. Publ. BOPI Nr. 12/2009.
13. Iredale J. Models of liver fibrosis: exploring the dynamic nature of inflammation and repair in a solid organ. *J. Clin. Invest.*, 2007; 117: 539-548.
14. Nussler A., Wildemann B., Freude T. *et al.* Chronic CCl<sub>4</sub> intoxication causes liver and bone damage similar to the human pathology of hepatic osteodystrophy: a mouse model to analyse the liver-bone axis. *Arch. Toxicol.*, 2014; 88 (4): 997-1006.
15. Gudumac V., Rîvneac V., Tagadiuc O., Sardari V. *et al.* Metode de cercetare a metabolismului hepatic. Elaborare metodică. Sub red. Gudumac V. USMF „Nicolae Testemițanu”. Chișinău, 2012. Tipogr. „Tehnica-Info”, 162 p.
16. Tagadiuc O., Sardari V., Andronache L., Gudumac V. Protocole standardizate de cercetare ale metabolismului glucidic în țesutul osos. Ghid practic, Chișinău, Tipogr. „Elan Poligraf”, 2014, 48 p.
17. Прохончуков А. А., Жижин Н. А., Тигранян Р. А. Гомеостаз костной ткани в норме и при экстремальном воздействии. В «Проблемы космической биологии», под ред. Уголева А. М. Москва. Наука, 1984; 49: 14-63.
18. Regan J. *et al.* Up-regulation of glycolytic metabolism is required for HIF1 $\alpha$ -driven boneformation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2014; 111 (23): 8673-8678.
19. Shomento S. *et al.* Hypoxia-inducible factors 1-alpha and 2-alpha exert both distinct and overlapping functions in long bone development. *J. Cell Biochem.*, 2010; 109 (1): 196-204.
20. Wan C. *et al.* Activation of the hypoxia-inducible factor-1alpha pathway accelerates bone regeneration. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2008; 105 (2): 686-691.
21. Wang Y. *et al.* The hypoxia-inducible factor alpha pathway couples angiogenesis to osteogenesis during skeletal development. *J. Clin. Invest.*, 2007; 117 (6): 1616-1626.
22. Shao J., Zhang Y., Yang T. *et al.* HIF-1 $\alpha$  disturbs osteoblasts and osteoclasts coupling in bone remodeling by up-regulating OPG expression. *In Vitro Cell. Dev. Biol. Animal*, 2015; 51: 808.
23. Stanton R. Glucose-6-phosphate dehydrogenase, NADPH, and cell survival. *IUBMB Life*, 2012; 64 (5): 362-369.
24. Rawlinson S., Mohan S., Baylinli D., Lanyon L. Exogenous prostacyclin, but not prostaglandin E<sub>2</sub>, produces similar responses in both G6PD activity and RNA production as mechanical loading, and increases IGF-II release, in adult cancellous bone in culture. *Calcified Tissue International*, 1993; 53 (5): 324-329.
25. Imai S. *et al.* Sir2: an NAD-dependent histone deacetylase that connects chromatin silencing, metabolism, and aging. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.*, 2000; 65: 297-302.
26. Lu C. *et al.* IDH mutation impairs histone demethylation and results in a block to cell differentiation. *Nature*, 2012; 483 (7390): 474-478.
27. Esen E. *et al.* WNT-LRP5 signaling induces Warburg effect through mTORC2 activation during osteoblast differentiation. *Cell Metab.*, 2013; 17 (5): 745-755.

ARTICOL DE CERCETARE

## Diagnosticul retinopatiei diabetice, bazat pe analiza comparativă a depigmentării zonei maculare: studiu experimental

Natalia Kresyun<sup>†\*</sup>, Leonid Godlevsky<sup>†2</sup>

<sup>†</sup>Departamentul de Oftalmologie, Universitatea Națională de Medicină din Odessa, Odessa, Ucraina;

<sup>2</sup>Departamentul de Biofizică, informatică și dispozitive medicale, Universitatea Națională de Medicină din Odessa, Odessa, Ucraina.

Manuscrisul a fost primit la data: 27.04.2017

Acceptat pentru publicare la data: 12.06.2017

### Autor corespondent:

Natalia Kresyun, PhD, profesor  
Departamentul de Oftalmologie  
Universitatea Națională de Medicină din Odessa  
2, Valekhovsky lane, Odessa, Ucraina, 65082  
e-mail: godlevsky@odmu.edu.ua

### Ce nu este cunoscut, deocamdată, la subiectul abordat

Nu a fost studiată, deocamdată, modificarea cantitativă a culorii maculei pe scara CIELAB a imaginii oftalmoscopice, în funcție de gradul ei de depigmentare, în retinopatia diabetică.

### Ipoteza de cercetare

Cuantificarea gradului de depigmentare a maculei pe scara CIELAB a culorilor, comparativ cu coloristica vaselor arteriale, permite diagnosticul precoce al microanevrismelor și al retinopatiei diabetice.

### Noutatea adusă literaturii științifice din domeniu

S-a constatat creșterea luminozității zonei maculare la pacienții diabetici, care ar putea fi predictivă pentru apariția microanevrismelor și utilă pentru diagnosticul precoce al retinopatiei diabetice.

### Rezumat

**Introducere.** Retinopatia diabetică (RD) se manifestă prin deteriorări morfologice caracteristice ale fundului de ochi. Dimensiunea redusă a microanevrismelor (MA), asociată cu culoarea similară a țesutului învecinat, complică abordarea diagnosticului de RD prin evaluarea MA. Având în vedere că un proces inflamator sever stă la baza dezvoltării RD, este posibil ca radicalii liberi să provoace depigmentarea țesutului retinian. Prin urmare, evaluarea culorii din zona maculară, com-

RESEARCH ARTICLE

## Diabetic retinopathy diagnostics via comparative analysis of macular zone depigmentation: experimental study

Nataliya Kresyun<sup>†\*</sup>, Leonid Godlevsky<sup>†2</sup>

<sup>†</sup>Department of Ophthalmology, Odessa National Medical University, Odessa, Ukraine;

<sup>2</sup>Department of Biophysics, informatics and medical devices, Odessa National Medical University, Odessa, Ukraine.

Manuscript received on: 27.04.2017

Accepted for publication on: 12.06.2017

### Corresponding author:

Nataliya Kresyun, PhD, professor  
Department of Ophthalmology  
Odessa National Medical University  
2, Valekhovsky lane, Odessa, Ukraine, 65082  
e-mail: godlevsky@odmu.edu.ua

### What is not known yet about the topic

At the moment, it has not been studied the quantitative modification of the macula color on the CIELAB scale on ophthalmoscope image, depending on its degree of depigmentation in the diabetic retinopathy.

### Research hypothesis

The quantification of the degree of macular depigmentation on the CIELAB scale of colors, compared to the arterial vessels color, allows the early diagnosis of micro aneurisms and diabetic retinopathy.

### Article's added novelty on the scientific topic

It was established increased lightness in macular zone in patients with diabetes, which might be predictive for micro aneurisms appearance and might be used for early diabetic retinopathy diagnostics.

### Abstract

**Introduction.** Diabetic retinopathy (DR) is manifested by characteristic morphological deteriorations in the eye bottom. The small size of micro aneurisms (MA) along with similar color of neighboring tissue complicates the approach for DR diagnostics based on MA verification. As far as severe inflammatory process underlay DR development, it is possible that free radicals are able to cause depigmentation of retinal tissue. Hence, evaluation of the color in macula zone with the conse-

parată, ulterior, cu celelalte zone ale fundului de ochi care nu conțin astfel de pigment, ar putea fi utilă pentru determinarea semnelor precoce ale precipitării RD. Au fost investigate caracteristicile culorii maculei și ale trunchiului arterial învecinat drept biomarkeri ai precipitării retinopatiei diabetice.

**Material și metode.** Caracteristicile culorii structurilor fundului de ochi au fost verificate pe scala CIELAB a imaginilor oftalmoscopice. A fost comparată diferența dintre valorile medii ale coordonatelor  $L^*$ ,  $a^*$  și  $b^*$  ale scalei CIE la pacienții cu diabet zaharat și la voluntari sănătoși. A fost estimată valoarea predictivă a diferențelor obținute pentru dezvoltarea RD pe baza apariției MA pe parcursul unui an de observație a pacienților cu diabet.

**Rezultate.** Valoarea medie a parametrului  $L^*$  la pacienții cu diabet zaharat a fost de 2,71 ori ( $p < 0,05$ ) mai mare decât la grupul de persoane practic sănătoase, în timp ce valoarea parametrului  $a^*$  a fost redusă de 3,8 ori, comparativ cu cea de control ( $p < 0,05$ ); parametrul  $b^*$  a depășit de 12,4 ori valoarea de control ( $p < 0,05$ ). Parametrul integrat al diferenței de culoare ( $\Delta E$ ) a depășit valoarea de control de 2,87 ori ( $p < 0,05$ ). Diferențele mai pronunțate ale  $\Delta E$  au fost urmate de perioade mai scurte până la apariția MA, cu un nivel de corelație de -0,56 ( $p < 0,05$ ).

**Concluzii.** Datele obținute susțin ipoteza creșterii luminozității în zona maculară la pacienții cu diabet zaharat, care ar putea fi predictivă pentru apariția MA și utilă pentru diagnosticul precoce al RD.

**Cuvinte cheie:** retinopatie diabetică, analiza imaginilor oftalmoscopice, microanevrism.

## Introducere

Retinopatia diabetică (RD) se manifestă prin deteriorări morfologice caracteristice ale fundului de ochi. Apariția microanevrismelor (MA) reprezintă primul indicator inițial și robust pentru retinopatia indusă de diabet [1, 2]. Dimensiunea redusă a MA, asociată cu culoarea similară a țesutului învecinat, complică abordarea diagnosticului de RD, bazat pe evaluarea MA [2]. Prin urmare, diagnosticarea precoce a RD reprezintă un subiect actual în domeniul oftalmologiei [1, 3].

Având în vedere că un proces inflamator sever stă la baza dezvoltării RD [4], este posibil ca radicalii liberi să poată determina depigmentarea țesutului retinian [5]. Prin urmare, evaluarea culorii din zona maculară, comparată, ulterior, cu celelalte zone ale fundului de ochi, care nu conțin un astfel de pigment, ar putea fi utilă pentru determinarea semnelor precoce ale precipitării RD.

Trebuie de subliniat faptul că noi am elaborat mai recent sistemul propus pentru analiza caracteristicilor colorației suprafețelor biologice, care a fost utilizat eficient cu scop de diagnostic precoce al cariei, la pacienții ortodontici [6, 7]. Într-un astfel de sistem, cel mai important este utilizarea unui standard de culoare, calibrat, care permite efectuarea unei comparații fiabile. De aceea, pentru a efectua o comparație eficientă în timpul investigației diagnostice a fundului de ochi, am decis să folosim trunchiul vaselor arteriale drept standard de culoare. Această decizie a fost justificată de stabilitatea

quent comparison with the other zones of eye bottom, which are free from such pigment, might be helpful for the verification of early signs of DR precipitation. Color characteristics of macula and neighboring arterial trunk as biomarkers of diabetic retinopathy precipitation were investigated.

**Material and methods.** Color characteristics of eye bottom structures were verified in CIELAB scale on ophthalmoscope images. The difference of average values of  $L^*$ ,  $a^*$  and  $b^*$  coordinates of CIE scale in patients with diabetes and healthy volunteers was compared. Predictive value of gained differences for DR development on the basis of appearance of MA in one year observation of patients with diabetes was estimated.

**Results.** The average value of  $L^*$  in diabetic patients exceeded such one in the group of practically healthy persons by 2.71 times ( $p < 0.05$ ), while value of  $a^*$  index was reduced by 3.8 times when compared with control one ( $p < 0.05$ );  $b^*$  index exceeded such one in the control group by 12.4 times ( $p < 0.05$ ). The integrated index on color difference ( $\Delta E$ ) exceeded control value by 2.87 times ( $p < 0.05$ ). More pronounced differences with  $\Delta E$  were followed by shorter period of MA appearance with correlation level at -0.56 ( $p < 0.05$ ).

**Conclusions.** Gained data are in favor for the increased lightness in macular zone in patients with diabetes, which might be predictive for MA appearance and might be used for early DR diagnostics.

**Key words:** diabetic retinopathy, ophthalmoscope images analysis, micro aneurism.

## Introduction

Diabetic retinopathy (DR) is manifested by characteristic morphological deteriorations in the eye bottom. Among others the appearance of micro aneurisms (MA) occupies first place as initial and robust indicator for diabetes-induced retinopathy [1, 2]. The small size of MA along with similar color of neighboring tissue complicates the approach for DR diagnostics based on MA verification [2]. That is why the early diagnostics of DR is still actual for the ophthalmology [1, 3].

As far as severe inflammatory process underlay DR development [4] it is possible that free radicals are able to cause depigmentation of retinal tissue [5]. Hence, evaluation of the color in macula zone with the consequent comparison with the other zones of eye bottom, which are free from such pigment, might be helpful for the verification of early signs of DR precipitation.

It should be stressed that earlier we have worked out the system purposed for the analysis of color characteristics of biological surfaces, which was effectively used in orthodontic patients for the early caries diagnostics [6, 7]. The necessity of the usage of calibrated standard of color which permits to perform reliable comparison is most important for such system. That is why for performing effective comparison in the course of eye bottom diagnostic investigation we decided to use arterial vessel trunk as a color standard. Such a decision

mai înaltă a hemoglobinei față de acțiunea radicalilor liberi în țesutul retinian și de degradarea minimă, presupusă, a colorației hemoglobinei.

Prin urmare, scopul prezentei lucrări a fost evaluarea posibilității principale de diagnostic al stadiului incipient al RD, bazată pe compararea caracteristicilor culorii zonei maculare cu cea din trunchiurile vaselor arteriale.

### Material și metode

Au fost înrolați 20 de voluntari practic sănătoși (vârsta medie  $33,2 \pm 3,5$  ani) și 53 de pacienți cu diabet zaharat de tip 2 insulinodependent (vârsta medie  $30,6 \pm 3,3$  ani).

Toți subiecții au dat consimțământul scris pentru înrolare. Toate investigațiile au fost efectuate în conformitate cu cerințele etice ale comitetului de etică de la Universitatea Națională de Medicină din Odessa (Întreținerea Animalelor și Comitetul de Etică al ONMedU, 2008/84).

La selectarea grupului de control, au fost respectate următoarele criterii:

- (1) presiunea intraoculară  $< 21$  mmHg;
- (2) acuitatea vizuală păstrată;
- (3) câmpul vizual nedeteriorat;
- (4) absența bolilor oftalmice și a tulburărilor neurologice.

Pentru diabetici, au fost următoarele criterii:

- (1) presiunea intraoculară mai puțin de 21 mmHg;
- (2) acuitatea vizuală corectabilă (mai mult de  $7/10$ );
- (3) absența semnelor de retinopatie proliferativă, care a fost stabilită prin intermediul fluoroangiografiei [1];
- (4) durata diabetului nu mai puțin de 2,5 ani.

Imaginile digitale ale fundului de ochi se caracterizează prin contrast scăzut al structurilor și o iluminare heterogenă, centrul imaginii fiind cel mai luminos [1, 3]. Cu scopul de a diminua aberațiile menționate, am utilizat tehnologia de egalizare de histogramă adaptivă, limitată de contrast (CLAHE), care s-a dovedit a fi eficientă pentru contrastul crescut al vaselor de la fundul de ochi și a permis creșterea contrastului de 1,7-3,0 ori [3, 8].

Ulterior, toate caracteristicile obținute pe scala de culori RGB au fost transferate pe scala CIELAB, în conformitate cu algoritmul de lucru [6, 7]. Mai târziu, scala CIE a permis evaluarea coordonatelor indicilor de luminozitate  $L^*$ ,  $a^*$  și  $b^*$ .

Rezultatele cercetărilor au fost prelucrate statistic, aplicând metoda ANOVA și testul Newman-Keuls.

### Rezultate

În conformitate cu examinarea oftalmoscopică, la 18 pacienți nu au fost detectate MA, iar la ceilalți pacienți a fost demonstrată prezența lor.

Indicele de luminozitate  $L^*$  a crescut comparativ cu valoarea normală (diferența dintre colorația trunchiului vascular și a maculei) (Figura 1). Astfel, valoarea medie a  $L^*$  la pacienții cu diabet zaharat a fost de 2,71 ori mai mare ( $p < 0,05$ ) decât în grupul de control (persoane practic sănătoase). În același timp, valoarea indicelui  $a^*$  a fost redusă de 3,8 ori, comparativ cu cea de control ( $p < 0,05$ ); indicele  $b^*$  al scalei CIELAB a depășit indicele de control de 12,4 ori ( $p < 0,05$ ). Indexul inte-

was justified by more stable state of hemoglobin to action of free radicals at retinal tissue and presumably minimal deterioration of hemoglobin color.

Hence, the aim of the present work was to evaluate the principal possibility of the diagnostics of early stage of DR on the basis of comparison of color characteristics of macular zone with such one of arterial vessels trunks.

### Material and methods

Were enrolled 20 practically healthy volunteers (the mean age  $33.2 \pm 3.5$  years old) and 53 insulin-dependent patients who suffered from second type of diabetes (the mean age  $30.6 \pm 3.3$  years old).

All subjects provided written consent to research conduction. All investigations have been performed in accordance to ethics demands of commission on ethics at Odessa National Medical University (ONMedU Animal Care and Ethics Committee, 2008/84).

By selecting the control group, the following criteria were adhered to:

- (1) the intraocular pressure  $< 21$  mmHg;
- (2) preserved acuity of vision;
- (3) unaltered visual field;
- (4) absence of eye diseases and neurological disorders.

For the diabetics, the criteria were as follows:

- (1) the intraocular pressure less than 21 mmHg;
- (2) correctable acuity of vision (more than  $7/10$ );
- (3) absence of signs of the proliferative retinopathy, which was established by means of fluoroangiography [1];
- (4) duration of diabetes was not less than 2.5 years.

Digital images of eye bottom are characterized by low contrast of structures and heterogeneous illumination being most bright in the center of image [1, 3]. With the aim of diminishing of mentioned aberrations we used the contrast-limited adaptive histogram equalization (CLAHE) technology, which proved to be effective for the increasing contrast of vessels of eye bottom and permitted to increase the contrast by 1.7-3.0 times [3, 8].

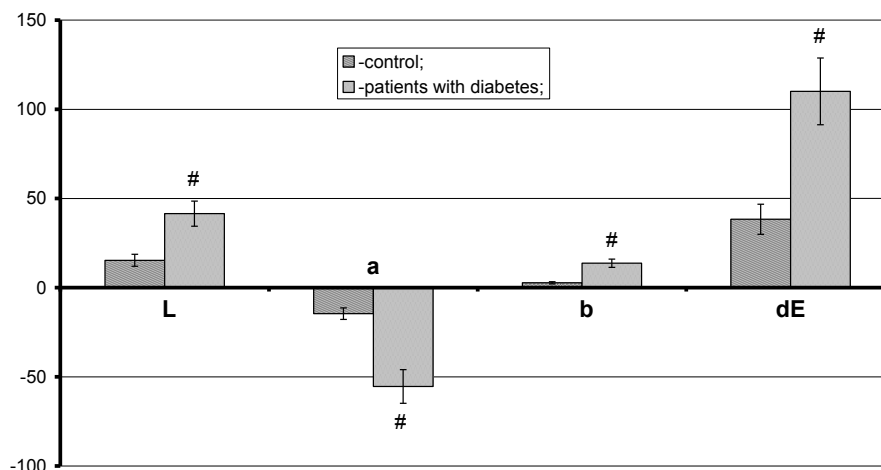
Hence, all characteristics which have been gained in RGB color scale were transferred into CIELAB scale in accordance to worked algorithm [6, 7]. Later on the CIE scale permitted to evaluate coordinates of lightness index  $L^*$ ,  $a^*$  and  $b^*$ .

Research results were statistically processed applying the ANOVA method and the Newman-Keuls test.

### Results

In accordance to ophthalmoscope examination, in 18 patients MA were not detected, while the rest of patients demonstrated their presence.

The lightness index  $L^*$  increased when compared with the normal value (the difference between vessel trunk and macula color) (Figure 1). Thus, average value of  $L^*$  in diabetic patients exceeded such one in the control group (practically healthy persons) by 2.71 times ( $p < 0.05$ ). At the same time, value of  $a^*$  index was reduced by 3.8 times when compared with control one ( $p < 0.05$ );  $b^*$  index of CIELAB scale exceeded such one in



**Fig. 1** Scala CIELAB la pacienții cu diabet zaharat.

Note: ordonata – diferența dintre maculă și trunchiul arterial (unități relative); abscisa – indicii scării CIELAB. Datele sunt prezentate drept medie și deviație standard. # –  $p < 0,05$ , comparativ cu datele din grupul de control. Statistică: testul ANOVA și Newman-Keuls.

**Fig. 1** CIELAB scale data in patients suffered from diabetes.

Notes: ordinate – difference between macular and arterial trunk (relative units); abscissa – indices of CIELAB scale. Data are presented as mean and standard deviation. # –  $p < 0.05$  in comparison with the data in control group. Statistics: ANOVA and Newman-Keuls test.

grat al diferenței de culoare ( $\Delta E$ ) a depășit valoarea de control de 2,87 ori ( $p < 0,05$ ) (Figura 1).

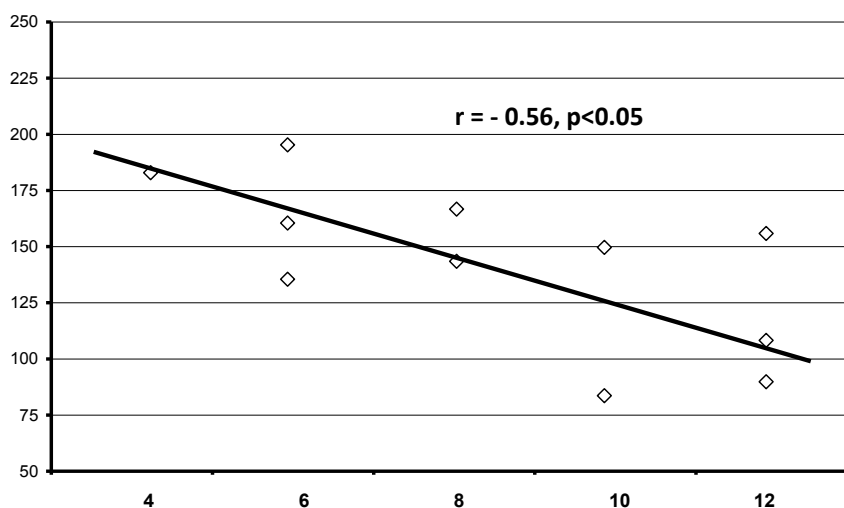
Prin urmare, datele obținute sunt în favoarea ipotezei luminozității crescute în zona maculară la pacienții cu diabet zaharat și acest efect este datorat diminuării culorilor roșii și albastre, asociată cu creșterea culorilor verzi și galbene. În același timp, se observă creșterea diferenței integrale de culoare, comparativ cu datele de control.

Investigarea fundului de ochi la pacienții cu diabet zaharat la un an de la momentul înregistrării diferențelor de culoare, a evidențiat apariția MA la 11 pacienți (Figura 2). Coeficientul de corelație „r” dintre dinamica aspectului MA și valoarea  $\Delta E$

the control group by 12.4 times ( $p < 0.05$ ). The integrated index on color difference ( $\Delta E$ ) exceeded control value by 2.87 times ( $p < 0.05$ ) (Figure 1).

Hence, gained data are in favor for the increased lightness in macular zone in patients with diabetes, and such effect is developed on behalf of diminution of red and blue colors along with rising of green and yellow colors. The increasing of integral color difference in comparison with the control data is observed at the same time.

Investigation of eye bottom of patients with diabetes in one year from the moment of color differences investigations revealed the appearance of MA in 11 patients (Figure 2). Coef-



**Fig. 2** Corelația dintre diferența integrală de culoare ( $\Delta E$ ) și timpul de apariție a MA la pacienții cu diabet zaharat tip 2.

Note: Ordonata –  $\Delta E$  (unități relative), abscisa – timpul din momentul diagnosticării diferențelor de culoare (luni).

Marcaje: (romburi) – pacienți cu MA nou-apărut. Trendul de regresie este prezentat prin linia descendentă.

**Fig. 2** Correlation between integral color difference ( $\Delta E$ ) and time of appearance of MA in patients with second type of diabetes.

Notes: ordinate –  $\Delta E$  (relative units), abscissa – time from the moment of diagnostics of color differences (months).

Marks (rhombs) – patients with newly appeared MA. Regression trend is presented as declined line.

a fost  $-0,56$  ( $p < 0,05$ ). În mod corespunzător, diferențele mai pronunțate ale  $\Delta E$  au fost urmate de o perioadă mai scurtă până la apariția MA.

### Discuții

Astfel, datele obținute sunt în favoarea semnificației informative a diferenței culorii dintre zona maculară și vase (trunchiul arterial), drept indicator de diagnostic pentru RD. De asemenea, s-au obținut dovezi referitor la pierderea pigmentului în zona maculară, indusă de diabetul zaharat, care corespund cu datele altor autori [9, 10].

Astfel, datele noastre au arătat că reducerea indicelui  $a^*$  al scării CIELAB este în favoarea creșterii contribuției canalului verde, în timp ce contribuția canalului roșu a fost redusă. În același timp, se presupune că o contribuție sporită a canalului galben, cu scăderea reciprocă a contribuției canalului albastru, se datorează creșterii indicelui  $b^*$  [8, 11]. Având în vedere că modelul de absorbție al retinei colorate [3] pledează pentru o semnificație mai mare a culorii albastre drept marker al melaninei, reducerea înregistrată a contribuției culorii albastre a subliniat rolul neînsemnat al melaninei în determinarea colorației retinei la pacienții cu diabet. Între timp, scăderea stabilită a contribuției canalelor roșii susține scăderea rolului melaninei în determinarea colorației retinei. Modificările menționate sunt în corelație bună cu capacitatea radicalilor liberi de a șterge culoarea pigmentilor – efect care se manifestă prin modificări spectrale caracteristice [5].

Trebuie de subliniat faptul că apariția MA, ca semne primare și robuste ale RD [1-3], ar putea fi rezultatul unei dezvoltări mai profunde a procesului patologic, cu degenerarea pericitelor din cauza acțiunii citotoxice a radicalilor liberi. Modificările de culoare constatate au fost observate mai devreme decât apariția MA și merită atenție pentru o cercetare suplimentară în calitate de primă manifestare sugestivă de RD.

### Concluzii

- 1) Diagnosticul eficient al pierderii pigmentului în zona maculară este posibil pe baza comparației caracteristicilor culorii zonei maculare și a trunchiurilor arteriale vecine pe scala CIELAB.
- 2) Pacienții care suferă de RD prezintă creșterea luminozității zonei maculare în banda galben-verde și scăderea acesteia în cea roșie.
- 3) Deteriorările constatate ale colorației structurilor fundului de ochi au prezis apariția MA, fiind cei mai fiabili markeri pentru dezvoltarea RD (coeficientul de corelație  $r = -0,56$ ).

### Declarația de conflict de interes

Nimic de declarat.

### Contribuția autorilor

Ambii autori au contribuit în mod egal la elaborarea și scrierea articolului. Versiunea finală a articolului a fost aprobată de ambii autori.

coeficient of correlation “ $r$ ” between dynamics of MA appearance and value of  $\Delta E$  was  $-0.56$  ( $p < 0.05$ ). Correspondently, more pronounced differences with  $\Delta E$  were followed by shorter period of MA appearance.

### Discussion

Thus, gained data are in favor for the informative significance of the color difference between macular zone and vessels (arterial trunk) as a diagnostic index for DR. Also gained data points on the diabetes-induced losing of pigment in macular zone, which is in correspondence with other authors data [9, 10].

Thus, our data revealed that reduction of  $a^*$  index of CIELAB scale is in favor for the increasing of green channel contribution while the contribution of red channel was reduced. At the same time the increased contribution from yellow channel with reciprocal decrease of contribution from blue channel is supposed as a result of increase of  $b^*$  index [8, 11]. Taking into consideration that absorption model of colored retina [3] is in favor for greater significance of blue color as a melanin marker, the registered reduction of blue color contribution stressed the reduced role of melanin in retina color determination in patients with diabetes. Meanwhile, established decrease of red channel contribution supports the decreased role of melanin in retina color determination. Mentioned changes are in good correlation with the ability of pigments to be washed out from their color by free radicals – effect which is manifested in characteristic spectral changes [5].

It should be stressed that appearance of MA, as first and robust signs of DR [1-3], might be the result of more deep development of pathological process with degeneration of pericytes due to free radicals cytotoxic action. Observed changes of color are observed earlier than MA appearance, and deserves attention for further estimation as first indicative manifestation of DR.

### Conclusions

- 1) The effective diagnostics on the losing of pigment in macular zone is possible to perform on the basis of comparison of color characteristics in CIELAB scale of macular zone and neighboring arterial trunks.
- 2) Patients suffered from DR displays the raise of the lightness in the macular zone in green-yellow bandwidth along with the decreasing it in the red one.
- 3) Established deteriorations of color of eye bottom structures predicted the appearance of MA as most reliable markers for DR development (correlation coefficient  $r = -0.56$ ).

### Declaration of conflicting interests

Nothing to declare.

### Authors' contribution

Both authors had an equal contribution for manuscript writing and reviewing. The final version of the article was approved by both authors.



**Referințe / references**

1. Kresyun N., Tatarchuk T., Godlevsky L. *et al.* Multiscale textural gradient method of eye bottom images analysis in automatic diagnostics of diabetic retinopathy. *Ophthalmological J.*, 2014; 4: 9-13.
2. Chin E., Ventura B., See K. Nonmydriatic fundus photography for teleophthalmology diabetic retinopathy screening in rural and urban clinics. *Telemed. J. e-Health*, 2014; 1: 102-108.
3. Hani A., Nugroho H. Retinal vasculature enhancement using independent component analysis. *J. Biomed. Sci. Engineer.*, 2009; 2: 543-549.
4. Yu Y., Chen H., Su S. Neuroinflammatory responses in diabetic retinopathy. *J. of Neuroinflammation*, 2015; 12: 141-147.
5. Kresyun N. Patophysiological mechanisms of diabetic retinopathy development and main approaches to its therapy. *Integrative Antropology*, 2013; 1 (21): 43-48.
6. Godlevsky L., Bidnyuk E., Bayazitov N. *et al.* Application of mobile photography with smartphone cameras for monitoring of orthodontic correction with dental BRACKETS. *China Journal of Modern Medicine*, 2014; 15: 10-14.
7. Godlevsky L., Bidnyuk E., Bayazitov N. *et al.* Application of mobile photography with smartphone cameras for monitoring of early caries appearance in the course of orthodontic correction with dental brackets. *Applied Medical Informatics (Romania)*, 2013; 33 (4): 21-26.
8. Fadzil M., Izhar L., Venkatachalam P. *et al.* Extraction and reconstruction of retinal vasculature. *J. Medical Engineer. Technol.*, 2007; 31: 435-442.
9. Scanolon G., Connell P., Ratzlaff M. *et al.* Macular pigment optical density is low in type 2 diabetes, compared with type 1 diabetes and normal controls. *Retina*, 2015; 35 (9): 1808-1816.
10. Lima V., Rosen R., Maia M. *et al.* Macular pigment optical density measured by dual-wavelength autofluorescence imaging in diabetic and nondiabetic patients: a comparative study. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, 2010; 51 (11): 5840-5845.
11. Berendschot T., DeLint P., Norren D. Fundus reflectance-historical and present ideas. *Progress in Retinal and Eye Research*, 2003; 22: 171-200.

ARTICOL DE CERCETARE

## Rata markerilor hepatitelor virale B și C la pacienții cu colită ulcerativă: studiu prospectiv, comparativ, descriptiv

Alina Jucov<sup>1\*</sup>, Svetlana Țurcan<sup>1†</sup>

<sup>1</sup>Disciplina gastroenterologie, Departamentul de medicină internă, Universitatea de Stat de Medicină și Farmacie „Nicolae Testemițanu”, Chișinău, Republica Moldova.

Data primirii manuscrisului: 09.05.2017  
Data acceptării spre publicare: 05.06.2017

### Autor corespondent:

Alina Jucov, doctorandă

Disciplina gastroenterologie, Departamentul de medicină internă  
Universitatea de Stat de Medicină și Farmacie „Nicolae Testemițanu”  
str. Nicolae Testemițanu 29, Chișinău, Republica Moldova, MD-2025  
e-mail: alinamogildeamed@gmail.com

### Ce nu este cunoscut, deocamdată, la subiectul abordat

Rata markerilor infecției virale cu hepatită B și hepatită C la pacienții cu colită ulcerativă din Republica Moldova nu a fost, deocamdată estimată.

### Ipoteza de cercetare

Se presupune că infecția cu hepatitele virale B și C se întâlnește mai frecvent la pacienții cu colită ulcerativă, comparativ cu populația generală și că infecția virală are o influență negativă asupra evoluției colitei ulcerative.

### Noutatea adusă literaturii științifice din domeniu

Pentru prima dată a fost evaluată rata infecției cu hepatitele B și C la pacienții cu colită ulcerativă în regiunea cu o răspândire înaltă a bolilor hepatice, în special, de genă virală. A fost studiat impactul infecției virale hepatice asupra evoluției clinico-paraclinice a colitei ulcerative.

### Rezumat

**Introducere.** În țările Europei de Est, prevalența hepatitelor virale B și C la pacienții cu boală inflamatorie intestinală (BII), în general, și cu colită ulcerativă (CU), în particular, variază în diferite regiuni, deocamdată fiind insuficient studiată. Scopul studiului a fost calculul prevalenței hepatitelor virale B și C la pacienții diagnosticați cu colită ulcerativă din Republica Moldova – regiune endemică pentru ambele infecții virale.

RESEARCH ARTICLE

## Rate of viral hepatitis B and C markers in patients with ulcerative colitis: prospective, comparative, descriptive study

Alina Jucov<sup>1\*</sup>, Svetlana Turcan<sup>1†</sup>

<sup>1</sup>Discipline of gastroenterology, Department of internal medicine, Nicolae Testemitanu State University of Medicine and Pharmacy, Chisinau, Republic of Moldova.

Manuscript received on: 09.05.2017  
Accepted for publication on: 05.06.2017

### Corresponding author:

Alina Jucov, PhD fellow

Discipline of gastroenterology, Department of internal medicine  
Nicolae Testemitanu State University of Medicine and Pharmacy  
29, Nicolae Testemitanu str., Chisinau, Republic of Moldova, MD-2025  
e-mail: alinamogildeamed@gmail.com

### What is not known yet, about the topic

The rate of markers of hepatitis B and hepatitis C viral infection in patients with ulcerative colitis in the Republic of Moldova was not yet assessed.

### Research hypothesis

It is assumed that viral hepatitis B and C infection occurs more frequently in patients with ulcerative colitis compared to the general population. Viral infection has a negative influence on the development of ulcerative colitis.

### Article's added novelty on this scientific topic

For the first time, the rate of hepatitis B and C infection was evaluated in patients with ulcerative colitis in the region with a high prevalence of liver diseases, especially viral liver diseases. The impact of viral liver infection on the clinical and paraclinical evolution of ulcerative colitis has been studied.

### Abstract

**Introduction.** In Eastern European countries the prevalence of viral hepatitis B and C in patients with intestinal inflammatory bowel disease (IBD), in general, and ulcerative colitis (UC), in particular, varies in different regions and is currently insufficiently studied. The purpose of the study was to calculate the prevalence of viral hepatitis B and C in patients diagnosed with ulcerative colitis in the Republic of Moldova – an endemic region for both viral infections.

**Material și metode.** Studiul, de tip prospectiv, a inclus 230 de pacienți care sufereau de CU (63% femei), cu vârste cuprinse între 18 ( $43,6 \pm 14,3$ ) și 81 de ani. Subiecții fiind recrutați consecutiv, în Spitalul Clinic Republican, în anul 2015. Pentru screeningul hepatitelor virale, au fost testați markerii virusului hepatitei B (VHB): HBsAg, anti-HBc și markerii virusului hepatitei C (VHC) – anti-VHC. În cazul markerilor virali pozitivi, au fost examinați ADN-VHB și/sau ARN-VHC. Grupul de control a inclus 66283 de donatori de sânge din același an.

**Rezultate.** Infecția activă și post-infecția cu virusul hepatitei B au fost prezente la 20,4% din pacienții bolnavi de CU: infecție activă (HBsAg + anti-HBc, cu un nivel al ADN-VHB detectabil) – 4,3%; infecție ocultă (izolat anti-HBc) – 10,0% și postinfecție (anti-HBc + anti-HBs + ADN-VHB negativ) – 3,9%. În grupul de control, anti-HBc a fost identificat în 36% cazuri, mai frecvent decât la bolnavii de CU ( $p < 0,001$ ), însă markerii infecției active cu VHB au fost identificați la doar 1,35% dintre pacienți, semnificativ mai puțin față de cei bolnavi de CU ( $p < 0,001$ ). Infecția cu VHC (anti-VHC pozitivi) a fost prezentă la 3,9% din persoanele bolnave de CU și la toți a fost prezentă hepatita activă, cu niveluri de ARN-VHC detectabile. În grupul de control, anti-VHC a fost depistat la 0,7% dintre donatori ( $p < 0,001$ ).

**Concluzie.** Prevalența hepatitelor virale B și C la pacienții cu colită ulcerativă din Republica Moldova – regiune endemică pentru ambele infecții virale – este semnificativ mai mare, comparativ cu grupul de control. Screeningul hepatitelor virale B și C este necesar la pacienții cu BII din zonele endemice. Bolnavii de BII sunt expuși unui risc major de infectare cu virusurile hepatice și necesită vaccinare și măsuri mai stricte de profilaxie a infecției virale nosocomiale.

**Cuvinte cheie:** colită ulcerativă, infecție cu virusul hepatitei B, infecție cu virusul hepatitei C, boli hepatice.

## Introducere

Colita ulcerativă (CU) reprezintă o afecțiune cronică inflamatorie idiopatică, ce se caracterizează prin inflamație difuză a mucoasei colonului, cu implicare a rectului și răspândire ulterioară în direcție proximală. CU este o boală mediată imun, de etiologie necunoscută, cu o evoluție progresivă, asociată cu manifestări sistemice, ceea ce necesită un tratament permanent de întreținere și are un impact nefavorabil asupra calității vieții pacientului.

Colita ulcerativă și boala Crohn constituie un grup de boli inflamatorii intestinale (BII). Conform datelor statistice oficiale ale Centrul Național de Management în Sănătate, în Moldova, în ultimii 5-7 ani, se atestă o tendință de creștere a incidenței BII [1]. Dacă media de incidență pe republică în anii 1998-2008 a constituit 3,7 cazuri la 100000 populație, atunci în perioada 2009-2015, această medie a constituit 4,7 cazuri. Tendința de creștere este mai semnificativă în rândurile populației urbane. Incidența medie a BII în Chișinău, în anii 2007-2011, a constituit 2,9 cazuri la 100000 populație, iar în 2012-2015 – deja 6,1 cazuri la 100000 populație. Astfel, incidența BII s-a majorat de două ori.

**Material and methods.** The prospective study included 230 patients with UC (63% females) aged between 18 and 81 ( $43.6 \pm 14.3$ ) years. Subjects were consecutively recruited in the Republican Clinical Hospital in 2015. HBsAg, anti-HBc markers and hepatitis C (HCV) – anti-HCV marker were tested for viral hepatitis screening. In case of positive viral markers, HBV DNA and/or HCV RNA were tested. The control group included 66283 blood donors from the same year.

**Results.** Active infection and post-infection with hepatitis B virus were present in 20.4% of patients with UC: active infection (HbsAg + anti-HBc with a detectable HBV DNA level) – 4.3%; occult infection (isolated anti-HBc) – 10.0% and post-infection (anti-HBc + anti-HBs + negative HBV DNA) – 3.9%. In the control group, anti-HBc was often identified – in 36% of cases, more frequently than in patients with UC ( $p < 0.001$ ), but active HBV infection markers were identified in only 1.35% of patients, significantly less than in those with UC ( $p < 0.001$ ). HCV infection (positive anti-HCV) was present in 3.9% of patients with UC and all had active hepatitis with detectable levels of HCV RNA. In the control group, anti-HCV was detected in 0.7% of donors ( $p < 0.001$ ).

**Conclusion.** The prevalence of viral hepatitis B and C in patients with ulcerative colitis in the Republic of Moldova – an endemic region for both viral infections – is significantly higher compared to the control group. Screening of viral hepatitis B and C is necessary in patients with IBD in endemic areas. Patients with IBD are at a high risk of infection with liver viruses and require vaccination and more stringent measures to prevent nosocomial viral infection.

**Key words:** ulcerative colitis, hepatitis B virus infection, hepatitis C virus infection, liver diseases.

## Introduction

Ulcerative colitis (UC) is a chronic inflammatory idiopathic disease characterized by diffuse inflammation of the colonic mucosa, involving the rectum and its subsequent spread proximally. UC is an immune-mediated disease of unknown etiology with a progressive evolution associated with systemic manifestations, requiring permanent maintenance therapy and has an adverse impact on the quality of life of the patient.

Ulcerative colitis and Crohn's disease constitute a group of inflammatory bowel diseases (IBD). According to the official statistical data of the National Center for Health Management in the Republic of Moldova, there has been a tendency of increased incidence of IBD over the past 5-7 years [1]. If the incidence rate in the republic between 1998 and 2008 constituted 3.7 cases per 100,000 population, then between 2009 and 2015 it was 4.7 cases. The tendency of growth is more significant among the urban population. The average incidence of IBD in Chisinau between 2007 and 2011 was 2.9 cases per 100,000 population, while between 2012 and 2015 it was 6.1 cases per 100,000 population. Thus, the incidence of IBD increased twice.

Actualitatea problemei cercetate este determinată, de asemenea, de faptul că boala respectivă este frecvent asociată cu manifestări sistemice, extraintestinale și cu alte patologii de genă imună. Manifestările extraintestinale și bolile asociate sunt raportate cu o frecvență cuprinsă între 6% și 47%, în funcție de durata bolii, ceea ce influențează considerabil calitatea vieții și mortalitatea în rândul pacienților cu BII [2]. Patologia ficatului constituie una dintre cele mai frecvente asociații în BII, fiind întâlnită la 10-15% din pacienți [3, 4]. Conform datelor autorului Bambha K., colangita sclerozantă primară (CSP) este mai frecvent diagnosticată în CU, comparativ cu boala Crohn (BC). Aproximativ 2,4-7,5% din cazurile de CU sunt asociate cu colangita sclerozantă primară [5].

### Material și metode

Cercetarea s-a desfășurat în Departamentul de medicină internă al Universității de Stat de Medicină și Farmacie „Nicolae Testemițanu” din Republica Moldova, la baza Spitalului Clinic Republican, secția Gastroenterologie. În studiul dat, de tip prospectiv, au fost incluși, consecutiv, pacienții cu colită ulcerativă care au fost tratați ambulatoriu sau staționar în anul 2015. Comitetul de Etică al USMF „Nicolae Testemițanu” a avizat pozitiv protocolul studiului la data de 03.05.2015 prin procesul-verbal nr. 51. Înainte de înrolarea participanților în studiu, a fost obținut consimțământul lor informat. Pentru fiecare pacient inclus în studiu, a fost completat un formular tipizat (standardizat) de înregistrare a datelor.

La toți pacienții, diagnosticul de colită ulcerativă a fost confirmat după criteriile recomandate de ECCO [19].

Gradul de activitate al CU (severitatea recidivei) a fost determinat conform clasificării modificate Truelove & Witts (Tabelul 1), recomandată de ECCO [19].

**Tabelul 1.** Gradul activității colitei ulcerative după Truelove & Witts.

Indicator	Gradul activității		
	Ușor	Moderat	Sever
Defecații pe zi	<4	≥4, <i>dacă</i>	≥6, <i>dacă</i>
Puls, bpm	<90	≤90	>90, <i>sau</i>
Temperatură, °C	<37,5	≤37,8	>37,8, <i>sau</i>
Hemoglobină, g/l	>115	≥105	<105, <i>sau</i>
VSH, mm/oră sau	<20	≤30	>30, <i>sau</i>
Proteină C-reactivă, mg/l	valori normale	≤30	>30

Extinderea procesului patologic a fost evaluată conform clasificării Montreal, 2005 [20], care include: proctita (extinderea inflamației conform tabloului microscopic, limitată la rect), colita pe stânga (extinderea inflamației distal de flexura lienală), colita extensivă (răspândirea inflamației proximal de flexura lienală).

Prezența și caracterul patologiei ficatului s-au confirmat prin datele de laborator și cele instrumentale. Sindromul citolitic a fost analizat prin dozarea alaninaminotransferazei (ALT), aspartataminotransferazei (AST); sindromul colestatic – prin dozarea bilirubinei cu fracțiile sale, a fosfatazei alcaline și gamaglutamiltranspeptidazei; sindromul hepatopriv – prin dozarea protrombinei și albuminei serice. Pentru precizarea

The novelty of the problem being investigated is also related to the fact that the disease is frequently associated with systemic and extra intestinal manifestations, and other immune diseases. The extra intestinal manifestations and associated diseases are reported with a frequency ranging from 6% to 47%, depending on the disease duration, which greatly influences the quality of life and mortality among patients with IBD [2]. Liver disease is one of the most common associations in IBD, and it occurs in 10-15% of patients [3, 4]. According to Bambha K., primary sclerosing cholangitis (PSC) is more commonly diagnosed in UC than in Crohn's disease (CD). Approximately 2.4-7.5% of UC cases are associated with primary sclerosing cholangitis [5].

### Material and methods

The research was conducted in the Department of Internal Medicine, Gastroenterology unit, within the Republican Clinical Hospital, *Nicolae Testemitanu* State University of Medicine and Pharmacy of the Republic of Moldova. The patients with ulcerative colitis treated in the out-patient or in-patient departments in 2015 were consecutively included in the prospective study. The Ethics Committee of *Nicolae Testemitanu* SUMPh endorsed the study on May 3, 2015, by minutes no. 51. Prior to enrolling participants in the study, their informed consent was obtained. For each patient included in the study, a standardized data entry form was completed.

In all patients, the diagnosis of ulcerative colitis was confirmed by the criteria recommended by ECCO [19].

The activity degree of UC (severity of relapse) was determined according to the modified Truelove & Witts classification (Table 1) recommended by ECCO [19].

**Table 1.** Degree of activity of ulcerative colitis by Truelove & Witts.

Index	Degree of activity		
	Mild	Moderate	Severe
No. of bowel movements per day	<4	≥4, <i>if</i>	≥6, <i>if</i>
Pulse, bpm	< 90	≤90	>90, <i>or</i>
Temperature, °C	<37.5	≤37.8	>37.8, <i>or</i>
Hemoglobin, g/l	>115	≥105	<105, <i>or</i>
ESR, mm/hour	<20	≤30	>30, <i>or</i>
C-reactive protein, mg/l	normal range	≤30	>30

The extent of the pathological process was evaluated according to the Montreal classification, 2005 [20], which includes: proctitis (extent of inflammation according to the macroscopic picture, limited to the rectum), left colitis (extension of inflammation distally to the colic flexure), and extensive colitis (spread of inflammation proximally to the colic flexure).

The presence and character of the liver disease were confirmed by laboratory and instrumental data. The cytolytic syndrome was analyzed by assessment of alanine aminotransferase (ALT), aspartate aminotransferase (AST); the cholestatic syndrome was assessed by bilirubin fractions, alkaline phosphatase and gamma-glutamyltranspeptidase; hepatoprive syndrome was evaluated by prothrombin and serum albumin.

gradului de afectare hepatică, au fost aplicate examinarea ultrasonografică și, după indicații, USG-Doppler a sistemului portal și/sau fibroscan.

Pentru screening-ul infecțiilor cu virusuri hepatice, au fost examinați markerii virali: HBsAg, anti-HBcor, anti-VHC. La subiecții serologic pozitivi, pentru precizarea fazei și activității infecției, a fost utilizată examinarea ADN VHB și/sau ARN VHC. La pacienții cu HBsAg sau cu anti-VHC, a fost aplicat testul cantitativ, iar la cei cu anti-HBcor – testul calitativ.

Grupul de comparație l-au constituit 66283 de donatori de sânge din Republica Moldova, din anul 2015. Datele despre frecvența depistării markerilor virali la donatorii de sânge, care au fost echivalentul populației generale, au fost colectate prin contractul de colaborare cu Centrul Național de Transfuzie a Sângelui.

Materialul acumulat a fost analizat statistic, prin metodele de analiză descriptivă și corelațională, utilizând criteriul Fisher exact și criteriul  $\chi^2$ .

## Rezultate

În total, în studiu au fost incluși 230 de pacienți cu colită ulcerativă confirmată: 145 (63%) femei și 85 (37%) bărbați, cu vârsta cuprinsă între 18 și 81 de ani (vârsta medie –  $43,6 \pm 14,3$  de ani).

La cei 230 de bolnavi de CU, anti-HBcor izolat sau în combinație cu alți markeri ai hepatitei virale B, s-a determinat foarte frecvent – la 47 de pacienți (20,4%), adică, fiecare al 5-lea pacient a avut contact cu infecția VHB (Tabelul 2). La donatorii de sânge, frecvența depistării anti-HBcor a fost de 35,7% ( $p < 0,001$ ).

**Tabelul 2.** Frecvența depistării markerilor hepatitelor virale B și C la pacienții cu colită ulcerativă.

Markerii hepatitelor virale	Grupul de studiu (n=230)	Populația generală (n=66283)	p
Anti-HBcor, în general	47 (20,45%)	23696 (35,70%)	<0,001
Anti-HBcor, izolat	23 (10,0%)	-	NA
Anti-HBcor + anti-HBs	14 (14,0%)	-	NA
HbsAg	10 (4,30%)	901 (1,30%)	<0,001
ADN VHB	11 (4,80%)	-	NA
Anti-VHC	9 (3,90%)	449 (0,70%)	<0,001
ARN VHC	9 (3,90%)	-	NA

Notă: test statistic aplicat – criteriul  $\chi^2$ .

Anti-HBcor izolat a fost depistat la 23 bolnavi (10,0%), iar în combinație cu anti-HBs – la 14 bolnavi (6,1%). Acești indicatori elucidează, foarte probabil, proporția pacienților cu o infecție ocultă și starea după o infecție anterioară cu VHB, respectiv.

HBsAg a fost depistat la 10 (4,3%) pacienți, fiind mai des întâlnit decât la grupul de control (1,3%,  $p < 0,001$ ). La toți acești 10 pacienți, concomitent, s-a detectat anti-HBcor, date ce sunt caracteristice pentru infecția cronică cu VHB. Prezența infecției virale B active la acești pacienți a fost confirmată prin testul pozitiv al ADN VHB, la toți fiind determinat un grad diferit de viremie în sânge.

To determine the degree of liver impairment, the ultrasound examination and, as indicated, the USG-Doppler of the portal system and/or fibroscan, were applied.

For the screening of viral liver infections, the following viral markers were examined: HBsAg, anti-HBcor, anti-HCV. In positive serological subjects, HBV DNA and / or HCV RNA were examined to identify the phase and activity of the infection. In patients with HBsAg or anti-HCV, the quantitative test was applied, while in those with anti-HBcor – the qualitative test was used.

The group of comparison was composed of 66283 blood donors from the Republic of Moldova (2015). The data on the frequency of viral markers detected in blood donors that were equivalent to the general population were collected through a collaboration agreement with the National Blood Transfusion Center.

The accumulated material was analyzed statistically by the descriptive and correlational analysis methods, using the exact Fisher's test or  $\chi^2$  criterion.

## Results

Overall, 230 patients with confirmed ulcerative colitis were enrolled in the study: 145 (63%) women and 85 (37%) men, aged between 18 and 81 years (mean age –  $43.6 \pm 14.3$  years). In 230 patients with UC, anti-HBcor isolated or in combination with other markers of viral hepatitis B was very common – in 47 (20.4%) patients that is every fifth patient had contact with HBV infection (Table 2). In blood donors, the detection rate of anti-HBcor was 35.7% ( $p < 0.001$ ).

**Table 2.** Frequency of detection of viral hepatitis B and C markers in patients with ulcerative colitis

Viral hepatitis markers	Study group (n=230)	General population (n=66283)	p
General anti-HBcor	47 (20.45%)	23696 (35.7%)	<0.001
Isolated anti-HBcor	23 (10.0%)	-	NA
Anti-HBcor + anti-HBs	14 (14.0%)	-	NA
HbsAg	10 (4.3%)	901 (1.3%)	<0.001
HBV DNA	11 (4.8%)	-	NA
Anti-HCV	9 (3.9%)	449 (0.7%)	<0.001
HCV ARN	9 (3.9%)	-	NA

Note: applied statistical test –  $\chi^2$  criterion.

Isolated anti-HBcor was detected in 23 patients (10.0%) and in combination with anti-HBs – in 14 patients (6.1%). These indicators most likely elucidate the proportion of patients with an occult infection and a condition after a previous HBV infection, respectively.

HBsAg was detected in 10 (4.3%) patients, more commonly than in the control group (1.3%,  $p < 0.001$ ). In all of these 10 patients, anti-HBcor was detected concomitantly; these data being characteristic of chronic HBV infection. The presence of active viral B infection in these patients was confirmed by the positive HBV DNA test; all of them being determined to have a different degree of viraemia in the blood.

La cei 230 de bolnavi de CU investigați, anticorpi la virusul hepatitei virale C s-au depistat la 9 pacienți (3,9%), frecvența fiind de 5 ori mai mare, comparativ cu grupul de control (0,7%,  $p < 0,001$ ). Toți pacienții pozitivi la anti-VHC au avut testul pozitiv și la ARN VHC în sânge, fapt ce confirmă prezența unei infecții cronice active.

## Discuții

Asocierea dintre CU și bolile hepatice virale este mai puțin studiată. Rata markerilor VHB și VHC la pacienții cu BII variază foarte mult în funcție de regiune și anii de studii.

Lucrările științifice efectuate în acest domeniu în Europa, până în anul 2000, au elucidat faptul că răspândirea hepatitei virale la bolnavi afectați de CU este mai mare, comparativ cu datele privind populația generală. Astfel, cercetătorul Biancone L. și coaut., în publicația din anul 2001, au determinat că frecvența depistării anti-HBcor la 162 de bolnavi de CU a constituit 11,5%, fiind mai înaltă comparativ cu grupul de control – 5,1% (Tabelul 3).

Alte studii recente, efectuate în Europa de Vest, au elucidat că frecvența depistării markerilor hepatitei virale B la bolnavii care suferă de CU nu diferă de indicatorul din populația generală [7, 9, 10]. Astfel, studiul multicentric, cross-sectiional, efectuat în Spania, a relevat că frecvența de depistare a HBsAg

In 230 investigated patients with UC, viral hepatitis C virus antibodies were detected in 9 patients (3.9%), the frequency being 5 times higher compared to the control group (0.7%,  $p < 0.001$ ). All anti-HCV positive patients tested positive for HCV RNA in the blood, confirming the presence of an active chronic infection.

## Discussion

The association between UC and viral liver disease is less studied. The rate of HBV and HCV markers in patients with IBD varies greatly depending on the region and the years of studies.

The research carried out in this field in Europe before 2000 elucidated that the prevalence of viral hepatitis in patients with UC is higher compared to the general population data. Thus, Biancone L. *et al.*, in 2001, determined that the rate of detection of anti-HBcor in 162 patients with UC was 11.5%, it being higher compared to the control group – 5.1% (Table 3).

Other recent studies carried out in Western Europe have elucidated that the frequency of detection of viral hepatitis B markers in patients with UC does not differ from the general population indicator [7, 9, 10]. Thus, the cross-sectional multicenter study carried out in Spain showed that the detection rate of HBsAg in patients with ulcerative colitis was 0.8% – an

**Tabelul 3.** Frecvența raportată a detectării hepatitelor virale la pacienții cu colită ulcerativă.

**Table 3.** Reported frequency of viral hepatitis detection in patients with ulcerative colitis.

Autori / Authors	Anul / Year Țara / Country	Eșantion / Study group	Rata pacienților cu test pozitiv (%) / Patients' rate with positive test (%)		
			HBsAg	Anti-HBcor total	ADN VHB
<i>Europa / Europe</i>					
Biancone L. <i>et al.</i> [6]	2001	PG <sup>†</sup> (n=250)	0,5	5,1	-
	Italia / Italy	CU <sup>‡</sup> (n=162)	0,6	11,5	-
Loras C. <i>et al.</i> [7]	2009	PG	<1,0	≈10,0	-
	Spania / Spain	CU (n=928)	0,8	8,0	-
Chevaux J. <i>et al.</i> [8]	2010	PG	<1,0	<10,0	-
	Franța / France	CU (n=63)	1,59	12,6	-
Katsanos K. <i>et al.</i> [9]	2010	PG	3,0	-	-
	Grecia / Greece	BII <sup>#</sup> (n=482)	2,3	-	-
Papa A. <i>et al.</i> [10]	2013	PG	<1,0	≈12,0	-
	Italia / Italy	CU (n=117)	0,8	7,7	-
Morisco F. <i>et al.</i> [11]	2013	PG	<1,0	≈12,0	-
	Italia / Italy	CU (n=646)	2,63	-	0,5
<i>America Latină, Asia / Latin America, Asia</i>					
Tolentino Y. <i>et al.</i> [12]	2008	PG	3,0	7,9	-
	Brazilia / Brasil	CU (n=74)	5,4	23,0	0
Kim E. <i>et al.</i> [13]	2013	PG (n=1020)	4,4	35,9	-
	Coreea / Korea	CU (n=272)	3,3	35,2	-
Huang M. <i>et al.</i> [14]	2014	PG	5,5	27,6	-
	Shanghai / Shanghai	CU (n=317)	5,7	41,6	1,4
He Y. <i>et al.</i> [15]	2015	PG	13,8	30,8	-
	China / China	CU (n=226)	16,8	30,1	-
Chan H. <i>et al.</i> [16]	2016	PG	7,0	-	-
	China / China	CU (n=221)	5,0	-	4,3

Notă: <sup>†</sup> – populația generală; <sup>‡</sup> – colită ulcerativă; <sup>#</sup> – boală inflamatorie intestinală.

Note: <sup>†</sup> – general population; <sup>‡</sup> – ulcerative colitis; <sup>#</sup> – inflammatory bowel disease.

la bolnavii cu colită ulcerativă a constituit 0,8% – indicator similar cu datele din populația generală (<1%). În acest studiu nu diferă nici frecvența de depistare a anti-HBcor, fiind de 8%, iar în populație constituind aproximativ 10% [7].

Date contradictorii au fost obținute în diferite studii efectuate în Italia. Papa A. și coaut. (2013) au efectuat, înainte de tratamentul imunosupresiv, screening-ul markerilor hepatitei virale B la 117 pacienți și au depistat HBsAg la 0,8%, anti-HBcor – la 7,7% dintre pacienți [10]. În populația generală, acești indicatori au fost chiar mai mari – aproximativ 1% și 12%, respectiv. Alt studiu din Italia, mai voluminos, publicat în anul 2013, a demonstrat un rezultat opus [11]. La 646 de bolnavi de CU, incluși în cercetare, HBsAg a fost diagnosticat mai frecvent (2,6%) decât în populație (1%). La 0,5% din bolnavi, a fost depistată hepatita B activă cu ADN VHB pozitiv.

O tendință similară a fost observată și în America Latină. În studiul efectuat de brazilieni, frecvența depistării HBsAg la bolnavii afectați de CU a fost semnificativ mai mare, în comparație cu datele din populația generală: 5,4% și 3%, respectiv [12]. O diferență mai mare a fost determinată în prevalența anti-HBcor, aceasta constituind 23,0% la bolnavi și 7,9% – în populație. Republica Moldova face parte din zonele endemice pentru hepatita virală B. Din aceste considerente, prezintă un interes deosebit studiile efectuate în regiunile cu prevalență înaltă de răspândire a virusului hepatitei virale B. Un studiu retrospectiv, asemănător, a fost efectuat de Huang M. și coaut. în Shanghai și publicat în anul 2014 [14]. La 317 bolnavi de CU, frecvența depistării anti-HBcor a constituit 41,6% – un indice foarte mare, semnificativ mult mai mare, comparativ cu datele din populația generală – 27,6%. Frecvența depistării HBsAg la pacienții cu colită ulcerativă (5,7%) nu a fost diferită de cea din populație (5,5%). Cercetările din ultimii ani din alte regiuni ale Chinei și Coreei nu au arătat diferențe semnificative în depistarea frecvenței detectării markerilor hepatitei virale B la bolnavii de CU și în populația generală [13, 15, 16].

Studiile privind prevalența ADN VHB sunt unice și informația, deocamdată, este insuficientă [11, 12, 14, 16]. Frecvența detectării ADN viral în sânge fluctuează de la 0,5%, în cercetarea italiană, până la 4,3% în cea din China. Efectuarea studiilor în acest domeniu este extrem de importantă, deoarece numai depistarea ADN VHB în sânge permite diferențierea infecției active de infecția ocultă și de starea de post-infecție.

Investigațiile în domeniul răspândirii virusului hepatitei virale C la bolnavii cu BII sunt mult mai rare și contradictorii. Rezultatele cercetărilor, efectuate în Italia, în diferite perioade de timp, diferă foarte mult (Tabelul 4). Într-o cercetare anterioară, efectuată de Biancone L. [6], frecvența depistării anti-VHC la bolnavii de CU a constituit 0,6%, fiind semnificativ mai joasă, comparativ cu grupul de control – 5,1%. Iar în studiul efectuat de Bargiggia S. *et al.* [17] și publicat cu patru ani mai târziu, frecvența depistării anti-VHC la pacienții cu colită ulcerativă a fost de 10,9%; în alt studiu, din anul 2013, prevalența raportată a anti-VHC a fost de 4,5% [11], fiind semnificativ mai mare decât în populația Italiei ( $\approx 2,5\%$ ). În aceeași perioadă, în studiul efectuat de Papa A. (2013) [10], în Italia, s-a demonstrat că răspândirea anti-VHC la bolnavii cu BII este chiar mai joasă decât în populație. De asemenea, la cei 117 pacienți

indicator similar cu datele din populația generală (<1%). În acest studiu, frecvența de depistare a anti-HBcor nu diferă, fiind de 8%, în timp ce în populația generală este aproximativ 10% [7].

Controversial data were obtained from different studies carried out in Italy. Papa A. *et al.*, performed the screening of viral hepatitis B markers prior to immunosuppressive treatment in 117 patients and detected HBsAg in 0.8%, anti-HBcor – in 7.7% of patients [10]. In the general population, these indicators were even higher – about 1% and 12%, respectively. Another comprehensive study conducted in Italy, published in 2013, showed an opposite result [11]. In 646 patients with UC included in the research, HBsAg was diagnosed more frequently (2.6%) than in the general population (1%). Active hepatitis B with positive HBV DNA was detected in 0.5% of patients.

A similar trend has also been observed in Latin America. In the Brazilian study, the frequency of HBsAg detection in patients with UC was significantly higher, compared to the general population data: 5.4% and 3%, respectively [12]. A larger difference was determined in the prevalence of anti-HBcor, representing 23.0% in the patients and 7.9% in the general population.

The Republic of Moldova is part of the endemic areas for viral hepatitis B. For these reasons, studies carried out in regions with a high prevalence of viral hepatitis B virus are of particular interest. A similar retrospective study was conducted by Huang M. *et al.* in Shanghai and published in 2014 [14]. In 317 patients with UC, the frequency of anti-HBcor detection was 41.6% – a very high index, significantly higher than that of the general population – 27.6%. The frequency of HBsAg detection in patients with ulcerative colitis (5.7%) was not different from that in the general population (5.5%). Recent research from other regions of China and Korea has shown no significant differences in the frequency of detection of viral hepatitis B markers in the patients with UC and the general population [13, 15, 16].

Studies on the prevalence of HBV DNA are unique and the information is insufficient [11, 12, 14, 16]. The frequency of viral DNA detection in blood fluctuates from 0.5% in the Italian research up to 4.3% in the Chinese research. Carrying out studies in this area is extremely important because only HBV DNA detection in blood allows the active infection to be distinguished from the occult infection and post-infection status.

Investigations into the spread of viral hepatitis C virus in patients with IBD are far rarer and contradictory. The results of the research conducted in Italy at different times vary widely (Table 4).

In a previous study carried out by Biancone L. [6], the frequency of anti-HCV detection in patients with UC was 0.6%, significantly lower than the control group – 5.1%. In the study conducted by Bargiggia S. *et al.* [17], and published four years later, the incidence of anti-HCV detection in patients with ulcerative colitis was 10.9%, while in another study performed in 2013, the prevalence of anti-HCV was 4.5% [11]; it being significantly higher than in the Italian population ( $\approx 2.5\%$ ). At the same time, in the study conducted by Papa A. [10] in Italy, in 2013, it was shown that the spread of anti-HCV in patients

**Tabelul 4.** Frecvența depistării hepatitei virale C la bolnavii de colită ulcerativă.  
**Table 4.** Frequency of viral hepatitis C detection in patients with ulcerative colitis.

Autori / Authors	Anul / Year Țara / Country	Eșantion / Study group	Rata pacienților cu test pozitiv (%) / Patients' rate with positive test (%)	
			Anti-VHC	ARN VHC
<i>Europa / Europe</i>				
Biancone L. et al. [6]	2001	PG <sup>†</sup> (n=250)	5,1	-
	Italia / Italy	CU <sup>‡</sup> (n=162)	0,6	-
Bargiggia S. et al. [17]	2005	-	-	-
	Italia / Italy	CU (n=211)	10,9	-
Papa A. et al. [10]	2013 Italia / Italy	PG	≈2,5	-
		CU (n=117)	0,0	-
		BII <sup>#</sup> (n=301)	1,3	0,33
Morisco F. et al. [11]	2013 Italia / Italy	PG	≈2,5	-
		CU (n=646)	4,5	-
Loras C. et al. [7]	2009 Spania / Spain	PG	≈2,5	-
		CU (n=928)	1,3	-
Chevaux J. et al. [8]	2010 Franța / France	PG	<2,0	-
		CU (n=63)	1,6	-
Katsanos K. et al. [9]	2010 Grecia / Greece	PG	0,5	-
		BII (n=482)	0,8	-
<i>Asia / Asia</i>				
Huang M. et al. [14]	2014 Shanghai / Shanghai	PG	0,4	-
		CU (n=317)	0,3	0,0

Notă: <sup>†</sup>- populația generală; <sup>‡</sup>- colită ulcerativă; <sup>#</sup>- boală inflamatorie intestinală.

Note: <sup>†</sup>- general population; <sup>‡</sup>- ulcerative colitis; <sup>#</sup>- inflammatory bowel disease.

cu colită ulcerativă, Papa A. nu a depistat niciun caz de hepatită virală C. Datele asemănătoare privind faptul că răspândirea infecției virale C la bolnavii de CU este mai mică, comparativ cu populația generală, au fost obținute în studiul multicentric al grupului de cercetare, condus de Loras C, efectuat în Spania [7] și în cercetarea din Franța [8]. Rezultatele cercetărilor realizate în Grecia și China, publicate în anii 2010-2014, au arătat că prevalența anti-VHC la bolnavii de CU și în populația generală este similară [9, 14].

Așadar, răspândirea infecțiilor cu VHB și VHC la bolnavii de BII diferă semnificativ, regional. Frecvența acestor infecții la pacienții din Europa de Vest este similară cu datele generale din populație; în acest context, experții nu consideră bolnavii de CU și BC ca grup de risc pentru hepatitele virale [18]. Situația este alta în regiunile endemice pentru hepatita virală B, la care se referă și Republica Moldova. În aceste regiuni, sunt necesare investigații suplimentare, iar rezultate obținute sunt foarte importante pentru elaborarea ghidului național și celui regional pentru screening-ul hepatitelor virale B și C la pacienții cu boală inflamatorie intestinală.

Așadar, în acest studiu, a fost constatat un nivel înalt de răspândire al hepatitelor virale active B și C la bolnavii de CU, care depășește semnificativ indicele din populația generală. Datele noastre confirmă veridicitatea altor rezultate, efectuate din zonele endemice ale hepatitelor [12, 14, 17]. Această situație ne dictează includerea bolnavilor de CU în grupele de risc al infecției cu VHB și VHC.

with IBD is even lower than in the general population. In addition, in 117 patients with ulcerative colitis, Papa A. did not detect any cases of viral hepatitis C.

The research conducted by Loras C. in Spain [7] and France obtained similar data in the multicenter study, regarding the lower spread of viral C infection in patients with UC compared to the general population [8]. The results of the research conducted in Greece and China, published in 2010-2014, showed that the prevalence of anti-HCV in patients with UC and the general population is similar [9, 14].

Thus, the spread of HBV and HCV infections in patients with IBD significantly differs regionally. The frequency of these infections in patients in Western Europe is similar to general population data. In this context, experts do not consider patients with UC and CD as a risk group for viral hepatitis [18]. The situation is different in the endemic regions for viral hepatitis B, to which the Republic of Moldova also refers. Additional investigations are needed in these regions, and the results obtained are very important for the development of the national and regional guide for the screening of viral hepatitis B and C in patients with intestinal inflammatory disease.

Therefore, in this study, a high level of viral hepatitis B and C spread was detected in patients with UC, significantly exceeding the index of the general population. Our data confirm the veracity of other outcomes from the endemic regions of hepatitis [12, 14, 17]. This situation dictates the inclusion of patients with UC in the risk groups of HBV and HCV infection.



## Concluzii

- 1) Nivelul răspândirii diferitor forme de infecție cu VHB în rândul bolnavilor de colită ulcerativă din Republica Moldova este foarte mare – 20,4%; la 4,3% dintre pacienți se depistează infecția cronică activă.
- 2) Printre bolnavii de CU, infecția cronică cu VHC este diagnostică mai frecvent, comparativ cu populația generală: 3,9% și 0,7%, respectiv.
- 3) Bolnavii de CU din Republica Moldova se includ în grupul de risc pentru hepatitele virale B și C; în acest context, toți pacienții ar trebui să fie testați la markerii virali și să beneficieze de vaccinare, conform indicațiilor.

## Declarația de conflict de interes

Autorii declară lipsa conflictului de interes.

## Contribuția autorilor

AJ, SȚ au inițiat studiul, elaborând designul cercetării. AJ a colectat materialul primar. Analiza statistică a materialului și perfectarea manuscrisului a fost efectuată de AJ, SȚ. Manuscrisul final a fost aprobat de ambii autori.

## Referințe / references

1. Taras E., Țurcan V., Țurcan S. Creșterea indicilor epidemiologici ai bolilor inflamatorii intestinale în Republica Moldova. *Sănătate publică, economie și management în medicină*. Chișinău, 2015; 4 (61): 22-24.
2. Vavrika S., Brun L., Ballabeni P. *et al.* Extra intestinal manifestations of inflammatory bowel disease. *Inflamm. Bowel Disease*, 2015; 21: 1982-1992.
3. Țurcan S. Colita ulceroasă. Centrul Editorial-Poligrafic Medicina. Chișinău, 2012, 192 p.
4. Jucov A., Țurcan S. Dinamica frecvenței și spectrului patologiei hepatice la pacienții cu colită ulcerativă pe parcurs de 15 ani în Republica Moldova. *Sănătate publică, economie și management în medicină*. Chișinău, 2016; 4 (68): 16-18.
5. Bambha K., Kim W., Talwalkar J. *et al.* Incidence, clinical spectrum, and outcomes of primary sclerosing cholangitis in a United States community. *Gastroenterology*, 2003; 125: 1364-1369.
6. Biancone L., Pavia M., Del Vecchio Blanco G. *et al.* Hepatitis B and C virus infection in Crohn's disease. *Inflamm. Bowel Dis.*, 2001; 7: 287-294.
7. Loras C., Saro C., Gonzalez-Huix F. *et al.* Prevalence and factors related to hepatitis B and C in inflammatory bowel disease patients in Spain: a nationwide, multicenter study. *Am. J. Gastroenterol.*, 2009; 104: 57-63.
8. Chevaux J., Nani A., Oussalah A. *et al.* Prevalence of hepatitis B and C and risk factors for non vaccination in inflammatory bowel disease patients in Northeast France. *Inflamm. Bowel Dis.*, 2010; 16: 916-924.
9. Katsanos K., Tsianos V., Zois C. *et al.* Inflammatory bowel disease and hepatitis B and C in Western Balkans: a referral centre study and review of the literature. *J. Crohns Colitis*, 2010; 4: 450-465.
10. Papa A., Felice C., Marzo M. *et al.* Prevalence and natural history of hepatitis B and C infections in a large population of IBD patients treated with anti-tumor necrosis factor- $\alpha$  agents. *J. Crohns Colitis*, 2013; 7: 113-119.
11. Morisco F., Castiglione F., Rispo A. *et al.* Effect of immunosuppressive therapy on patients with inflammatory bowel diseases and

## Conclusions

- 1) The level of spread of different forms of HBV infection among patients with ulcerative colitis in the Republic of Moldova is very high – 20.4%; 4.3% of patients are diagnosed with active chronic infection.
- 2) Chronic HCV infection is more frequently diagnosed among patients with UC compared to the general population: 3.9% and 0.7%, respectively.
- 3) People with UC in the Republic of Moldova are included in the risk group for viral hepatitis B and C; and in this context, all patients should be tested for viral markers and receive vaccination as directed.

## Declaration of conflicting interests

The authors declare no conflict of interest.

## Contribution of authors

AJ, ST initiated the study, elaborating the research design. AJ collected the primary material. The statistical analysis of the material and the manuscript compiling were carried out by AJ and ST. The final manuscript was approved by both authors.

- hepatitis B or C virus infection. *J. Viral Hepat.*, 2013; 20: 200-208.
12. Tolentino Y., Fogaca H., Zaltman C. Hepatitis B virus prevalence and transmission risk factors in inflammatory bowel disease patients at Clementino Fraga Filho university hospital. *World J. Gastroenterol.*, 2008; 14 (20): 3201-3206.
13. Kim E., Cho K., Kim E. *et al.* Prevalence of hepatitis B viral markers in Korea patients with inflammatory bowel diseases: ineffective antibody formation in young patients. *J. Crohns Colitis*, 2013; 7, suppl. 1: S77.
14. Huang M., Xu X., Shen J. *et al.* Prevalence and factors related to hepatitis B and C infection in inflammatory bowel disease patients in China: a retrospective study. *J. Crohns Colitis*, 2014; 8: 282-287.
15. He Y., Xu P., Chen Y. *et al.* Prevalence and influence of hepatitis B virus infection on inflammatory bowel disease: a retrospective study in southern China. *Int. J. Clin. Exp. Med.*, 2015; 8 (5): 8078-8085.
16. Chan H., Wong V., Wong G. *et al.* Prevalence of hepatitis B and clinical outcomes in inflammatory bowel disease patients in a viral-endemic region. *BMC Gastroenterol.*, 2016; 16: 1-8.
17. Bargiggia S., Thorburn D., Anderloni A. Is interferon-alfa therapy safe and effective for patients with chronic hepatitis C and inflammatory bowel disease? A case-control study. *Aliment. Pharmacol. Ther.*, 2005; 22 (3): 209-215.
18. Rahier J., Ben-Horin S., Chowers Y. *et al.* European evidence-based Consensus on the prevention, diagnosis and management of opportunistic infections in inflammatory bowel disease. *J. Crohns Colitis*, 2009; 3: 47-91.
19. Dignass A., Eliakim R., Magro F. *et al.* Second European evidence-based consensus on the diagnosis and management of ulcerative colitis. Part 1: Definitions and diagnosis. *J. Crohn's and Colitis*, 2012; 6 (10): 965-990.
20. Silverberg M., Satsangi J., Ahmad T. *et al.* Toward an integrated clinical, molecular and serological classification of inflammatory bowel disease: report of a working party of the 2005 Montreal World Congress of Gastroenterology. *Can. J. Gastroenterol.*, 2005; 19 (Suppl A): 5-36.

ARTICOL DE CERCETARE

## Aspectele clinice, microbiologice și eficacitatea tratamentului tuberculozei pulmonare rezistente: studiu retrospectiv, comparativ, pe serie de cazuri

Alina Malic<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>*Catedra de pneumoftiziologie, Universitatea de Stat de Medicină și Farmacie „Nicolae Testemițanu”, Chișinău, Republica Moldova.*

Data primirii manuscrisului: 05.04.2017  
Data acceptării spre publicare: 02.06.2017

### Autor corespondent:

Alina Malic, asistent universitar  
Catedra de pneumoftiziologie  
Universitatea de Stat de Medicină și Farmacie „Nicolae Testemițanu”  
bd. Ștefan cel Mare și Sfânt, 165, Chișinău, Republica Moldova, MD-2004  
e-mail: alina.malic@usmf.md

### Ce nu este cunoscut, deocamdată, la subiectul abordat

În cazul utilizării metodei molecular-genetice (testul *Xpert MTB/RIF*) de diagnostic al tuberculozei, nu au fost descriși, deocamdată, parametri de eficacitate a tratamentului, precum și particularitățile clinice ale bolii.

### Ipoteza de cercetare

Utilizarea testului *Xpert MTB/RIF* oferă posibilitatea instituirii rapide a unui tratament mai exact, comparativ cu metoda tradițională, culturală, de diagnostic a tuberculozei.

### Noutatea adusă literaturii științifice din domeniu

Testul *Xpert MTB/RIF*, datorită rapidității stabilirii diagnosticului de tuberculoză și identificării rezistenței la rifampicină, permite inițierea unui tratament semnificativ mai rapid, cu o rată de succes mai înaltă, comparativ cu metoda tradițională, culturală.

### Rezumat

**Introducere.** Utilizarea metodelor moleculare rapide pentru detectarea rezistenței la medicamente, inclusiv testul *Xpert MTB/RIF*, este esențială pentru inițierea cât mai precoce a unui tratament adecvat al pacienților cu tuberculoză și pentru limitarea transmiterii, în continuare, a tuberculozei multi-drogrezistente (TB MDR).

**Material și metode.** Studiu retrospectiv, comparativ, pe serie de cazuri de tuberculoză pulmonară rezistentă. Eșantionul

RESEARCH ARTICLE

## Clinical, microbiological particularities and treatment effectiveness of resistant pulmonary tuberculosis: retrospective, comparative, case series study

Alina Malic

<sup>1</sup>*Chair of pneumophthysiology, Nicolae Testemitanu State University of Medicine and Pharmacy Chisinau, Republic of Moldova.*

Manuscript received on: 05.04.2017  
Accepted for publication on: 02.06.2017

### Corresponding author:

Alina Malic, assistant professor  
Chair of pneumophthysiology  
Nicolae Testemitanu State University of Medicine and Pharmacy  
165, Ștefan cel Mare și Sfânt ave., Chisinau, Republic of Moldova, MD-2004  
e-mail: alina.malic@usmf.md

### What is not known yet, about the topic

Parameters of treatment efficacy, as well as clinical peculiarities of the disease have not been yet described in cases when *Xpert MTB/RIF* molecular-genetic diagnostic test was used.

### Research hypothesis

The *Xpert MTB/RIF* test offers the possibility of rapid establishment of an exact treatment plan, compared with the traditional cultural diagnostic method of tuberculosis.

### Article's added novelty on the scientific topic

Due to short time required for diagnosis establishment of tuberculosis and detection of rifampicin resistance, the *Xpert MTB/RIF* allows to rapidly start the treatment, with higher success rates, when compared to the traditional cultural method.

### Abstract

**Introduction.** The use of rapid molecular methods for drug resistance detection, including the *Xpert MTB/RIF* test, is essential for early initiation of appropriate tuberculosis treatment and for limiting of continued multi-drug resistant tuberculosis (MDR TB) transmission.

**Material and methods.** A retrospective, comparative study of case series with resistant pulmonary TB. Group 1 – 85 patients with positive resistant test; group 2 – 150 patients with

1 ( $n=85$ ), bolnavi de TB MDR, cu rezultatul testului Xpert MTB pozitiv/RIF rezistent; eşantionul 2 ( $n=150$ ), bolnavi de TB MDR, cu rezultatul culturii rezistente. Comparate duratele de diagnostic, de tratament, factorii de risc pentru rezistență. Datele sunt prezentate sub formă de valori absolute și relative, sau, după caz – drept medie și interval de încredere de 95%. Statistică: testul exact Fisher.

**Rezultate.** Comun pentru ambele eşantioane a constituit: vârsta adultului tânăr, abuzul de alcool, contactul tuberculos intradomiciliar, fiecare al doilea bolnav fiind depistat prin cale pasivă, procese tuberculoase radiologice bilaterale, extinse, în fază de destrucție. Specific bolnavilor cu TB MDR, depistați prin testul *Xpert MTB pozitiv/RIF rezistent*: stabilirea timpurie a diagnosticului și a tratamentului; microscopic, conversia sputei a fost obținută, mai frecvent, în primele 3 luni. S-a constatat o rată sporită de succes al tratamentului TB MDR.

**Concluzii.** (1) Testul *Xpert MTB/RIF* posedă o sensibilitate și specificitate mai înaltă vs. metoda microscopică și culturală în diagnosticarea TB MDR și a rezistenței la rifampicină. (2) Rata succesului tratamentului în eşantionul Xpert MTB/RIF a fost mai înaltă, datorită inițierii mult mai precoce a tratamentului.

**Cuvinte cheie:** test *Xpert MTB/RIF*, metoda culturală, tuberculoza multidrogrezistentă.

## Introducere

Tuberculoza este una dintre cele mai importante provocări pentru ocrotirea sănătății oricărui stat. Începând cu anul 1993, Organizația Mondială a Sănătății (OMS) a declarat tuberculoza o urgență globală [1]. În țările Europei de Est și Asiei Centrale, rata tuberculozei multidrog rezistente (TB MDR) rămâne a fi cea mai înaltă. Republica Moldova se află printre cele 30 de țări cu povară înaltă a TB MDR. În 2014, în Republica Moldova, OMS a estimat 24% de cazuri noi și 62% de cazuri de tratament repetat a TB MDR. Depistarea precoce a cazurilor de TB, în special, de TB MDR, reprezintă una dintre cele mai relevante acțiuni de control asupra tuberculozei. Metodele culturale rămân standardul de aur pentru diagnosticul tuberculozei pulmonare. Microscopia convențională, care este utilizată pentru identificarea bacilului acidorezistent (BAAR), este primul pas în algoritmul de detectare a tuberculozei. Utilizarea testelor moleculare rapide pentru detectarea rezistenței la medicamente, cum ar fi *Xpert MTB/RIF*, este esențială pentru inițierea cât mai precoce a unui tratament adecvat al pacienților cu tuberculoză și pentru limitarea transmiterii în continuare a TB MDR [2]. OMS a stabilit recomandări condiționale pentru utilizarea *Xpert MTB/RIF* la adulți, copii și persoanele cu HIV, care sunt suspecți pentru TB (nu neapărat TB MDR), sau pentru testarea specimenelor extrapulmonare, care vizează diagnosticul de TB extrapulmonară [3, 4].

Steingart K. și coaut. (2013) [5] au analizat o bază de date pentru determinarea acurateței testului *Xpert MTB/RIF*. Sensibilitatea combinată (15 studii, 7517 de participanți) a testului *Xpert MTB/RIF* dintr-o singură probă de spută a constituit 88% și specificitatea – 98%. Sensibilitatea la pacienții cu

MDR TB, with resistant culture lab results. Diagnostic and treatment duration were compared, as well as risk factors for resistance. Data are presented in absolute and relative values, and, when needed – in mean values and 95% confidence intervals. Statistics: Fisher's exact test.

**Results.** Common for both groups were: young adult age, alcohol abuse, tuberculous household contact (every second patient was passively detected), extended and bilateral destructive TB processes. Specific for MDR TB patients diagnosed with the *Xpert MTB positive / RIF resistant* test was: early detection of MDR TB and early initiation of the treatment, sputum conversion was more frequently obtained in the first 3 months.

**Conclusions.** (1) The *Xpert MTB/RIF* test has a higher sensibility and specificity vs. the microscopic and cultural method of MDR TB diagnosis and rifampicin resistance. (2) The rate of treatment success among patients from the *Xpert MTB/RIF* group was higher, due to earlier initiation of treatment.

**Key words:** *Xpert MTB/RIF* test, cultural method, multi-drug resistant tuberculosis.

## Introduction

Tuberculosis is one of the most important challenges for any state health care system. Since 1993, the World Health Organization (WHO) has declared tuberculosis a global emergency [1]. In the countries of Eastern Europe and Central Asia the multidrug resistant tuberculosis (MDR TB) rate remains the highest. The Republic of Moldova is a country among top 30 countries with a high burden of MDR TB. WHO in 2014 in the Republic of Moldova estimated 24% of new cases and 62% of retreatment cases of MDR TB. One of the most relevant tuberculosis control actions is the early detection of TB cases, especially MDR TB cases. Cultural methods remain the gold standard in the diagnosis of pulmonary tuberculosis. Conventional microscopy, which uses AFB (Acid-Fast Stain), is the first step in the tuberculosis detection algorithm. The use of rapid molecular testing for drug resistance detection such as *Xpert MTB/RIF* is essential for early initiation of appropriate treatment of tuberculosis patients and to limit the further spread of multidrug resistant TB [2]. WHO has established conditional recommendations for the use of *Xpert MTB/RIF* in adults, children and persons living with HIV who are suspected for TB (not MDR TB in particular), or for testing of extra-respiratory specimens targeting the diagnosis of extrapulmonary TB [3, 4].

Steingart K. *et al.* (2013) [5], analyzed through the means of a data base the accuracy of the *Xpert MTB/RIF* test. The combined sensitivity (15 studies, 7517 participants) of the *Xpert MTB/RIF* test from a single sputum sample constituted 88% and the specificity was 98%. Among people living with HIV, the cumulative sensitivity was 80%, and in those without

frotiul pozitiv a fost de 98%. Printre persoanele care trăiesc cu HIV, sensibilitatea cumulată a fost de 80%, iar la cei fără infecție HIV, aceasta a fost de 89% [6]. Un număr mare de studii a fost realizat în țările cu venituri mici și medii; dezavantajul lor a fost efectuarea mai frecventă a testului *Xpert MTB/RIF* în laboratoare de referință, decât în laboratoare periferice sau în alte structuri medicale [5].

Elaborarea unui algoritm rațional de management pentru pacienții identificați prin testarea *Xpert MTB/RIF* cu rezistență la rifampicină (RR), reprezintă o provocare deosebit de importantă, deoarece depistarea RR impune inițierea precoce a tratamentului pentru TB MDR, care va contribui la reducerea riscului de transmitere a infecției și va spori rata succesului terapeutic. Pe de altă parte, efectuarea metodei culturale convenționale rămâne în vigoare [7].

În timp ce testul *Xpert MTB/RIF* reprezintă un progres major, comparativ cu microscopia convențională, costul mare al investigației reprezintă un obstacol în procesul de implementare pe scară largă. Există doar un număr mic de studii, care au confirmat avantajul diagnosticului precoce și durata redusă a tratamentului [8-11]. Micșorarea ratei mortalității, scăderea costurilor asociate cu spitalizarea și, poate, cel mai important, reducerea transmiterii tuberculozei (în special, TB MDR), sunt factorii potențial eficienți [7].

*Xpert MTB/RIF* este un test rapid, automatizat, care poate detecta atât TB, cât și rezistența la rifampicină, în timp real, în termen de două ore, cu implicarea minimă a personalului medical, însă este mult mai costisitor decât microscopia convențională [12].

## Material și metode

Lucrarea reprezintă un studiu retrospectiv, selectiv și descriptiv care a fost efectuată conform modelului liniar. Scopul studiului a fost studierea aspectelor clinice și a eficacității tratamentului bolnavilor de tuberculoză pulmonară în dependență de rezultatele metodelor molecular-genetice și microbiologice. A fost efectuată o cercetare documentată privind cazurile noi de tuberculoză pulmonară investigate și tratate în cadrul Spitalului Clinic Municipal de Ftizio pneumologie, mun. Chișinău, în perioada 01.01.2010-31.12.2014.

Criteriile de includere au constituit:

- vârsta peste 18 ani;
- caz nou de tuberculoză pulmonară MDR (caz nou – pacient, care nu a fost tratat cu remedii antituberculoase sau a fost tratat mai puțin de 1 lună);
- rezultatul *Xpert MTB* pozitiv/RIF rezistent, pentru pacienții eșantionului 1;
- rezultatul culturii rezistente, pentru pacienții eșantionului 2.

Criteriile de excludere au fost următoarele:

- cazuri de retratament (recidivă, eșec terapeutic, pierdut din supraveghere);
- alte rezultate ale testului *Xpert MTB/RIF* (negativ, sensibil);
- alte rezultate ale metodei culturale (negativ, sensibil, monorezistență, polirezistență).

HIV infecția a fost de 89% [6]. Several studies have been conducted in low and middle income countries; a disadvantage of these studies is that the *Xpert MTB/RIF* test was performed in the reference laboratories more frequently than in peripheral laboratories or other medical facilities [5].

Developing a rational management algorithm for patients identified with RR TB (rifampicin resistant tuberculosis) by the means of *Xpert MTB/RIF* test is a special challenge, because the detection of RR contributed to the early treatment start, which helps to reduce the risk of infection transmission and increase the therapeutic success rate. On the other hand, the conventional cultural method remains valid [7].

While the *Xpert MTB/RIF* test represents a major breakthrough compared to conventional microscopy, its high cost is a major obstacle to the widespread use of the test. There is only a small number of studies that confirmed the benefit of early diagnosis and the reduced duration of treatment [8-11]. Decreasing the mortality rate, lowering the costs associated with hospitalization and, most importantly, reducing the transmission of tuberculosis (especially MDR TB) are potentially effective factors [7].

*Xpert MTB/RIF* is a rapid, automated test that can detect both TB and resistance to rifampicin in real time within two hours, with minimal involvement of medical staff, but is much more costly than conventional microscopy [12].

## Material and methods

The research is a retrospective, selective and descriptive study, which was conducted according to the linear model. The aim was to study the clinical aspects and the efficacy of the treatment of patients with pulmonary tuberculosis in dependence on the results of the molecular-genetic and microbiological methods. A documented research has been carried out on new cases of pulmonary tuberculosis investigated and treated within the Municipal Clinical Hospital of Phthysio-pneumology, Chisinau, during 01.01.2010 – 31.12.2014.

The inclusion criteria were:

- age above 18 years;
- new case of MDR pulmonary tuberculosis (new case – patient not treated or treated less than 1 month with anti-tuberculous remedies);
- *Xpert MTB* positive/RIF resistant result, for patients from 1<sup>st</sup> group;
- culture resistant result, for patients from 2<sup>nd</sup> group.

The exclusion criteria were:

- retreatment cases (relapse, treatment failure, lost to follow-up);
- other results of *Xpert MTB/RIF* test (negative, sensitive);
- other results of culture method (negative, sensitive, monoresistance, polyresistance).

Were selected 235 clinical cases, which met the inclusion and exclusion criteria. In order to describe, analyze and compare the clinical and paraclinical particularities of pulmonary tuberculosis, depending on the results of the molecular-ge-

Au fost selectate 235 de cazuri clinice, care au corespuns criteriilor de includere și excludere. Pentru a descrie, a analiza și compara particularitățile clinice și paraclinice ale tuberculozei pulmonare în funcție de rezultatele metodei molecular-genetice, pacienții au fost distribuiți în 2 eșantioane: eșantionul 1 – de 85 pacienți, care au fost incluși în tratamentul tuberculozei MDR după obținerea rezultatului metodei molecular-genetice (*Xpert MTB pozitiv/RIF rezistent*) și eșantionul 2 – 150 de bolnavi, care au urmat tratamentul pentru TB MDR după primirea rezultatului metodei culturale.

## Rezultate

În eșantionul bolnavilor cu rezultatul *Xpert MTB pozitiv/RIF rezistent*, au predominat persoanele de gen masculin – 60 (70,6%) de cazuri, raportul bărbați/femei fiind de 2,4/1. La pacienții incluși în studiu după rezultatul culturii rezistente, distribuția după gen a fost similară, cu predominarea bărbaților – 107 (71,3%) de cazuri și raport bărbați/femei – de 2,5/1.

Distribuind pacienții pe grupuri de vârstă, după criteriile recomandate de OMS, s-a stabilit predominarea în eșantionul cu rezultatul *Xpert MTB pozitiv/RIF rezistent* al bolnavilor din grupul de vârstă 35-44 de ani, 23 (27,1%) de cazuri, care au prezentat 1/4 din acest eșantion. Eșantionul cu rezultatul culturii rezistent, a fost similar, majoritar prezentat din pacienții din grupul de vârstă 35-44 de ani, 43 (28,7%) de cazuri.

Fiecare al 4-lea pacient a fost migrant: 39 (26,0%) de cazuri – în eșantionul cu cultura rezistentă și 22 (25,9%) de cazuri – în eșantionul cu rezultatul *Xpert MTB pozitiv/RIF rezistent*.

La persoanele cu tuberculoză rezistentă, din ambele eșantioane, au fost depistați următorii factorii de risc: istoric de detenție, etilism cronic și utilizarea intravenoasă a drogurilor. Diferențele dintre eșantioane nu au atins pragul de semnificație statistică. Totodată, consumul abuziv de alcool a fost apreciat, mai frecvent, la pacienții cu rezultatul culturii rezistente. Fumatul a fost constatat, în egală măsură, în ambele eșantioane (Tabelul 1).

**Tabelul 1.** Repartizarea cazurilor conform factorilor de risc.

Grupuri de risc	Xpert poz/RIF rez (n=85)		Cultură rezistentă (n=150)		p
	abs	%	abs	%	
Migranții	22	25,9	39	26,0	0,13
Foști deținuți	13	15,3	28	18,7	0,12
Fumători	63	74,1	117	7,0	0,10
Abuz de alcool	47	55,3	98	65,3	0,07
Utilizatori droguri i.v.	4	4,7	3	2,0	0,16

Notă: aplicat testul statistic Fisher exact.

Factorul de risc epidemiologic major de îmbolnăvire de tuberculoză reprezintă contactul tuberculos. La bolnavii din eșantionul cu rezultatul *Xpert MTB pozitiv/RIF rezistent*, un contact tuberculos a fost stabilit în 25 (29,4%) de cazuri, dintre care, un contact intradomiciliar au avut 11 (44,0%) pacienți, iar 14 (56,0%) – au fost în contact apropiat cu rude, cunoscuți, prieteni sau cu colegii, la locul de muncă. La pacienții

netic method, the patients were distributed in two groups: 1<sup>st</sup> group – 85 patients who were included in the MDR TB treatment after the molecular-genetic result (*Xpert MTB pozitiv/resistant RIF*) and 2<sup>nd</sup> group – 150 patients who started their treatment after the results of the cultural method.

## Results

In the group of patients with the positive *Xpert MTB/RIF resistant* males predominate – 60 males (70.6%), males/females ratio – 2.4/1. Among patients included in the investigation, according to the result of resistant culture, gender distribution was similar: males – 107 (71.3%) cases, males/females ratio – 2.5/1.

Distributing the patients into the age groups according to criteria recommended by WHO, in the group with positive *Xpert MTB/RIF resistant* result it was revealed that patients of 35-44 y.o. predominate, 23 (27.1%) cases, that made 1/4 of this group. In the group with the resistant result of the culture the majority was also represented by the patients with the age between 35 and 44 years old, 43 (28.7%) cases.

It was established that about every 4<sup>th</sup> the patients was a migrant: 39 (26%) cases in the group with the resistant culture, and 22 (25.9%) cases in the group with positive *Xpert MTB/RIF resistant* result were.

The following risk factors were found in patients with resistant TB, from both groups: imprisonment, chronic alcoholism, intravenous use of drugs. Statistically significant differences were not revealed. Meanwhile, abusive consumption of alcohol was more frequently found in the patients with the resistant result of the culture. Smoking was revealed in an equal measure among the investigated patients in both groups (Table 1).

**Table 1.** Distribution of cases according to risk factors.

Risk groups	Xpert pos/RIF res (n=85)		Resistant culture (n=150)		p
	abs	%	abs	%	
Migrants	22	25.9	39	26.0	0.13
Former prisoners	13	15.3	28	18.7	0.12
Smokers	63	74.1	117	7.0	0.10
Alcohol abuse	47	55.3	98	65.3	0.07
IV drug users	4	4.7	3	2.0	0.16

Note: Fisher's exact test was applied.

The major epidemiologic risk factor of falling ill with tuberculosis is tuberculosis contact. It was revealed that in the group with positive *Xpert MTB/RIF resistant* result, the number of the patients that had a TB contact was 25 (29.4%), 11 (44.0%) of which had household contact and 14 (56.0%) were in contact with relatives, acquaintants, friends, coworkers. The patients from the group with resistant culture were in contact with TB in 68 (45.3%) cases, out of them prevailed close contacts in 41 (60.3%) cases, contact in the family in 27 (39.7%) cases.

eșantionului cu cultură rezistentă, contactul tuberculos a fost stabilit în 68 (45,3%) de cazuri, dintre care, au predominat cei cu contactul apropiat – 41 (60,3%) de cazuri. Un contact intra-domiciliar a fost stabilit la 27 (39,7%) dintre pacienți.

Pentru aprecierea factorilor de risc și influența lor asupra dezvoltării tuberculozei active, a fost calculat riscul relativ (RR). Conform datelor prezentate în Tabelul 2, s-a constatat că pentru persoanele cu TB MDR, cel mai mare risc pentru dezvoltarea tuberculozei l-a prezentat fumatul.

**Tabelul 2.** Factorii de risc pentru dezvoltarea tuberculozei active multidrog rezistente.

Factori de risc	Riscul Relativ
Fumatul	3,913 (0,298 – 0,669)
Comorbidități somatice	1,659 (1,561 – 3,563)
Abuz de alcool	1,112 (0,346 – 0,718)
Contact TB	0,699 (2,485 – 5,454)
Detinut	0,222 (0,548 – 1,756)
Migrant	0,119 (2,402 – 16,891)
Utilizatori droguri i.v.	0,0032 (0,97 – 65,201)

Notă: datele sunt prezentate drept medie și interval de încredere de 95%.

Metoda pasivă a predominat la depistarea pacienților cu tuberculoză în ambele eșantioane. La bolnavii cu *Xpert pozitiv/RIF rezistent*, prin calea pasivă au fost depistate 68 (80,0%) de cazuri, iar prin calea activă – 17 (20,0%). În eșantionul cu cultură rezistentă, prin adresare (calea pasivă), au fost depistați 115 (76,7%) pacienți, iar prin control profilactic (calea activă) – 35 (23,3%) bolnavi.

Conform formelor clinice ale tuberculozei, în ambele eșantioane au predominat pacienții cu tuberculoză pulmonară infiltrativă: 75 (88,2%) de pacienți cu rezultatul *Xpert MTB pozitiv/RIF rezistent* și 137 (91,3%) de bolnavi cu cultură rezistentă. Tuberculoza pulmonară diseminată a fost stabilită la 6 (7,2%) persoane din eșantionul cu rezultatul *Xpert MTB pozitiv/RIF rezistent* și la 7 (4,7%) pacienți cu cultură rezistentă. Cu tuberculoză pulmonară nodulară, au fost înregistrați mai mulți pacienți în eșantionul cu cultură rezistentă – 5 (3,3%), pe când în eșantionul cu *Xpert MTB pozitiv/RIF rezistent* – în 2 (2,3%) cazuri. Tuberculoza pulmonară fibro-cavitară a fost identificată la 2 (2,3%) bolnavi cu rezultatul *Xpert MTB pozitiv/RIF rezistent* și la 1 (0,7%) pacient – cu rezultatul culturii rezistente. Diferențele între eșantioane nu au fost statistic semnificative.

Studiind aspectele radiologice, s-a constatat că procesul tuberculos în fază distructivă a predominat la bolnavii eșantionului cu rezultatul culturii rezistent. La pacienții cu *Xpert pozitiv/RIF rezistent*, au predominat procese bilaterale – 133 (88,7%) de cazuri și extinse – 136 (90,7%) de cazuri. O repartizare similară a manifestărilor procesului tuberculos a fost înregistrată la bolnavii cu cultură rezistentă: proces bilateral – la 74 (87,1%) de pacienți și un proces extins – în 80 (94,1%) dintre cazuri.

În eșantioanele studiate, au predominat pacienții cu micro-

In order to assess the risk factors and their influence on the development of active tuberculosis, Relative Risk (RR) was calculated. According to data presented in Table 2, it was found that for MDR TB patients, the highest risk for the development of TB was smoking.

**Table 2.** Risk factors for active MDR TB development.

Risk factors	Relative risk
Smoking	3.913 (0.298 – 0.669)
Comorbidities (somatic)	1.659 (1.561 – 3.563)
Alcohol abuse	1.112 (0.346 – 0.718)
TB contact	0.699 (2.485 – 5.454)
Former prisoner	0.222 (0.548 – 1.756)
Migrant	0.119 (2.402 – 16.891)
IV drug user	0.0032 (0.97 – 65.201)

Note: data are presented as mean values and 95% confidence intervals.

Passive way of detection of tuberculosis prevails in both groups. Among patients with the *positive Xpert MTB/RIF resistant* results, 68 (80.0%) patients were revealed passively, and only 17 (20.0%) patients – actively. In the group with resistant culture 115 (76.7%) patients were revealed during self-show, during prophylactic control – 35 (23.3%) patients.

In both groups, patients with infiltrative tuberculosis prevailed: 75 (88.2%) patients with *Xpert MTB positive/RIF resistant* result and 137 (91.3%) patients with resistant culture. Disseminated pulmonary tuberculosis was established in 6 (7.2%) patients in the *Xpert MTB positive/RIF resistant* group and in 7 (4.7%) patients with resistant culture results. Nodular pulmonary tuberculosis was recorded in the group with resistant culture result – in 5 (3.3%) patients, and in the group with *Xpert MTB positive/RIF resistant* – in 2 (2.3%) cases. Fibro-cavitary pulmonary tuberculosis was identified in 2 (2.3%) patients with *Xpert MTB positive/RIF resistant* result and in 1 (0.7%) patient with resistant culture result. Differences between groups were not statistically significant.

Studying radiological aspects of the patients included in the investigation, it was revealed that destructive phase of the tuberculosis process was predominant in patients with resistant culture result. In the patients with the *Xpert MTB positive/RIF resistant* result bilateral process prevailed in 133 (88.6%) patients and extensive – in 136 (90.7%) cases. Similar processes were revealed in patients with resistant culture: bilateral processes – in 74 (87.1%) cases and extensive – in 80 (94.1%) cases.

In the investigated groups, predominated patients with AFB positive sputum microscopy. In the group of patients with resistant culture, AFB sputum microscopy was positive in 126 (84%) cases. In patients with *positive Xpert MTB/RIF resistant* result, sputum microscopy was positive only in 58 (68.2%) cases.

In patients with the *positive Xpert MTB/RIF resistant* result,

scopia sputei la BAAR pozitivă. La bolnavii cu cultură rezistentă, microscopia sputei la BAAR a fost pozitivă în 126 (84,0%) de cazuri. La pacienții depistați cu *Xpert pozitiv/RIF rezistent*, microscopia sputei a fost pozitivă numai în 58 (68,2%) dintre cazuri.

La pacienții cu rezultatul *Xpert pozitiv/RIF rezistent*, durata medie de la examinare prin testul molecular-genetic și până la inițierea tratamentului TB MDR, a constituit 10 zile.

În eșantionul cu rezultatul culturii rezistente, au predominat bolnavii care au inițiat tratamentul TB MDR de la 3 până la 5 luni după examinare prin cultură.

La pacienții incluși în cohorta pentru tratamentul TB MDR, după rezultatul culturii, conversia sputei prin metoda bacteriologică a fost constatată mai târziu, mai mulți bolnavi au rămas cu rezultatul pozitiv al sputei la *M. tuberculosis*. La pacienții incluși în cohorta pentru tratamentul TB MDR, după rezultatul *Xpert pozitiv/RIF rezistent*, conversia sputei prin metoda culturală a fost identificată mai precoce și mai puține persoane au rămas cu rezultatul pozitiv al sputei la *M. tuberculosis*. Rezultatele sunt prezentate în Tabelul 3.

**Tabelul 3.** Conversia sputei prin cultură.

Abacilarea prin cultură	<i>Xpert MTB poz/RIF rez (n=85)</i>		Cultură rezistentă (n=150)		p
	abs	%	abs	%	
La 2 luni	33	38,8	21	14,0	1,42E-05
La 3 luni	15	17,6	21	14,0	0,11
La 4 luni	11	12,9	38	25,3	0,01
La 5 luni	8	9,4	9	6,0	0,13
La 6 luni	1	1,2	7	4,7	0,12
La 9 luni	1	1,2	2	1,3	0,44
La 12 luni	-	-	1	0,7	-
La 15 luni	-	-	1	0,7	-
A rămas bacilifer	6	7,1	26	17,3	0,01
Neevaluat	10	11,8	24	16,0	0,11

Notă: test statistic aplicat – Fisher exact.

Durata tratamentului la pacienții incluși în cohorta pentru tratamentul TB MDR, după rezultatul *Xpert pozitiv/RIF rezistent*, a constituit 24 de luni la 54 (68,4%) de bolnavi; 16 (20,3%) pacienți au urmat tratamentul 18 luni, datorită evoluției clinico-radiologice pozitive a procesului tuberculos.

În eșantionul bolnavilor cu cultură rezistentă, durata terapiei, la 44 (29,3%) de pacienți a constituit 26 de luni, la 37 (24,7%) de bolnavi – 24 de luni, la 23 (15,3%) de bolnavi – 28 de luni, iar la 9 (6%) persoane, durata tratamentului a fost de peste 30 de luni; 18 luni au urmat tratamentul 21 (14%) de bolnavi, dintre ei doar două cazuri au fost calificate drept „vindecat”. Ceilalți, au eșuat tratamentul sau au fost pierduți din supraveghere. Toți bolnavii, care au urmat tratamentul până la 6 luni – 16 (10,7%) cazuri – fie au suferit eșec terapeutic, fie au fost pierduți din supraveghere.

Bolnavii tratați cu succes (vindecați + tratament încheiat) au predominat semnificativ în eșantionul pacienților cu rezultatul *Xpert MTB pozitiv/RIF rezistent* – 69,6% (55 de cazuri), comparativ cu pacienții eșantionului cu cultură rezistentă –

the mean period of time from examining through *Xpert MTB/RIF* test until initiation of the MDR TB treatment is 10 days.

In the group with the result of resistant culture, prevailed patients who initiated MDR TB treatment from 3 to 5 months after examination by means of culture.

Among patients included in the cohort of MDR TB treatment, according to the result of culture, it was revealed that negativity of the sputum takes place later, the period of sputum conversion gets longer and more people remain sputum positive for *M. tuberculosis*. Among patients included in cohort of MDR TB treatment according to the *Xpert positive/RIF resistant* result sputum conversion through the cultural method takes place earlier, the period of conversion is shorter and less people remain sputum positive for *M. tuberculosis*. Results are presented in Table 3.

**Table 3.** Sputum conversion according to culture.

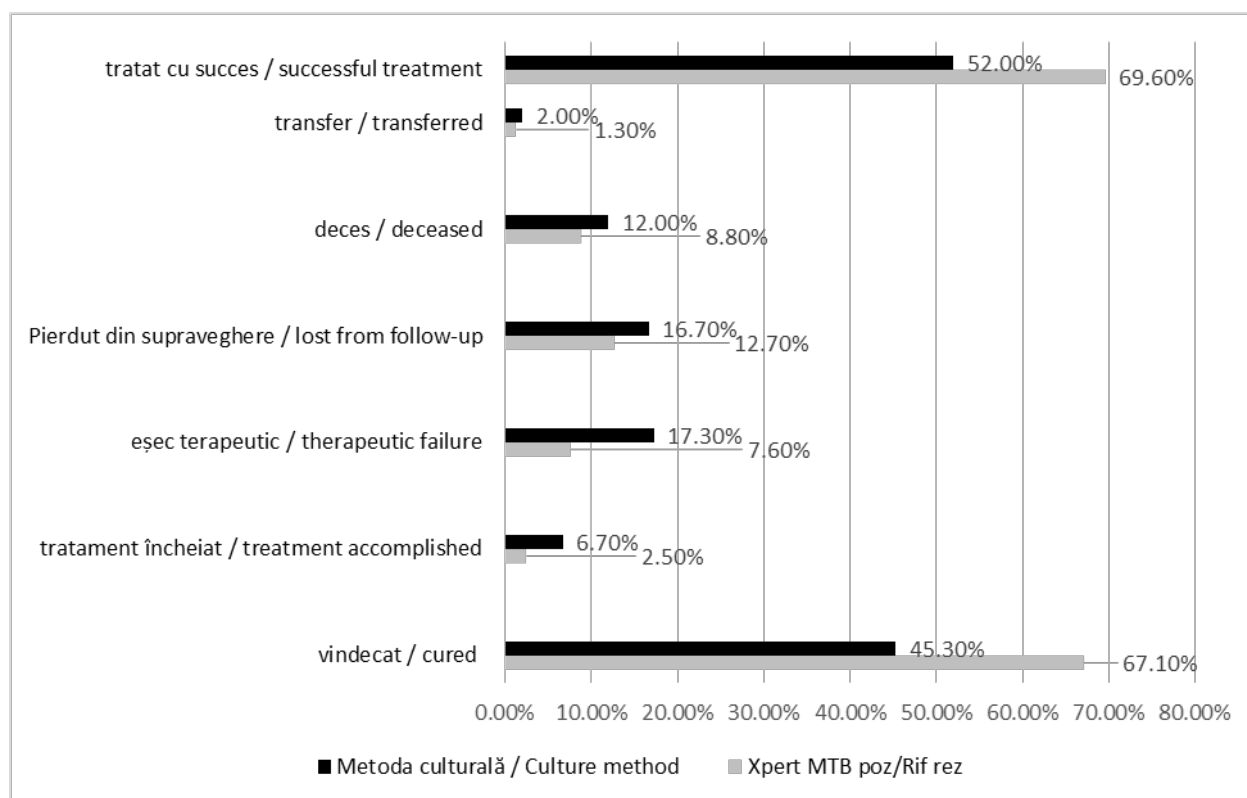
No mycobacteria found in culture	<i>Xpert MTB pos/RIF res (n=85)</i>		Resistant culture (n=150)		p
	abs	%	abs	%	
At 2 months	33	38.8	21	14.0	1.42E-05
At 3 months	15	17.6	21	14.0	0.11
At 4 months	11	12.9	38	25.3	0.01
At 5 months	8	9.4	9	6.0	0.13
At 6 months	1	1.2	7	4.7	0.12
At 7 months	1	1.2	2	1.3	0.44
At 8 months	-	-	1	0.7	-
At 9 months	-	-	1	0.7	-
Remained bacteria positive	6	7.1	26	17.3	0.01
Not evaluated	10	11.8	24	16.0	0.11

Note: applied statistic test: Fisher's exact test.

The duration of the treatment of the patients included in the cohort of MDR TB treatment according to the result *Xpert positive/RIF resistant* was 24 month in 54 (68.4%) patients, 16 (20.3%) patients received treatment for 18 month due to the positive clinical and radiologic evolution of the tuberculosis process.

In the group of the patients with resistant culture, the majority of the patients 44 (29.3%) got treatment for 26 month, followed by 37 (24.7%) patients that got treatment for 24 month, 28 month for 28 (15.3%) patients, the length of the treatment in 9 (6%) patients was more than 30 month, 21 (14%) patients followed the treatment for 18 months, out of them only 2 were qualified as cured, the rest of the patients failed the treatment or went loss to follow-up. Everybody who followed the treatment up to 6 month 16 (10.7%) patients finished the treatment with a therapeutic failure or loss to follow-up.

Treatment success (cured + finished treatment) of the patients from the *Xpert MTB positive/RIF resistant* group was revealed in 55 (69.6%) of cases, and in 78 (52.0%) of cases among patients with the resistant culture, the data obtained are statistically significant. The amount of the patients with



**Fig. 1** Eficacitatea tratamentului antituberculos în funcție de loturile de studiu.

**Fig. 1** Efficacy of antituberculosis treatment according to the study groups.

52,0% (78 de cazuri). Ponderea pacienților cu eșec terapeutic și pierduți din supraveghere a fost semnificativ mai mare la bolnavii incluși în eșantionul cu cultură rezistentă. Datele sunt prezentate în Figura 1.

## Discuții

Conform unui studiu recent, efectuat de către Belousova X. și coaut., rezultatele identificării *M. tuberculosis* în materialul patologic prin metodele molecular-genetice corelează cu cele obținute prin metodele bacteriologice convenționale, procentul de coincidență fiind de 87,3% (95CI: 76,5% – 94,4%). Pentru rifampicină, rezultatele au coincis în 85,8% (95CI: 74,7% – 93,3%) de cazuri. Rezultate similare au fost obținute, anterior, de către Skotnikova O. și coaut., care au stabilit că rezultatele determinării multidrogrezistenței *M. tuberculosis* din izolatele din spută prin testul *Xpert MTB/RIF* au coincis cu metoda culturală în 88,8% din cazuri [13].

Ustian A. și coaut., au relatat că în anul 2014, la Spitalului Clinic Municipal de Ftiziopneumologie din Chișinău, au fost examinați prin testul *Xpert MTB/RIF* 361 de bolnavi de tuberculoză pulmonară (toate fiind cazuri noi). Un rezultat pozitiv al testului a fost stabilit la 174 (48,2%) dintre pacienți. Cu rezultatul testului „sensibil” au fost 123 (70,7%) de pacienți, iar cu rezultat „rezistent” – 51 (29,3%) de cazuri. Microscopia la BAAR a fost pozitivă la 103 (59,2%) persoane, iar negativă – la 71 (40,8%) de pacienți. La bolnavii cu testul *Xpert MTB/RIF* sensibil, microscopia negativă a fost la 51 (41,5%) de pacienți.

therapeutic failure and lost to follow-up was significantly higher among patients included in the cohort with results of the resistant culture. Data are shown in Figure 1.

## Discussion

According to a recent study by Belousova X. *et al.* the results of identification of *M. tuberculosis* in the pathological material by molecular-genetic methods, correlate with those obtained by conventional bacteriological methods, the coincidence percentage being 87.3% (95%CI: 76.5% – 94.4%). For rifampicin, the results coincided in 85.8% (95%CI: 74.7% – 93.3%) of cases. Similar results have been previously obtained by Skotnikova O. *et al.*, which established that the results of the multidrug resistance determination of tuberculosis causal agent from sputum isolates, by the *Xpert MTB/RIF* test coincided with the culture method in 88.8% cases [13].

Ustian A. and coauthors, pointed out that, in 2014, in the Municipal Clinical Hospital of Phthysiopneumology, Chișinău, 361 patients (new cases), with pulmonary tuberculosis, were examined using the *Xpert MTB/RIF* test. A positive test result was established in 174 (48.2%) patients. „Sensitive” test results had 123 (70.7%) patients, and „resistant” – in 51 (29.3%) cases. AFB microscopy was positive in 103 (59.2%) patients, and negative – in 71 (40.8%) patients. In patients with the *Xpert MTB positive/RIF sensitive* test results, negative microscopy was obtained in 51 (41.5%) patients. In patients with *Xpert MTB positive/RIF resistant* result, positive micro-



La bolnavii cu *Xpert MTB/RIF* rezistent, microscopia pozitivă a fost identificată în 31 (60,8%) din cazuri, iar microscopia negativă – în 20 (39,%) de cazuri [14].

Datele unui studiu, efectuat în Ucraina în 2015, denotă că testul *Xpert MTB/RIF* reprezintă o metodă eficientă și utilă pentru diagnosticarea precoce a tuberculozei. Utilizarea *Xpert MTB/RIF*, în asociere cu metoda microbiologică (creștere pe medii de cultură) la începutul tratamentului, permite scurta durata tratamentului inadecvat al cazurilor noi de tuberculoză și a recidivelor, și împiedică răspândirea tulpinilor rezistente de *M. tuberculosis* [15].

Într-un studiu retrospectiv, efectuat în India în 2016, a fost comparativ evaluat randamentul diagnostic al testului *Xpert* în detectarea MTB în probele respiratorii (lavajul bronhoalveolar și spută) și a metodei microbiologice (creștere pe medii de cultură) [16]. În Sensibilitatea generală și specificitatea testului *Xpert MTB/RIF* au constituit, respectiv, 86,8% și 93,4%. Rezultatele obținute au fost comparabile cu cele din alte studii [17-20].

Algoritmul istoric, bazat pe frotiu/cultură, a fost la fel de eficace în identificarea cazurilor de TB, ca și algoritmul nou, bazat pe testul *Xpert MTB/RIF* [21, 22]. Însă, sunt necesare studii suplimentare pentru evaluarea factorilor care vor spori aderența la algoritm, în special, pentru cazurile cu rezultatul *Xpert negativ*, sau pentru persoanele care trăiesc cu HIV. Astfel, sunt create premise pentru studierea posibilității utilizării, în perspectivă, a testului *Xpert MTB/RIF* în zonele cu resurse limitate, în care algoritmul eficient, bazat pe frotiu/cultură este în vigoare [23].

În cel mai amplu studiu, efectuat până în prezent, dedicat evaluării rezultatelor utilizării testului *Xpert MTB/RIF* în zonele cu prevalență de TB scăzută, indicatorii de diagnostic în Statele Unite au fost similari cu cei ale regiunilor mai afectate din Brazilia și Africa de Sud, și comparabili cu indicatorii din alte zone cu prevalență înaltă de tuberculoză [24].

În studiul de față, o testare *Xpert MTB/RIF* a identificat 96% dintre cazurile de tuberculoza BAAR pozitivă / cultură pozitivă, iar două testări – a permis identificarea tuturor cazurilor. Este important de menționat că un test *Xpert MTB/RIF* a fost semnificativ mai sensibil decât trei froțiuni microscopice la BAAR, din subgrupul pentru care trei froțiuni au fost disponibile (82,0% vs. 61,5%,  $p < 0,001$ ).

Luând în considerație faptul, că nu a fost realizată nicio analiză sistematică, rezultatele din două studii de evaluare a impactului testului *Xpert MTB/RIF* asupra rezultatelor tratamentului, au fost prezentate și discutate. Primul studiu a fost o cercetare multinațională – TB-NEAT 20, efectuată în Africa de Sud, Zambia, Zimbabwe și Tanzania. Celălalt, a fost un studiu randomizat, pe clustere controlate, încorporate în implementarea testului *Xpert MTB/RIF* în Africa de Sud (*Xtend*). Utilizarea testului *Xpert MTB/RIF* nu a redus morbiditatea asociată cu tuberculoza, posibil, în mare parte din cauza utilizării pe scară largă a examenului radiologic a cutiei toracice pentru diagnosticarea tuberculozei și a tratamentului empiric, administrat bolnavilor de tuberculoză cu froțiuni negative [25]. Acest studiu a fost efectuat într-un stadiu incipient al implementării testului *Xpert MTB/RIF*, efectuat cu scop de diagnostic inițial

scopie was identified in 31 (60.8%) cases, and negative microscopy – in 20 (39.%) cases [14].

Data from a one study in Ukraine in 2015 denote that the *Xpert MTB/RIF* test is an effective and useful method for early diagnosis of tuberculosis. The *Xpert MTB/RIF* test using in association with the microbiological method (cultivation on culture media) at the beginning of treatment allows shorter duration of inadequate treatment of patients in new cases of tuberculosis and relapses and prevents the spread of *M. tuberculosis* resistant strains [15].

In the retrospective study conducted in India in 2016, the diagnostic performance of the *Xpert* test in the detection of MTB in respiratory samples (bronchial and sputum lavage) and the microbiological method (cultivation on culture media) were compared [16]. The study looked at the general sensitivity and specificity of the *Xpert MTB/RIF* test, which constituted 86.8% and 93.4%, respectively. The obtained results were comparable to those from other studies [17-20].

The historical algorithm based on smear/culture was as effective in identifying TB cases as the new algorithm based on the inclusion of the *Xpert MTB/RIF* test [21, 22]. Additional studies are needed to evaluate factors that increase adherence to the algorithm, especially for cases with negative *Xpert* result, or people living with HIV. Thus, prerequisites are created for the prospective use of the *Xpert MTB/RIF* test in areas with limited resources where the effective smear/culture algorithm is used [23].

In the largest study until now, dedicated to evaluate the use of the *Xpert MTB/RIF* test in areas with low TB prevalence, the *Xpert MTB/RIF* diagnostic indicators in the United States were similar to those with the higher tuberculosis prevalence regions in Brazil and South Africa, and were comparable to other studies in areas with high prevalence of tuberculosis [24].

In the present stud, one *Xpert MTB/RIF* test identified 96% of AFB positive/culture positive tuberculosis cases, and two *Xpert MTB/RIF* tests identified all AFB positive/culture positive TB cases. It is important to note that one *Xpert MTB/RIF* test was significantly more sensitive than three microscopic smears for AFB, in the subgroup for which three smears were available (82.0% vs. 61.5%,  $p < 0.001$ ).

Until now, no systemic analysis was performed, the results from two *Xpert MTB/RIF* test evaluations on treatment outcomes were presented and discussed. The first study was a multinational research – TB-NEAT 20, conducted in South Africa, Zambia, Zimbabwe and Tanzania. The other one was a randomized controlled cluster study embedded in implementation of the *Xpert MTB/RIF* test in South Africa (*Xtend*). The use of the *Xpert MTB/RIF* test did not reduce tuberculosis-related morbidity, possibly largely due to widespread use of the chest X-ray to diagnose tuberculosis and to empiric treatment for tuberculosis in patients with negative smears [25]. This study was conducted at an early stage during the *Xpert MTB/RIF* test implementation as an initial diagnostic investigation for all people in South Africa. The authors concluded, that if the link between diagnostic and treatment services is not optimal, the

pentru toate persoanele din Africa de Sud. Autorii au ajuns la concluzia că introducerea unui test nou într-un sistem de sănătate, în cazul în care legătura dintre serviciile de diagnostic și tratament nu este optimală, nu are impactul scontat. Autorii, de asemenea, au ajuns la concluzia că lipsa unui impact asupra mortalității pacienților ar putea fi atribuită utilizării pe scară largă a tratamentului antituberculos empiric în Africa de Sud [26].

### Concluzii

- 1) Pacientul cu TB MDR este, cel mai probabil, un bărbat de 35-44 de ani, fumător, care face abuz de alcool, muncitor necalificat, cu contact apropiat cu bolnavi de TB și, preponderent, depistat prin adresare.
- 2) Testul *Xpert MTB/RIF* a avut o sensibilitate mai înaltă față de metoda microscopică și a permis diagnosticarea rapidă a pacienților cu tuberculoză, inclusiv, rezistentă la rifampicină.
- 3) Durata medie de la testarea cu *Xpert MTB/RIF* și până la inițierea tratamentului antituberculos a constituit 10 zile, fapt care a permis oprirea răspândirii infecției tuberculoase rezistente.
- 4) Rata de succes al tratamentului, inițiat după testarea *Xpert* este mai mare, datorită inițierii lui precoce și a faptului, că pacienții sunt abacilați mai rapid. Ponderea bolnavilor care au eșuat tratamentul sau celor care au fost pierduți din supraveghere a fost mai redusă din contul scăderii semnificative a duratei tratamentului.

### Declarația de conflict de interese

Autorul declară lipsa conflictului de interese.

### Referințe / references

1. World Health Organization. Policy statement: automated real-time nucleic acid amplification technology for rapid and simultaneous detection of tuberculosis and rifampicin resistance: *Xpert MTB/RIF* system. Geneva, 2011.
2. Banada P., Sivasubramani S., Blakemore R. Containment of bio-aerosol infection risk by the *Xpert MTB/RIF* assay and its applicability to point-of-care settings. *J. Clin. Microbiol.*, 2010; 48 (10): 3551-7.
3. Ignatyeva O., Kontsevaya I., Kovalyov A. Detection of resistance to second-line antituberculosis drugs by use of the genotype MTBDRsl assay: a multicenter evaluation and feasibility study. *J. Clin. Microbiol.*, 2012; 50 (5): 1593-7.
4. Kontsevaya I., Ignatyeva O., Nikolayevskyy V. Diagnostic accuracy of the genotype MTBDRsl assay for rapid diagnosis of extensively drug-resistant tuberculosis in HIV-coinfected patients. *J. Clin. Microbiol.*, 2013; 51 (1): 243-8.
5. Steingart K., Sohn H., Schiller I. *Xpert MTB/RIF* assay for pulmonary tuberculosis and rifampicin resistance in adults. *Cochrane Database Syst. Rev.*, 2013; 1: CD009593.
6. Boehme C., Nabeta P., Hillemann D. Rapid molecular detection of tuberculosis and rifampin resistance. *N. Engl. J. Med.*, 2010; 363 (11): 1005-15.
7. Menzies N., Cohen T., Lin H., Murray M., Salomon J. Population health impact and cost-effectiveness of tuberculosis diagnosis with *Xpert MTB/RIF*: a dynamic simulation and economic evaluation. *PLoS Medicine*, 2012; 9 (11): e1001347.
8. Helb D., Jones M., Story E. Rapid detection of *M. tuberculosis* and rifampin resistance by use of on-demand near-patient technology. *J. Clin. Microbiol.*, 2010; 48 (1): 229-37.
9. El-Hajj H., Marras S., Tyagi S., Kramer F., Alland D. Detection of rifampin resistance in *M. tuberculosis* in a single tube with molecular beacons. *J. Clin. Microbiol.*, 2001; 39 (11): 4131-7.
10. Lawn S., Nicol M. *Xpert MTB/RIF* assay: development, evaluation and implementation of a new rapid molecular diagnostic for tuberculosis and rifampicin resistance. *Future Microbiol.*, 2011; 6 (9): 1067-82.
11. Blakemore R., Story E., Helb D. Evaluation of the analytical performance of the *Xpert MTB/RIF* assay. *J. Clin. Microbiol.*, 2010; 48 (7): 2495-501.
12. The use of molecular line probe assay for the detection of resistance to second-line anti-tuberculosis drugs: *Xpert MTB/RIF* Group meeting report. Geneva: WHO, 2013.
13. Lacerda S., de Abreu Temoteo R., Monteiro de Figueiredo T. *et al.* Individual and social vulnerabilities upon acquiring tuberculosis: a literature systematic review. *Int. Arch. Med.*, 2014; 7: 35.

introduction of a new test in a health system, can fully explain the partial results. They also concluded that a lack of impact on patient mortality could be attributed to the widespread use of empirical TB treatment in South Africa [26].

### Conclusions

- 1) The MDR TB patient is a 35-44 y.o. male, smoker, an often alcohol drinker, unskilled worker, predominant from close contact with TB patients and mostly detected by addressing.
- 2) The *Xpert MTB/RIF* test revealed a higher sensitivity than the microscopic method, indicating the priority of the *Xpert* test for rapid diagnosis of tuberculosis, including resistance to rifampicin.
- 3) The average duration between the *Xpert MTB/RIF* test examination and treatment start was 10 days, which allowed to stop the spread of resistant tuberculosis infection.
- 4) The rate of treatment success, initiated after the *Xpert* testing is higher due to early initiation of treatment, so sputum conversion in patients are obtained more rapidly. The percentage of patients who have failed treatment, and those who were lost to follow-up decreased significantly, due to the shortened duration of treatment.

### Declaration of conflict of interests

The author declares no conflict of interests.

14. Устиян А., Малик А., Нигуляну А., Лесник Э. Роль метода Xpert MTB/RIF в выявлении туберкулеза легких. *Смоленский медицинский альманах*, 2015; 157-158. [article in Russian]
15. Разнатовская Е., Михайлова А., Костенко И. Эффективность Genexpert MTB/RIF у больных с новыми случаями и рецидивами туберкулеза легких. *Журнал Актуальная инфектология*, 2015; 2 (7): 55-57. [article in Russian]
16. Agrawal M., Bajaj S., Dutt S. Comparative study of GeneXpert with Zn stain and culture in samples of suspected pulmonary tuberculosis. *Journal of Clinical and Diagnostic Research*, 2016; 10 (5): 9-12.
17. Barnard D., Irusen E., Bruwer J. *et al.* The utility of Xpert MTB/RIF performed on bronchial washings obtained in patients with suspected pulmonary tuberculosis in a high prevalence setting. *BMC Pulm. Med.*, 2015; 15: 103.
18. Churchyard, G. J., W. S. Stevens, L. D. Mametja, *at al.* Xpert MTB/RIF versus sputum microscopy as the initial diagnostic test for tuberculosis: a cluster-randomised trial embedded in South African roll-out of Xpert MTB/RIF. *Lancet Glob Health*. 2015, 3, 8, p.450-457.
19. International standard for tuberculosis care. 3<sup>rd</sup> edition, 2014. [www.who.int/tb/publications/standards-tb-care-2014/](http://www.who.int/tb/publications/standards-tb-care-2014/).
20. Sharma S., Kohli M., Yadav R., Chaubey J., Bhasin D., Sreenivas V. *et al.* Evaluating the diagnostic accuracy of Xpert MTB/RIF assay in pulmonary tuberculosis. *PlosOne*, 2015; 10 (10): e0141011.
21. Churchyard G., McCarthy K., Fielding K. *et al.* Effect of Xpert MTB/RIF on early mortality in adults with suspected TB: a pragmatic randomized trial. *CROI*, 2014.
22. Cox H., Daniels J., Muller O. *et al.* Impact of decentralized care and the Xpert MTB/RIF test on rifampicin-resistant tuberculosis treatment initiation in Khayelitsha, South Africa. *Open Forum Infectious Diseases*, 2015; 2 (1): ofv014.
23. Naidoo P., Dunbar R., Lombard C. *et al.* Comparing tuberculosis diagnostic yield in smear/culture and Xpert MTB/RIF-based Algorithms Using a Non-Randomised stepped-wedge design. *PlosOne*, 2016; 11 (3): e0150487.
24. Luetkemeyer A., Firmhaber C., Kendall M. *et al.* Evaluation of Xpert MTB/RIF vs. AFB smear and culture to identify pulmonary tuberculosis in patients with suspected tuberculosis from low and higher prevalence settings. *Clin. Infect. Dis.*, 2016; 62 (9): 1081-1088.
25. Havlir D., Getahun H., Sanne I., Nunn P. Opportunities and challenges for HIV care in overlapping HIV and TB epidemics. *JAMA*, 2008; 300 (4): 423-30.
26. Scott L., McCarthy K., Gous N. Comparison of Xpert MTB/RIF with other nucleic acid technologies for diagnosing pulmonary tuberculosis in a high HIV prevalence setting: a prospective study. *PLoS Medicine*, 2011; 8 (7): e1001061.

ARTICOL DE CERCETARE

## Managementul donatorului marginal în moarte cerebrală: experiența Republicii Moldova

Cornelia Guțu-Bahov<sup>1,3\*</sup>, Radu Avădăni<sup>1,3</sup>,  
Tatiana Dumitraș<sup>1,2</sup>, Victor Garbuz<sup>1,3</sup>

<sup>1</sup>Catedra de anesteziologie și reanimatologie nr. 2, Universitatea de Stat de Medicină și Farmacie „Nicolae Testemițanu”, Chișinău, Republica Moldova;

<sup>2</sup>Disciplina sinteze clinice, Departamentul de medicină internă, Universitatea de Stat de Medicină și Farmacie „Nicolae Testemițanu”, Chișinău, Republica Moldova;

<sup>3</sup>Secția de terapie intensivă, Spitalul Clinic Municipal „Sfânta Treime”, Chișinău, Republica Moldova.

Data primirii manuscrisului: 31.03.2017  
Data acceptării spre publicare: 01.06.2017

### Autor corespondent:

Cornelia Guțu-Bahov, conf. univ., dr. șt. med.

Catedra de anesteziologie și reanimatologie nr. 2

Universitatea de Stat de Medicină și Farmacie „Nicolae Testemițanu”

bd. Ștefan cel Mare și Sfânt 165, Chișinău, Republica Moldova, MD-2004

e-mail: cornelia.bahov@gmail.com

### Ce nu este, deocamdată, cunoscut la subiectul abordat

Menținerea donatorului marginal în moarte cerebrală este o practică relativ nouă atât în Republica Moldova, cât și în România. Donatorul marginal permite creșterea numărului de organe efectiv transplantate. În rezultat, crește rata de supraviețuire a pacienților, aflați pe lista de așteptare pentru un transplant.

### Ipoteza de cercetare

Abordarea mai permisivă a contraindicațiilor relative pentru donarea de organe ar crește numărul de organe efectiv transplantate.

### Noutatea adusă literaturii științifice din domeniu

Managementul țintit și contracararea complicațiilor apărute în menținerea într-un timp oportun al donatorului marginal în moarte cerebrală a demonstrat rezultate clinice posttransplant satisfăcătoare, fapt ce argumentează necesitatea unei abordări multidisciplinare și subliniază rolul decisiv, în acest proces, al specialistului în anestezie și terapie intensivă.

### Rezumat

**Introducere.** Din cauza deficitului acut de organe transplantabile, în ultimul timp este acceptat transplantul de organe în baza criteriilor extinse; termenul utilizat pentru donatorii respectivi este cel de „donator marginal” (l. engl. *extended donor*).

RESEARCH ARTICLE

## Management of the brain-dead extended donor: the experience of Republic of Moldova

Cornelia Gutu-Bahov<sup>1,3\*</sup>, Radu Avadani<sup>1,3</sup>,  
Tatiana Dumitras<sup>1,2</sup>, Victor Garbuz<sup>1,3</sup>

<sup>1</sup>Chair of anaesthesiology and intensive care no. 2, Nicolae Testemitanu State University of Medicine and Pharmacy, Chisinau, Republic of Moldova;

<sup>2</sup>Discipline of clinical synthesis, Department of internal medicine, Nicolae Testemitanu State University of Medicine and Pharmacy, Chisinau, Republic of Moldova;

<sup>3</sup>Intensive Care Unit, Clinical Municipal Hospital “Sfanta Treime”, Chisinau, Republic of Moldova.

Manuscript received on: 31.03.2017  
Accepted for publication on: 01.06.2017

### Corresponding author:

Cornelia Gutu-Bahov, PhD, associate professor

Chair of anaesthesiology and intensive care no. 2

Nicolae Testemitanu State University of Medicine and Pharmacy

165, Stefan cel Mare si Sfanta ave., Chisinau, Republic of Moldova, MD-2004

e-mail: cornelia.bahov@gmail.com

### What is not known yet, about the topic

Maintaining of the marginal brain-dead donor is a relatively new experience both for Republic of Moldova and Romania, being an important premise in increasing the number of effectively transplanted organs, thereby increasing the survival rate of patients in the waiting list.

### Research hypothesis

Impact of relative contraindications for organs` donation on the number of effectively transplanted organs.

### Article's added novelty on this scientific topic

The targeted management and counteraction of the complications that occurred in the timely maintenance of the marginal brain-dead donor proved satisfactory post-transplant clinical results, which argues the need for a multidisciplinary approach and the decisive role in this process of the anesthesiologist and intensive care specialist.

### Abstract

**Introduction.** Due to an acute deficit of transplantable organs, new extended criteria are accepted now for organ donation, and this kind of donors are defined as marginal (*extended*) donors.

**Material și metode.** În perioada anilor 2014-2016, în Secția de terapie intensivă a Spitalului Clinic Municipal „Sfânta Treime” au fost menținuți 49 de donatori în moarte cerebrală, 48 dintre ei fiind donatori marginali. Studiul, de tip descriptiv, s-a efectuat retrospectiv, pe baza datelor sistemului informațional *SIA Transplant* și ale dosarelor donatorilor de organe.

**Rezultate.** Vârsta medie a celor 48 de donatori marginali menținuți a fost de  $62,3 \pm 11,3$  ani. Examenul primar al donatorului s-a efectuat în baza fișei medicale, a anamnezei medicale și sociale. Totodată, au fost evaluați parametrii clinici și paraclinici ai donatorului – presiunea arterială (PA), presiunea venoasă centrală (PVC), hemoglobina (Hb), echilibrul acido-bazic (EAB), analiza biochimică a sângelui. De asemenea, a fost examinat sângele donatorului la o serie de infecții (hepatitele virale B și C, citomegalovirus, toxoplasmoză, HIV) prin metoda de depistare imunologică a anticorpilor cu ajutorul testelor expres în laboratorul „Synevo”. Până la constatarea morții cerebrale, toți pacienții au beneficiat de tratament non-chirurgical, conform consultului neurologului și neurochirurgului. Durata tratamentului până la declararea morții cerebrale a constituit mai puțin de 48 de ore în 51,0% (26/48) din cazuri, până la 3 zile – în 37,3% (19/48) din cazuri, mai mult de 4 zile – în 11,8% (6/48) din cazuri. Principalele comorbidități ale donatorilor au fost: hipertensiunea arterială gradul III, risc adițional înalt (89,6%), cardiopatia ischemică (43,6%), fibrilația atrială permanentă (27,1%), diabetul zaharat tip 2 insulinodependent (4,2%) dintre cazuri. Complicațiile survenite la menținerea donatorului în moarte cerebrală au fost: hipotensiune arterială (89,6%), hipokaliemie (50,0%), acidoză metabolică (31,3%), aritmii (27,1%), diabet insipid (27,1%), asistolie (2,1%). O durată a menținerii donatorului în moarte cerebrală mai puțin de 24 de ore s-a înregistrat în 29,2% de cazuri, până la 12 ore – în 11 (22,9%) cazuri, mai mult de 24 de ore – în 23 (47,9%) de cazuri.

**Concluzii.** Donatorii marginali, corect menținuți, reprezintă un suport considerabil în tacticile medicale de prelungire a vieții pacienților cu insuficiență de organ. De aici reiese necesitatea monitorizării țintite a donatorilor marginali aflați în moarte cerebrală, cu corecția imediată a instabilității hemodinamice și dereglărilor metabolice.

**Cuvinte cheie:** donator marginal, moarte cerebrală, menținere, organe efective.

## Introducere

Insuficiența ireversibilă de organ și alte patologii grave, care necesită un tratament prin transplant de organ, țesut sau celule umane, rămâne o problemă extrem de importantă pentru Republica Moldova [1].

În prezent, pe lista de așteptare a Agenției Naționale de Transplant din Republica Moldova sunt aproximativ 800-900 de pacienți care necesită transplant de organe; dintre acestea, 450 se află la tratament prin hemodializă, dintre care, 250 necesită transplant renal; alți 300 de pacienți suferă de insuficiență hepatică [2]. Diferența dintre numărul de donatori efectivi și numărul pacienților în așteptarea unui transplant de organ

**Material and methods.** Between the years 2014-2016, in Intensive Care Unit of Clinical Municipal Hospital “Sfanta Treime” 49 brain-dead donors were maintained, 48 of them were marginal donors. The descriptive retrospective study was performed on the basis of SIA Transplant Information System data and organ donors' files.

**Results.** According to the data obtained, the mean age of those 48 marginal donors maintained was  $62.3 \pm 11.3$  years. The primary donor's examination was based on the medical record, the medical and social history. Clinical and paraclinical parameters of the donor: blood pressure (BP) and central venous pressure (CVP), hemoglobin (Hb), acid-base balance (ABB), biochemical analysis of blood were also evaluated. Simultaneously, the donor's blood was examined for infections (viral hepatitis B, viral hepatitis C, cytomegalovirus, toxoplasmosis, HIV) by immunological antibody detection using express assays in the “Synevo” laboratory. All patients were subjected to the non-surgical treatment method after consulting the neurologist and neurosurgeon. The duration of treatment until the brain death was less than 48 hours in 51% (26/48) of cases, up to 3 days in 37.3% (19/48) of cases, more than 4 days – in 8% (6/48) of cases. The main comorbidities diagnosed in donors were: 3<sup>rd</sup> degree arterial hypertension (89.6%), ischaemic heart disease (43.6%), permanent atrial fibrillation (27.1%), type 2 insulin-requiring diabetes mellitus (4.2%). According to the obtained data, the complications appeared during donor' maintenance in brain death were: hypotension (89.6%), hypokalemia (50.0%), metabolic acidosis (31.3%), arrhythmias (27.1%), insipid diabetes (27.1%) and asystole (2.1%). The duration of donor maintenance in brain death less than 24 hours was recorded in 29.2% of cases, up to 12 hours – 11 (22.9%) cases, more than 24 hours – in 23 (47.9%) cases.

**Conclusions.** Properly maintained marginal brain-dead donors represent a considerable support in medical tactics to extend the life of patients with organ failure. Hence the need for targeted monitoring of marginal donors in brain death with immediate correction of hemodynamic instability and metabolic disturbances.

**Key words:** marginal donor, brain death, maintaining, effective organs.

## Introduction

Irreversible organic insufficiencies and other severe diseases requiring organ, tissue, or human cell transplantation remain extremely important for Republic of Moldova [1].

Today, the waiting list of the National Transplant Agency of Republic of Moldova has approximately 800-900 patients requiring organ transplantation, of which 450 are undergoing hemodialysis, approximately 250 requiring renal transplantation and 300 patients suffer from hepatic failure [2]. The difference between the number of effective donors and the number of patients waiting for an organ transplant continues to expand in the last decade worldwide. At the same time, the

continuă să crească, în ultima decadă, în toată lumea. Simultan, se atestă creșterea timpului individual de așteptare și a numărului de decese ale persoanelor din lista de așteptare. Cauza principală a acestui fenomen este deficitul de organe transplantabile. Din acest motiv, actualmente, sunt revăzute criteriile de acceptare a donatorilor de organe. În rezultat, este acceptat transplantul de organe în baza unor criterii extinse, iar donatorii respectivi sunt definiți drept „donatori marginali” (l. engl. „*extended donor*”).

Totodată, au fost propuse contraindicații relative pentru donatorul marginal. De exemplu, vârsta, instabilitatea hemodinamică, suportul inotrop cu doze crescute, durata de spitalizare în unitatea de terapie intensivă, suprainfecția donatorului, hipernatriemia, incompatibilitatea grupei sangvine, steatoza hepatică și, chiar prelevarea unui organ de la un donator în stop cardiac, au devenit contraindicații relative pentru donarea de organe. Este evident că factorii menționați cresc gradul de hipoxie și frecvența complicațiilor funcționale, ce țin de reperfuție în grefa de organ. Un alt aspect important îl reprezintă limitele criteriilor de acceptabilitate a donatorului marginal, care, de fapt, deocamdată nu sunt clar definite. În acest context, Cameron A. și colegii (2006), au propus utilizarea indicelui donatorului (l. engl. “*donor index*”, DI) pentru aprecierea scorului donatorului (Tabelul 1) [3].

**Tabelul 1.** Evaluarea indicelui donatorului (după Cameron A. *et al.*, 2006) [3].

Criterii relative	Scorul donatorului
Vârsta donatorului >55 de ani	0 – nu există criterii extinse
Durata aflării în spital >5 zile	1 – donator cu un criteriu
Durata ischemiei reci >10 ore	2 – donator cu 2 criterii
Durata de ischemie secundară >40 min	3 – donator cu 3 criterii
	4 – donator cu 4 criterii

Astfel, statutul de donator marginal poate fi atribuit oricărui donator cu vârstă mai mare de 60 de ani, sau donatorului de vârstă tânără, cu 2 din următoarele criterii: anamneză de hipertensiune arterială, creatinina serică nu mai mare de 1,5 ori față de valoarea normală, moarte cerebrală prin boală cerebrală acută.

În același timp, moartea cerebrală este asociată cu o serie de complicații, care conduc la deteriorarea organelor donatorului multiplu. Aceste complicații limitează numărul de organe efective pentru transplant și contribuie la creșterea morbidității și mortalității asociate transplantului de organe. Mecanismele care accentuează leziunea de organe sunt: instabilitatea hemodinamică, insuficiența endocrină, răspunsul inflamator sistemic, aritmiile, hipotermia, coagulopatia. Din acest motiv, menținerea conform unor obiective-țintă a donatorului în moarte cerebrală va ameliora calitatea organelor prelevate și va mări numărul de donatori efectivi.

## Material și metode

În perioada anilor 2014-2016, în Secția de terapie intensivă a Spitalului Clinic Municipal „Sfânta Treime” au fost menținuți 49 de donatori în moarte cerebrală, 48 dintre ei fiind donatori

individual waiting times and the number of deaths of people in the waiting list are increased. The main cause of this phenomenon is the lack of transplantable organs. For this reason, acceptance criteria for organ donors are now being revised, as a result, organ transplantation with extended criteria is accepted, and this kind of donors are defined as marginal (extended) donors.

At the same time, relative contraindications for the marginal donor have been proposed. For example, age, hemodynamic instability (inotropic support – increased doses of inotropes), length of hospitalization in the intensive care unit, donor superinfection, hypernatremia, blood group incompatibility, hepatic steatosis and even organ donation from a cardiac arrest donor have become relative contraindications for organ donation. Obviously, these factors increase the degree of hypoxia and the frequency of functional complications related to reperfusion in the organ graft. Another important aspect is the limitations of marginal donor acceptability criteria, which, in fact, are not yet defined. In this context, in 2006, Cameron A. *et al.* (2006) proposed applying the donor index (DI) to assess the donor’s score (Table 1) [3].

**Table 1.** Evaluation of the donor index (according to Cameron A. *et al.*, 2006) [3].

Relative criteria	Donor’s score
Donor’s age >55 years	0 – no extended criteria
Donor’s hospital stay >5 days	1 – donor with 1 criteria
Cold ischemia >10 h	2 – donor with 2 criteria
Warm ischemia >40 min	3 – donor with 3 criteria
	4 – donor with 4 criteria

Thus, marginal donor status can be attributed to any donor older than 60 years, or to the younger donor with 2 of the following criteria: a history of hypertension, serum creatinine not more than 1.5 times from the normal values and death from cerebrovascular accident.

At the same time, cerebral death is associated with a number of complications that have a negative impact on multiple organ donor management. These complications limit the number of effective organs for transplantation and contribute to increased morbidity and mortality associated with organ transplantation. Mechanisms that affect organ damage include: hemodynamic instability, endocrine failure, systemic inflammatory response, arrhythmias, hypothermia and coagulopathy. For this reason, maintaining the donor in the targeted brain death will optimize organ procurement and increase the number of effective donors.

## Material and methods

Between the years 2014-2016, in intensive care unit of Clinical Municipal Hospital “Sfanta Treime” 49 brain-dead donors were maintained, 48 of them were marginal donors. The descriptive retrospective study was performed on the basis of *SIA Transplant Information System* data and organ donors’ files.

marginali. Studiul de tip descriptiv, a fost efectuat retrospectiv, pe baza datelor sistemului informațional *SIA Transplant* și ale dosarelor donatorilor de organe.

Condițiile standard pentru donatorii marginali efectivi, de la care s-au prelevat ficatul și rinichii, au fost următoarele:

- vârsta >55 de ani;
- durata ventilării pulmonare artificiale <5 zile;
- lipsa perioadelor de asistolie sau hipotensiune (PA ≤80/60 mmHg mai mult de 2 ore);
- suport inotrop cu dopamină ≤10 μg/kg/min;
- suport vasopresor cu noradrenalină <500 ng/kg/min;
- lipsa necesității de utilizare a 2 vasopresoare, în doze mari;
- valori normale sau cu mici devieri ale bilirubinei, AST, ALT, ale trombocitelor, ale indicelui protrombinic (la donatorii potențiali de ficat);
- ecogenitatea ficatului normală sau cu mici devieri;
- Na<sup>+</sup> seric <155 mmol/l;
- valorile creatininei serice nu mai mari de 1,5 ori (la donatori de rinichi) față de referință;
- lipsa schimbărilor degenerative, obstructive, inflamatorii în rinichi;
- diureza >100 ml/oră.

Totodată, selecția donatorilor s-a realizat conform „criteriilor minime de 100” (regula lui Gelb): presiunea arterială sistolică >100 mmHg, PaO<sub>2</sub> >100 mmHg, debitul urinar orar ≥100 ml.

Managementul potențialului donator în condițiile secției de terapie intensivă a cuprins următoarele etape:

- aprecierea stării donatorului la examenul primar;
- terapia intensivă țintită și monitorizarea funcției sistemelor de organe;
- investigații adiacente;
- coordonarea cu Agenția Națională de Transplant;
- concluzia de prelevare a anumitor organe;
- intervenția chirurgicală (prelevarea).

Examenul primar al donatorului s-a efectuat în baza fișei medicale, a anamnezei medicale și sociale. În timpul evaluării fizice, s-a atras atenția asupra corespunderii vârstei biologice și vârstei calendaristice (conform buletinului de identitate), la prezența traumatismului cutiei toracice și abdomenului, la urme de intervenții chirurgicale în antecedente. Patologia pulmonară a fost evaluată clinic, prin radiografie toracică de ansamblu și echilibrul acido-bazic. De asemenea, au fost evaluați parametrii clinici și paraclinici ai donatorului (presiunea arterială, presiunea venoasă centrală, hemoglobina, gazometria sanguină, echilibrul acido-bazic, electroliții, creatinina, ureea, ALAT, ASAT, bilirubina). A fost examinat sângele donatorului la unele infecții (hepatitele virale B și C, citomegalovirus, toxoplasmoză, HIV) prin metoda de depistare imunologică a anticorpilor, cu ajutorul testelor expres, în laboratorul „Synevo”.

Drept contraindicații absolute pentru prelevarea de organe au servit:

- infecția sistemică (sepsis);
- afecțiunile oncologice;
- bolile infecțioase (hepatita virală C, sifilisul, SIDA, tuberculoza etc.);

The standard conditions for effective marginal donors, from which the liver and kidneys were sampled, were as follows:

- age >55 years old;
- duration of mechanical ventilation duration <5 days;
- lack of periods of asystole or arterial hypotension (BP ≤80/60 mmHg for more than 2 hours);
- inotropic support with dopamine 10 μg/kg/min;
- norepinephrine vasopressor support <500 ng/kg/min;
- no need of 2 vasopressors in large doses;
- normal or small deviations of bilirubin, AST, ALT, platelets, prothrombin index (in potential liver donors);
- normal or small deviations of the liver echodensity;
- Na<sup>+</sup> serum levels <155 mmol/l;
- serum creatinine values not more than 1.5 times from normal values (in kidney donors);
- lack of degenerative, obstructive and inflammatory changes of the kidneys;
- urine output >100 ml/hour.

At the same time, donors selection was performed according to the «minimum criteria of 100» (Gelb's rule): systolic blood pressure >100 mmHg, PaO<sub>2</sub> >100 mmHg, urinary output ≥100 ml.

The assessment of the potential of the donor under the conditions of the intensive care unit included the following steps:

- assessment of the donor's condition at the primary examination;
- intensive care and monitoring;
- adjacent investigations;
- coordination with the National Transplant Agency;
- the conclusion of harvesting of certain organs;
- surgery (organs prelevation).

The primary donor's examination was based on the medical record, the medical and social history. During physical examination, attention was paid to the correspondence of physical and passport age, trauma of the chest and abdomen and signs of surgery. The presence of pulmonary disease was analyzed clinically, by chest X-ray and acid-base balance. Clinical and paraclinical parameters of the donor (blood pressure and central venous pressure, hemoglobin, blood gases, acid-base balance, electrolytes, creatinine, urea, ALAT, ASAT, bilirubine) were also evaluated. The donor's blood was examined for infections (viral hepatitis B and C, cytomegalovirus, toxoplasmosis, HIV) by immunological antibody detection using express assays in the *Synevo* laboratory.

As absolute contraindications for organ procurement served:

- systemic infection (sepsis);
- oncological diseases;
- infectious diseases such as viral hepatitis C, syphilis, AIDS, tuberculosis etc.;
- MODS (Multiple Organ Dysfunction Syndrome);
- prolonged arterial hypotension.

To monitor the potential of the donor, the central vein and the radial artery were catheterized. Correction of hydroelec-

- MODS (sindromul insuficienței multiple de organe);
- hipotensiunea arterială persistentă.

Pentru monitorizarea potențialului donator, a fost montată o linie venoasă centrală, o linie arterială (a. radială). Compoziția ionică a sângelui a fost menținută și corectată, la necesitate, în funcție de datele de laborator. Cel mai frecvent, au fost utilizate soluțiile de glucoză fără sodiu, pentru a evita sau a combate hipernatremia. Pentru profilaxia diabetului insipid, s-a administrat desmopresină intranasal. Terapia hormonală de substituție s-a efectuat cu metilprednizolon. Episoadele de hiperglicemie au fost contracarate prin perfuzarea intravenoasă continuă de insulină. Anemia a fost corectată prin transfuzie de concentrat eritocitar. Temperatura corpului s-a menținut stabilă cu ajutorul soluțiilor perfuzabile calde și a termofoarelor [3].

### Rezultate

Din cei 48 de donatori marginali, 32 (66,7%) au fost considerați ca fiind efectivi, dintre care 13 (40,6%) au fost bărbați și 19 (59,4%) – femei. Vârsta donatorilor a variat de la 30 de ani până la 75 de ani, media de vârstă fiind de  $62,3 \pm 11,3$  de ani. Astfel, majoritatea donatorilor marginali – 34 de cazuri (70,8%), au avut o vârstă mai mare de 60 de ani.

Cauza principală a decesului donatorilor a constituit-o boala cerebro-vasculară acută – 46 de cazuri (97,9%). Conform datelor obținute, moartea cerebrală a fost constatată, mai frecvent, în rândul femeilor (61,8% dintre cazuri).

De menționat că, în 14 (43,8%) cazuri de donatori efectivi (9 bărbați și 5 femei), s-a renunțat la prelevarea de ficat. Cauzele refuzului de prelevare a ficatului, în peste jumătate din cazuri (60%), au fost hepatopatiile cronice avansate, dintre care steatoza hepatică cu grad avansat (60% dintre cazuri) și ciroza hepatică (40% dintre cazuri). Steatoza hepatică și ciroza hepatică s-au diagnosticat în urma examenului ultrasonografic abdominal (9 cazuri) și intraoperator (5 cazuri). În aceste circumstanțe, au fost luate în considerație și datele de laborator (de exemplu, trombocitopenia, indexul protrombinic).

Cauzele declanșatoare ale morții cerebrale au fost hemoragiile intracerebrale cu erupere în ventricole – 29 (56,8%) de cazuri, ictusuri ischemice masive – 18 (35,3%) cazuri, traumatisme cranio-cerebrale severe, incompatibile cu viața – 4 (7,8%) cazuri.

Toți pacienții au beneficiat de tratament nechirurgical, prescriș în urma consultației comune a neurologului, neurochirurgului, internistului și cardiologului [4]. Durata tratamentului până la declararea morții cerebrale a fost mai mică de 48 de ore în 26 (51%) de cazuri, până la 3 zile – în 19 (37,3%) cazuri, mai mare de 4 zile – în 6 (11,8%) cazuri.

Referindu-ne la comorbiditățile diagnosticate, menționăm predominarea patologiei cardiovasculare, pe prim plan fiind plasată hipertensiunea arterială de gradul III, cu risc adițional înalt – la 43 (89,6%) dintre donatori, urmată de cardiopatia ischemică – la 21 (43,6%) dintre donatori și fibrilația atrială permanentă – la 13 (27,1%) dintre donatori (Tabelul 2). Tratatamentul comorbidităților a fost efectuat conform Protocoalelor Clinice Naționale în vigoare [5]. Donatorii cu insuficiență cardiacă au fost menținuți cu dobutamină și noradrenalină, pe lângă

trolite balance was performed under the control of electrolytes in the blood with the preferred application of glucose solutions without  $\text{Na}^+$  ions to counteract hypernatremia. For the prevention of diabetes insipidus, intranasal desmopressin was applied. Hormone replacement therapy was performed with methylprednisolone. Episodes of hyperglycaemia were counteracted by insulin administration via continuous infusion, anemia was corrected by erythrocyte concentrate substitution. Body temperature was maintained through heated infusions and heat pumps with gradual increase of body temperature [3].

### Results

Of the 48 marginal donors, 32 (66.7%) were considered to be effective, of whom 13 (40.6%) were men and 19 (59.4%) were women. The donor age ranged from 30 to 75 years, the mean age being  $62.3 \pm 11.3$  years, so most marginal donors – 34 cases (70.8%) were older than 60 years.

The main cause of donor death in 46 cases (97.9%) was acute cerebrovascular disease. According to the data obtained, brain death was recorded more frequently among women (61.8% of cases).

It is worth mentioning that in 14 (43.8%) cases of effective donors, of which 9 men and 5 women, we decided not to perform liver sampling. Causes of liver refusals in over half of the cases (60%) were advanced chronic liver disease, of which advanced hepatic steatosis – in 60% of cases and liver cirrhosis – in 40% of cases. Hepatic steatosis and liver cirrhosis were diagnosed by abdominal ultrasound in 9 cases and intraoperatively in 5 cases. In these cases, laboratory tests (e.g., prothrombin index, platelet count etc.) were taken into consideration.

The causes of brain death were intracerebral hemorrhage with eruption in ventricles in 29 (56.8%) cases, massive ischemic strokes – in 18 (35.3%) cases, craniocerebral trauma incompatible with life – in 4 (7.8%) cases.

All patients were subjected to the non-surgical method of treatment after neurologist and neurosurgeon consultation in coordination with internists and cardiologists [4]. The duration of treatment until the brain death was less than 48 hours in 26 (51%) cases, up to 3 days – in 19 (37.3%), more than 4 days – in 6 (11.8%) cases.

Regarding the comorbidities diagnosed, we mention the predominance of cardiovascular diseases, third degree arterial hypertension with high additional risk being ranked first – 43 (89.6%) donors, followed by ischemic heart disease – 21 donors (43.6%) and permanent atrial fibrillation – 13 donors (27.1%) (Table 2). Correction of concomitant diseases was performed according to existing National Clinical Protocols [5]. Donors with heart failure were maintained with dobutamine and noradrenaline on a background of volumetric repletion. It is worth mentioning that 6.25% of potential donors were diagnosed with positive HBsAg, 2.1% of cases were HIV-positive, which are absolute contraindication for organ donation.



repleția volemică de menținere. De menționat că 6,25% dintre potențialii donatori au fost diagnosticați cu AgHBs pozitiv, 2,1% – cu HIV pozitiv, cazuri cu contraindicații absolute pentru donarea de organe.

**Tabelul 2.** Comorbiditățile donatorului în moarte cerebrală.

Comorbidități	anul 2014	anul 2015	anul 2016	Total (%)
Cardiopatie ischemică	6 (12,5%)	5 (10,4%)	10 (20,8%)	21 (43,6%)
HTA <sup>†</sup> gr. III	14 (29,2%)	12 (25%)	17 (35,4%)	43 (89,6%)
Fibrilație atrială	4 (8,3%)	3 (6,3%)	6 (12,5%)	13 (27,1%)
DZ <sup>‡</sup> insulinodependent	1 (2,1%)	1 (2,1%)	5 (10,4%)	2 (4,2%)
ICC <sup>#</sup> cu FE <sup>§</sup> <40%	0	0	3 (6,3%)	3 (6,3%)
Ciroză hepatică	0	2 (4,2%)	3 (6,3%)	5 (10,4%)
BPOC <sup>¶</sup>	2 (4,2%)	2 (4,2%)	2 (4,2%)	6 (12,5%)

Notă: <sup>†</sup>– hipertensiune arterială; <sup>‡</sup>– diabet zaharat; <sup>#</sup>– insuficiență cardiacă congestivă; <sup>§</sup>– fracție de ejeție; <sup>¶</sup>– bronhopneumopatie obstructivă cronică.

Valorile medii ± devierile standard ale parametrilor biochimici principali, determinați în serul donatorilor, au constiuit: creatinina – 113,28±31,43 μmol/l, ALAT – 43,22±10,68 U/l, ASAT – 46,27±19,19 U/l, γ-GGTP – 79,43±61,38 U/l.

Complicațiile, care au fost înregistrate în menținerea donatorului în moartea cerebrală, au fost: hipertensiune arterială tanzitorie – 43 (89,6%) de cazuri, hipokalemie – 24 (50%) de cazuri, acidoză metabolică – 15 (31,3%) cazuri, diabet insipid – 13 (27,1%) cazuri, aritmii – 13 (27,1%) cazuri, asistolie – 1 caz (2,1%), poikilothermie – 1 caz (2,1%).

O durată de menținere a donatorului în moarte cerebrală de 24 de ore s-a înregistrat în 14 (29,2%) cazuri, 12 ore – în 11 (22,9%) cazuri, ≥24 de ore – în 23 (47,9%) de cazuri. Un timp de așteptare a decizei familiei de 24 de ore s-a constatat în 41 (85,3%) de cazuri, 10 ore – în 28 (58,3%) de cazuri, 3 ore – în 4 (8,3%) cazuri.

Refuzuri din partea familiei s-au înregistrat la 11 (22,9%) donatori potențiali, iar în 2 (4,5%) cazuri nu a fost obținut acceptul din partea medicinei legale. Prin urmare, acordul pentru donare a fost obținut în 34 (70,8%) de cazuri.

Echipa de transplantologi a fost prezentă în cel mai scurt timp după decizia pozitivă a familiei, fiind, astfel, minimalizată durata de menținere a donatorului marginal în moarte cerebrală, fapt ce a permis ca prelevarea de organe să decurgă pe un fundal de stabilitate a funcțiilor. În rezultat, au fost prelevate 31 de organe (14 ficăți, 17 rinichi), iar după transplantarea lor nu a fost înregistrat niciun deces în rândul recipientilor.

## Discuții

Conform rezultatelor studiului, menținerea donatorului marginal în moarte cerebrală oferă rezultate certe. Acest tip de donator reprezintă o rezervă imensă, cu un potențial deocamdată, neexplorat. Donatorul marginal permite salvarea multor vieți suplimentare din rândul persoanelor care se află în așteptarea unui organ. Datele noastre sunt similare cu rezultatele raportate de Cameron A. și colegii (2006) [3].

Evaluarea contraindicațiilor relative pentru donare a demonstrat că vârsta, durata ventilării pulmonare artificiale a donatorului nu au avut un impact negativ în menținerea do-

**Table 2.** Comorbidities of the brain dead donors.

Comorbidities	year 2014	year 2015	year 2016	Total (%)
Ischemic cardiopathy	6 (12.5%)	5 (10.4%)	10 (20.8%)	21 (43.6%)
AHT <sup>†</sup> III degree	14 (29.2%)	12 (25%)	17 (35.4%)	43 (89.6%)
Atrial fibrillation	4 (8.3%)	3 (6.3%)	6 (12.5%)	13 (27.1%)
DM <sup>‡</sup> insulin-dependant	1 (2.1%)	1 (2.1%)	5 (10.4%)	2 (4.2%)
CHF <sup>#</sup> cu EF <sup>§</sup> <40%	0	0	3 (6.3%)	3 (6.3%)
Liver cirrhosis	0	2 (4.2%)	3 (6.3%)	5 (10.4%)
COPD	2 (4.2%)	2 (4.2%)	2 (4.2%)	6 (12.5%)

Notă: <sup>†</sup>– arterial hypertension; <sup>‡</sup>– diabetes mellitus; <sup>#</sup>– congestive heart failure; <sup>§</sup>– ejection fraction; <sup>¶</sup>– chronic obstructive pulmonary disease..

The mean values with standard deviation of the main biochemical parameters determined in the donor serum were: creatinine 113.28±31.43 μmol/l, ALAT – 43.22±10.68 U/l, ASAT – 46.27±19.19 U/l, γ-GGTP – 79.43±61.38 U/l.

Complications that were recorded during donor maintenance in brain death were presented by transient hypotension in 43 (89.6%) cases, hypokalemia – in 24 (50%) cases, metabolic acidosis – in 15 (31.3%) cases, insipid diabetes – in 13 cases (27.1%), arrhythmias – in 13 (27.1%), asystole – in one case (2.1%) and poikilothermia – in one case (2.1%).

The duration of donor maintenance in brain death less than 24 hours was recorded in 14 (29.2%) cases, up to 12 hours – in 11 (22.9%) cases, greater than 24 hours – in 23 (47.9%) cases. The waiting time of the family decision less than 24 hours was established in 41 (85.3%) cases, up to 10 hours – in 28 (58.3%) cases, less than 3 hours – in 4 (8.3%) cases.

Family refusals were recorded in 11 (22.9%) potential donors, and in 2 (4.5%) cases, no permission from forensic medicine was obtained. Therefore, the donation agreement was obtained in 34 (70.8%) cases.

The team of transplantologists was present as soon as possible after the positive decision of the family, thus minimizing the donor's maintenance period, which allowed the organ donation procedure in the cerebral death to proceed without destabilizing the donor. As a result, 31 organs (14 livers, 17 kidneys) were taken, and no post-transplant death was recorded for the organ recipient.

## Discussion

According to the results of the study, there are certain advantages in marginal brain-dead donor maintenance activities. This type of donor represents a colossal reserve, with an unrevealed potential yet. This donors can save lives of patients waiting for an organ. Our data being in agreement with the research done by Cameron A. and colleagues (2006) [3].

The evaluation of the relative contraindications for donation showed that age, duration of the donor's mechanical ventilation did not have a negative impact on the maintenance of the marginal donor. Also, comorbidities found in the donor diagnosed with brain death, such as third degree high additional risk arterial hypertension, ischaemic heart disease did not play an important role in decompensation of hemodynamic status.

natorului marginal. De asemenea, comorbiditățile menționate ale donatorului în moarte cerebrală nu au avut vreun rol important în decompensarea hemodinamicii.

În opinia noastră, menținerea donatorului marginal cu debit cardiac redus (fracția de eiecție sub 40%), cu fibrilație atrială permanentă, cu diabet zaharat insulino-dependent sau cu ciroză hepatică trebuie să fie cu o durată cât mai scurtă posibil.

Este necesar de menționat faptul că dezvoltarea complicațiilor survenite în menținerea donatorului marginal în moarte cerebrală este, practic, inevitabilă, survenirea lor fiind în strânsă legătură cu particularitățile maladiei de bază și ale comorbidităților care au contribuit la decesul pacientului. În același timp, diminuarea și contracararea cât mai rapidă a complicațiilor frecvente, survenite în timpul menținerii donatorului (acidoza metabolică, hipokaliemia, hipernatriemia, diabetul insipid, paroxisme ale fibrilației arteriale, edemul pulmonar, asistolia), în majoritatea absolută a cazurilor, este responsabilă față de măsurile terapeutice, fapt constatat în cadrul cercetării de față.

### Concluzii

Donatorii marginali în moarte cerebrală, corect menținuți, reprezintă un suport considerabil în tacticile medicale de prelungire a vieții pacienților cu insuficiență de organ. De aici reiese necesitatea monitorizării țintite a donatorilor marginali aflați în moarte cerebrală, cu corecția imediată a instabilității hemodinamice și dereglărilor metabolice.

Conduita donatorului marginal în moarte cerebrală va lua în considerație vârsta, rezerva biologică de după decompensarea comorbidităților cronice. Menținerea stabilității hemodinamice, perfuziei și oxigenării tisulare adecvate, compoziției electrolitice echilibrate, indicatorilor metabolici și a temperaturii corporale se va face în baza unor obiective terapeutice țintă.

Totodată, menținerea donatorului marginal aflat în moarte cerebrală necesită o abordare multidisciplinară, efectuată de o echipă bine antrenată, rolul principal fiind atribuit medicului reanimatolog și medicului coordonator de transplant, fapt ce va contribui la extinderea donării de organe efective în Republica Moldova.

### Declarația de conflict de interese

Autorii declară lipsa conflictelor de interese.

### Contribuția autorilor

Toți autorii au contribuit în mod egal la elaborarea și scrierea manuscrisului. Versiunea finală a fost citită și acceptată de toți autorii.

### Referințe / references

1. Legea nr. 42-XVI din 06.03.2008 privind transplantul de organe, țesuturi și celule umane. *Monitorul Oficial al Republicii Moldova*, nr. 81/273 din 25.04.2008, modificată prin LP nr.103 din 12.06.2014. MO nr. 185-199 din 18.07.2014, art. 438. (Disponibil la: <http://lex.justice.md/md/327709>).
2. Codreanu I. Managementul sistemului național de transplant. Chișinău, 2015; p. 3
3. Cameron A., Ghobrial R., Yersiz H. *et al.* Optimal utilization of donor grafts with extended criteria. *Ann. Surg.*, 2006; 243 (6): 748-755.
4. Gavriluc M., Grumeza A. ș. a. Moartea cerebrală. Protocol Clinic Standardizat. Chișinău, 2012.
5. Cojocar V., Șandru S. ș. a. Menținerea potențialului donator aflat în moarte cerebrală. Protocol Clinic Standardizat. Chișinău, 2012.

In our opinion, maintaining the marginal donor with a low cardiac output (less than 40% ejection fraction) with permanent atrial fibrillation, with insulin-requiring diabetes mellitus or with liver cirrhosis should be as short as possible.

It is worth mentioning that the development of complications in maintaining the marginal donor in brain death is often inevitable, triggering them closely related to the particularities of the underlying disease and the comorbidities that have contributed to the patient's death. At the same time, the reduction and counteraction of the classical complications during donor maintenance (metabolic acidosis, hypokalemia, hypernatremia, diabetes insipidus, paroxysms of arterial fibrillation, pulmonary edema and asystole) are a realistic goal in a large majority of cases, as was proved in this research.

### Conclusions

Properly maintained marginal brain-dead donors represent a considerable support in medical tactics to extend the life of patients with organ failure. Therefore, it is necessary to perform a targeted monitoring of marginal donors in brain death with immediate correction of hemodynamic instability and metabolic disturbances.

Perioperative management will take into account the donor age reserves, the degree of decompensation of chronic diseases. Hemodynamic stability, appropriate perfusion and tissue oxygenation, electrolyte balance, body temperature and metabolic indices should be maintained based on goal-directed therapeutical objectives.

At the same time, the maintenance of the marginal donor in brain death requires a multidisciplinary approach by well-trained staff, the main role being assigned to the reanimatologist and the transplant coordinating physician, which will contribute to the expansion of effective organ donation in the Republic of Moldova.

### Declaration of conflict of interests

The authors declare no conflicts of interests.

### Authors' contribution

All authors equally contributed to elaborating and writing of the manuscript. The final version was read and accepted by all authors.

## ARTICOL DE SINTEZĂ

## Hiperhomocisteinemia ca factor potențial de risc pentru patologia obstetricală: sinteză de literatură

Elena Visternicean<sup>1\*</sup>, Veaceslav Moșin<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Catedra de obstetrică și ginecologie nr. 2, Universitatea de Stat de Medicină și Farmacie „Nicolae Testemițanu”, Chișinău, Republica Moldova;

<sup>2</sup>Centrul medical „Repromed”, Chișinău, Republica Moldova.

Data primirii manuscrisului: 28.03.2017  
Data acceptării spre publicare: 26.05.2017

### Autor corespondent:

Elena Visternicean, doctorand

Catedra de obstetrică și ginecologie nr. 2

Universitatea de Stat de Medicină și Farmacie „Nicolae Testemițanu”

bd. Ștefan cel Mare și Sfânt, 165, Chișinău, Republica Moldova, MD-2004

e-mail: mecineanuelena@yahoo.com

### Ce nu este, deocamdată, cunoscut la subiectul abordat

Cu toate că în ultimii ani s-a înregistrat o creștere exponențială în cercetarea și înțelegerea rolului aminoacidului homocisteina ca factor potențial de risc pentru diverse patologii, dovezile acumulate sunt, deocamdată, incomplete.

### Ipoteza de cercetare

Identificarea homocisteinei în calitate de potențial factor de risc în sfera obstetricală în evidența științifică publicată.

### Noutatea adusă literaturii științifice din domeniu

Rolul homocisteinei ca potențial factor de risc în dezvoltarea patologiei obstetricale nu este, deocamdată, suficient elucidat. Opiniile cercetătorilor sunt controversate, iar evidența științifică – insuficientă. Sunt necesare studii prospective, multicentrice, pe eșantioane largi de paciente.

### Rezumat

**Introducere.** Nivelul crescut al homocisteinei plasmatică este considerat, în prezent, un factor de risc independent, potențial modificabil, pentru afecțiunile vasculare periferice, cerebrale și coronariene, pentru evenimentele trombotice, inclusiv, complicațiile obstetricale.

**Material și metode.** A fost studiată literatura științifică referitoare la hiperhomocisteinemie și relația ei cu sarcina. Articolele au fost selectate din bazele de date PubMed și Springer Link după cuvintele cheie: „homocysteine”, „vascular injury”, „thrombosis”, „pregnancy”, „miscarriage”, „MTHFR C677T”, „placental abruption”, „pre-eclampsia”, „polymorphism” were selected from the PubMed and Springer Link databases.

## REVIEW ARTICLE

## Hyperhomocysteinemia as a potential risk factor for obstetric pathology: review article

Elena Visternicean<sup>1\*</sup>, Veaceslav Moshin<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Chair of obstetrics and gynecology no. 2, Nicolae Testemitanu State University of Medicine and Pharmacy, Chisinau, Republic of Moldova;

<sup>2</sup>Medical Center “Repromed”, Chisinau, Republic of Moldova.

Manuscript received on: 28.03.2017  
Accepted for publication on: 26.05.2017

### Corresponding author:

Elena Visternicean, PhD fellow

Chair of obstetrics and gynecology no. 2

Nicolae Testemitanu State University of Medicine and Pharmacy

165, Ștefan cel Mare si Sfânt ave., Chisinau, Republic of Moldova, MD-2004

e-mail: mecineanuelena@yahoo.com

### What is not known yet, about the topic

Recent years have shown a dramatic increase in research towards the better understanding of the notoriety of the amino acid homocysteine, although the evidence are incomplete and many research questions remain unanswered.

### Research hypothesis

Identification of homocysteine as a potential risk factor in the sphere of obstetric in published scientific literature.

### Article's added novelty on this scientific topic

The studies were found to be insufficient, the authors' opinion is unequal, which underlines the need for large prospective studies on the validation of the role of homocysteine in the development of obstetric disorders.

### Abstract

**Introduction.** An elevated plasma homocysteine is considered, nowadays, an independent, potentially modifiable risk factor for various forms of vascular disease including peripheral and cerebral vascular disease, coronary heart disease, thrombosis, as well abnormal pregnancy outcomes.

**Material and methods.** Articles containing the keywords “homocysteine”, “vascular injury”, “thrombosis”, “pregnancy”, “miscarriage”, “MTHFR C677T”, “placental abruption”, “pre-eclampsia”, “polymorphism” were selected from the PubMed and Springer Link databases.

*central abruption*”, *“preeclampsia*”, *“polymorphism*”. Informația este prezentată sub formă de sinteză narativă.

**Rezultate.** Există motive biologice plauzibile că nivelul crescut al homocisteinei serice totale, deficitul de foliați și genotipul MTHFR 677TT, reprezintă potențiali factori de risc pentru afecțiunile mediate de insuficiența placentară, cum ar fi preeclampsia, avortul spontan, decolarea de placentă, defectele congenitale. Cu toate acestea, sunt necesare investigații suplimentare pentru a confirma constatările date.

**Concluzii.** Sunt necesare studii prospective, multicentrice, pe eșantioane mari de paciente, care ar valida rolul homocisteinei în dezvoltarea patologiilor obstetricale.

**Cuvinte cheie:** homocisteină, leziune vasculară, tromboză, sarcină, polimorfism, MTHFR, avort spontan recurent.

## Introducere

În ultimele decenii ale secolului al XX-lea, se conturează faptul că aminoacidul homocisteina reprezintă un important factor de risc în patologiile vasculare, patologiile geriatrice, precum și în alte procese fundamentale ale biologiei și medicinei [1]. Homocisteina este un produs intermediar în metabolismul metioninei. Homocisteina este metabolizată pe două căi: remetilare, prin care se regenerează metionina și transsulfurare, prin care degradează până la cisteină și, apoi, taurină. În esență, acest metabolit intermediar – homocisteina – se află într-un punct metabolic critic și tocmai de aceea, direct sau indirect, influențează metabolismul compușilor metabolici metilici și cu sulf în organism [2, 3].

Creșterea concentrației homocisteinei serice este corelată cu creșterea semnificativă a riscului dezvoltării și apariției bolii arteriale coronariene, bolii vasculare periferice, bolii ocluzive cerebrale și retiniene, precum și a infarctului miocardic [2]. Hiperhomocisteinemia reprezintă un factor de risc independent pentru ateroscleroză și aterotromboză [4]. Evidențe experimentale atestă faptul că înclinația aterogenică, atribuită hiperhomocisteinemiei, rezultă din lezarea endoteliului și disfuncția endotelială, urmată de activare plachetară cu formare de trombus [2, 5].

Recent, creșterea nivelului homocisteinei plasmatice a fost corelat cu creșterea semnificativă a riscului apariției complicațiilor obstetricale, așa ca eclampsia, preeclampsia, nașterea prematură, avortul spontan recurent, retardul dezvoltării intrauterine al fătului și decolarea prematură a placentei normal inserate [6, 7]. Datele multiplelor studii au confirmat, deja, unele ipoteze și au respins altele. Din aceste motive, în lucrarea de față ne-am propus să oferim o informație actuală și o analiză sistematizată a literaturii referitoare la impactul homocisteinei în timpul sarcinii.

## Material și metode

Pentru realizarea obiectivului trasat, a fost efectuată căutarea publicațiilor științifice din bazele de date PubMed și Springer Link după cuvintele cheie „*homocysteine*”, „*vascular injury*”, „*thrombosis*”, „*pregnancy*”, „*miscarriage*”, „*MTHFR*”, „*placental abruption*”, „*preeclampsia*”, „*polymorphism*”. Pentru selectarea

**Results.** There are biologically plausible reasons that increased total homocysteine, folate deficiency, and MTHFR 677TT genotype are probable risk factors for placenta-mediated diseases, such as preeclampsia, spontaneous abortion, placental abruption birth defects. However, further investigations are needed to confirm these findings and guide preventative and therapeutic research

**Conclusions.** The results underline the need for large prospective studies on the role of homocysteine on the validation of the role of homocysteine in the development of obstetric disorders.

**Key words:** homocysteine, vascular injury, thrombosis, pregnancy, polymorphism, MTHFR, miscarriage.

## Introduction

In the last decades of the 20th century the amino acid homocysteine has achieved the status of an important risk factor in vascular disease, diseases of aging, and other fundamental processes in biology and medicine [1]. Homocysteine is an intermediate metabolite of methionine metabolism and is itself metabolized by two pathways: the remethylation pathway, which regenerates methionine, and the transsulfuration pathway, which degrades homocysteine into cysteine and then taurine. In essence, the intermediate metabolite homocysteine is located at a critical metabolic crossroad, and therefore both directly and indirectly impacts all methyl and sulfur group metabolism in the body [2, 3].

Increased blood levels of homocysteine are correlated with significantly increased risk of coronary artery disease, peripheral occlusive disease, cerebral occlusive disease, retinal vascular occlusion and myocardial infarction [2]. Homocysteine is known as an independent risk factor for atherosclerosis and atherothrombotic events [4]. Experimental evidence indicates that atherogenic effect of hyperhomocysteinemia results from endothelial cell injury and endothelial dysfunction, followed by platelet activation and thrombus formation [2, 5].

Recently, associations have been observed between abnormally high plasma homocysteine concentrations and abnormal pregnancy outcomes, such as eclampsia, preeclampsia, preterm delivery, recurrent early pregnancy loss, intrauterine growth retardation, and placental abruption [6, 7]. The data of multiple studies have already confirmed some hypotheses and contradicted the others. Therefore, the aim of this study was to present the current information and to perform a systematized literature analysis related to homocysteine impact during pregnancy.

## Material and methods

In order to achieve the given objective, the search of scientific publications was performed by keywords: “*homocysteine*”, “*vascular injury*”, “*thrombosis*”, “*pregnancy*”, “*miscarriage*”, “*MTHFR*”, “*placental abruption*”, “*preeclampsia*”, “*polymorphism*” in the PubMed and Springer Link online databases. For advanced selection of literature sources, the fol-

avansată a surselor bibliografice, au fost aplicate următoarele filtre: lucrările publicate până în decembrie 2016, articole în limba engleză. Au fost selectate articole originale de cercetare (efectuate în condiții clinice, experimentale și *in vitro*), de tip metaanaliză și reviste sistematizate de literatură.

După examinarea titlurilor articolelor obținute, au fost selectate doar lucrările care conțineau informații relevante despre hiperhomocisteinemie și interconexiunea ei cu sarcina. De asemenea, a fost studiată bibliografia articolelor selectate, cu scopul de a găsi alte surse relevante scopului trasat. Informația a fost sistematizată, evidențiind principalele aspecte ale viziunii contemporane asupra metabolismului homocisteinei și metioninei, mecanismele leziunii vaselor sanguine și complicațiile obstetricale. La necesitate, pentru precizarea unor noțiuni, au fost consultate surse adiționale de informație. Publicațiile duplicate, publicațiile care nu au corespuns cu scopul lucrării și care nu au fost accesibile pentru vizionare, au fost excluse din lista publicațiilor generate de motorul de căutare.

## Rezultate

În rezultatul prelucrării informației în bazele de date PubMed și Springer Link conform criteriilor căutării, au fost găsite 1167 de articole care abordează tematica hiperhomocisteinemiei, inclusiv, impactul ei în sarcină. După analiza primară a titlurilor, 568 de articole au fost calificate eventual relevante pentru sinteza dată. După trecerea lor repetată în revistă, au fost selectate, în cele din urmă, 113 publicații relevante scopului trasat. În bibliografia finală a lucrării au intrat 51 de publicații.

### *Metabolismul metioninei și homocisteinei*

Homocisteina este un aminoacid care conține sulf, un produs intermediar în metabolismul normal al metioninei [8, 9]. Metionina este un aminoacid esențial, prezent în dieta naturală. Fiind metabolizată în ciclul metioninei, furnizează grupul metil (o unitate de carbon) pentru reacțiile de transmetilare [8, 10].

În ciclul metioninei, metionina este metabolizată la S-adenozil-metionină (SAM), într-o reacție catalizată de ATP și enzima metionin adenzil-transferaza [11]. SAM reprezintă un donor de grupări metil în numeroase reacții, printre care metilarea ADN-ului, histonelor și a altor proteine, neurotransmițătorilor, fosfolipidelor și sinteza creatinei [11, 12]. Aceste reacții de metilare joacă un rol important în dezvoltarea, expresia genelor și stabilitatea genomică [13].

În reacția de demetilare, SAM este convertit în S-adenozil-homocisteină (SAH) [10, 14]. SAH este reversibil hidrolizat în homocisteină și adenzină de către enzima SAH hidrolaza [10, 11]. În acest moment, homocisteina este situată într-un punct de ramificare metabolică și poate fi degradată ireversibil în cisteină, prin intermediul reacției de transulfurare, fie convertită înapoi la metionină, prin reacția de remetilare [10, 15].

Homocisteina este remetilată la metionină prin reacția de remetilare, catalizată de enzima metionin-sintaza (MTR) și leagă ciclul folatului cu metabolismul homocisteinei [16]. Această cale utilizează folat coenzimele (ciclul folatului) pentru transferul grupării metil, necesar sintezei metioninei [11]. Remeti-

lowing filters were applied: articles published by December 2016, articles in English. Original research articles were selected (conducted in clinical, experimental and *in vitro* conditions), meta-analysis type and systematized literature reviews.

After examining the titles of the obtained articles, only articles that contained relevant information regarding hyperhomocysteinemia and its interconnection with the pregnancy were selected. The bibliography of selected articles was analyzed too, in order to find other articles, relevant to the intended purpose. Information was systematized, highlighting the main aspects of contemporary vision on homocysteine and methionine metabolism, mechanisms of blood vessel injury and pregnancy outcomes. To clarify some notions and facts, additional sources of information were consulted. Duplicate publication, the articles that did not correspond to the purpose of the work and publications that were not accessible for viewing were excluded from the list of publications generated by search engine.

## Results

As a result of information processing in PubMed and Springer Link online databases according to search criteria, 1167 articles were found which approach the topic of hyperhomocysteinemia, including its impact on pregnancy. After having analyzed the titles, 568 articles were classified as possibly relevant to the given review theme. At the end, 113 relevant publications were selected. The final references consist of 51 publications.

### *Methionine and homocysteine metabolism*

Homocysteine is a sulfur-containing intermediate product in the normal metabolism of methionine [8, 9]. Methionine is an essential amino acid that is derived primarily from the diet. It is metabolized in the methionine cycle that functions to provide one carbon methyl unit for transmethylation reactions [8, 10].

In the methionine cycle, methionine is metabolized to S-adenosylmethionine (SAM), in a reaction catalyzed by ATP and the enzyme methionine adenosyltransferase [11]. SAM acts as the methyl donor in many reactions, including the methylation of DNA, histones and other proteins, neurotransmitters, and phospholipids, and the synthesis of creatine [11, 12]. These methylation reactions play important roles in development, gene expression, and genomic stability [13].

In the demethylation reaction SAM leads to the formation of S-adenosylhomocysteine (SAH) [10, 14]. SAH is then reversibly hydrolyzed by SAH hydrolase yielding adenosine and homocysteine [10, 11]. At this point, homocysteine is located at a metabolic branch point and can either be irreversibly degraded to cysteine via the transsulfuration pathway, or conserved by remetilation back to methionine [10, 15].

Homocysteine remetilation to methionine is catalyzed by the methionine synthase enzyme (MTR) and links the folate cycle with homocysteine metabolism [16]. This pathway utilizes a folate coenzyme system (the folate cycle) to provide new methyl groups to regenerate methionine [11]. Homocysteine remetilation occurs by receiving the methyl group

larea homocisteinei se derulează, primind gruparea metil din 5-metilteetrahydrofolat (5-MTHF). La rândul lui, 5-MTHF este produs din 5,10-metilteetrahydrofolat (5,10-MTHF) de către enzima 5,10-metilteetrahydrofolat reductaza (MTHFR), care utilizează FAD (forma activă de vitamina B<sub>2</sub>) în calitate de cofactor [8, 11]. Gruparea metil din 5-MTHF este transferată prin intermediul vitaminei B<sub>12</sub> la homocisteină, în reacția catalizată de MTR cu producerea de tetrahydrofolat (THF) și regenerarea metioninei. THF este, apoi, reciclat la 5,10-MTHF în prezența serinei și vitaminei B<sub>6</sub> prin enzima *serin-hidroximetil-transferaza* (SHMT) [15]. Astfel, enzima MTR folosește vitamina B<sub>12</sub> (cobalamină), în calitate de cofactor și 5-MTHF, ca donor de grup metil [10].

MTR necesită cobalamină (Cbl), în calitate de cofactor și complexul rezultat Cbl(I)MTR leagă gruparea metil din 5-MTHF pentru a forma complexul metil Cbl(III)MTR. După transferul grupului metil către homocisteină, complexul Cbl(I)MTR este reformat și poate accepta o altă grupare metil din 5-MTHF. În această reacție, cofactorul Cbl(I) este oxidat la Cbl(II), care inactivează complexul Cbl(II)MTR. Enzima metionin-sintaza-reductaza (MTRR) reactivează complexul Cbl(II)MTR prin metilarea reductivă, folosind SAM ca donor de grup metil [17]. Această cale este larg răspândită în toate țesuturile, în special, în ficat și rinichi [10], cu excepția eritrocitelor [10, 15]. Activitatea eficientă a acestei reacții necesită o cantitate adecvată de acid folic și enzima MTHFR [10].

Alternativ, în ficat și rinichi, homocisteina poate fi, de asemenea, convertită înapoi la metionină într-o reacție catalizată de enzima betain-homocistein-metil-transferaza (BHMT), care catalizează transferul de grup metil de la betaină la homocisteină, pentru a genera metionină și dimetilglicină, reacția fiind folat-independentă [15, 18].

Reacția de transulfurare constă în degradarea ireversibilă a homocisteinei la cisteină [3, 11]. Reacția este facilitată de acțiunea a două enzime, dependente de vitamina B<sub>6</sub> în calitate de cofactor: enzima cistationin β-sintetază (CBS) și enzima cistationin-γ-liaza (CSE) [10]. CBS catalizează condensarea homocisteinei și serinei pentru a forma cistationina și CSE catalizează, ulterior, hidroliza cistationinei la cisteină și α-cetobutirat [10, 11]. Această cale se produce exclusiv în ficat, rinichi, intestinul subțire și pancreas, și nu se găsește în celulele cardiovasculare și alte țesuturi umane [10].

În condiții fiziologice și metabolice normale, cele două căi se află într-un echilibru strict, lucrând sinergic pentru a menține niveluri scăzute ale concentrației intracelulare și tisulare de homocisteină [10]. SAM joacă un rol central în reglarea metabolismului homocisteinei, prin coordonarea și direcționarea homocisteinei către reacția de transulfurare sau remetilare; este un inhibitor alosteric al enzimei MTHFR și un activator al enzimei CBS [11]. Când nivelurile SAM sunt adecvate pentru a susține cererea de metilare, partiționarea homocisteinei între cele două căi metabolice este aproximativ egală [15].

#### *Nivelul plasmatic al homocisteinei și hiperhomocisteinemia*

Homocisteina este prezentă în plasma umană în diferite forme și diferite proporții [9, 10, 19]. Homocisteina serică totală, prin urmare, este suma tuturor formelor de homocisteină

from 5-methyltetrahydrofolate (5-MTHF). It is produced from 5,10-methylenetetrahydrofolate (5,10-MTHF) by the enzyme 5,10-methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR), which uses FAD (the active form of vitamin B<sub>2</sub>) as cofactor [8, 11]. The methyl group from 5-MTHF is transferred via vitamin B<sub>12</sub> to homocysteine, in a reaction catalyzed by MTR with production of tetrahydrofolate (THF) and regenerating methionine. THF is then recycled to 5,10-MTHF in the presence of serine and vitamin B<sub>6</sub> by the enzyme serine hydroxymethyltransferase (SHMT) [15]. MTR uses cofactor vitamin B<sub>12</sub> (cobalamin) and 5-MTHF as the methyl donor [10].

MTR requires cobalamin (Cbl) as a cofactor, and the resulting complex Cbl(I)MTR, binds the methyl group of 5-MTHF to form methyl Cbl(III)MTR. Upon transfer of the methyl group to homocysteine, Cbl(I)MTR is reformed, which can accept another methyl group from 5-MTHF. Cbl(I) can also be oxidized to Cbl(II), which results in an inactive Cbl(II)MTR complex. Methionine synthase reductase (MTRR) reactivates the Cbl(II)MTR complex by reductive methylation, using SAM as a methyl donor [17]. This pathway is widely distributed in all tissues, with greater activity in the human liver and kidney [10], except red blood cells [10, 15]. The efficient activity of this pathway requires an adequate supply of folic acid and the enzyme MTHFR [10].

Alternatively, homocysteine in liver and kidney can also be converted back to methionine via the folate – independent betaine-homocysteine methyltransferase (BHMT), which catalyzes the transfer of one of the methyl groups of betaine to homocysteine to generate methionine and dimethylglycine [15, 18].

In the transsulfuration pathway homocysteine is irreversibly degraded to cysteine [3, 11]. Transsulfuration is facilitated by the action of two vitamin B<sub>6</sub> – dependent enzymes: cystathionine β-synthase (CBS) and cystathionine γ-lyase (CSE) [10]. CBS catalyzes the condensation of homocysteine and serine to cystathionine and CSE subsequently catalyzes the hydrolysis of cystathionine to cysteine and α-ketobutyrate [10, 11]. This pathway occurs exclusively in the liver, kidney, small intestine, and pancreas and is not found in human cardiovascular cells and tissues [10].

Under normal physiological and metabolic conditions, the two pathways are under strict balance, working synergistically to maintain low levels of intracellular and tissue concentration of homocysteine [10]. SAM plays a central role in the regulation of homocysteine metabolism, by coordinating the fate of homocysteine towards remethylation or transsulfuration pathways; it is an allosteric inhibitor of MTHFR and an activator of CBS activity [11]. When the levels of SAM are adequate to sustain methylation demand, the partitioning of homocysteine between both metabolic pathways is approximately equal [15].

#### *Plasma homocysteine levels and hyperhomocysteinemia*

Homocysteine exists in the human plasma in various forms in different proportions [9, 10, 19]. Total homocysteine, therefore, is the total sum of all forms of homocysteine that exist in plasma or serum [20]. Human plasma contains both

care există în plasmă sau ser [20]. Plasma umană conține atât specii reduse, cât și oxidate de homocisteină. Forma oxidată a homocisteinei cuprinde, de obicei, 98-99% din homocisteina serică totală, din care, în 70-80% homocisteina circulă legată de proteină [16, 20]. Aproximativ 25% din homocisteină se leagă cu ea însăși pentru a forma dimer de homocistină, în timp ce restul (<5%) se leagă cu alți tioli, inclusiv, cisteina, pentru a forma disulfuri mixte homocisteină-cisteină [10]. Concentrația homocisteinei libere (forma redusă) în plasmă este foarte mică și reprezintă mai puțin de 2% din homocisteina serică totală [10, 19].

În stare de repaus alimentar, concentrațiile homocisteinei serice totale sunt cuprinse între 5 și 12  $\mu\text{mol/l}$  [9, 21]. Valori mai mari de acest interval definesc hiperhomocysteinemia, care este clasificată în: moderată (15-30  $\mu\text{mol/l}$ ), intermediară (30-100  $\mu\text{mol/l}$ ) și severă (>100  $\mu\text{mol/l}$ ) [9, 10, 20].

Factorii majori determinanți ai concentrației de homocisteină au fost studiați pe larg de mulți cercetători și includ factori genetici, stilul de viață și dieta deficitară [9, 10, 19, 20]. Există o interacțiune complexă între *multipli* factori genetici, metabolici, precum și de mediu, care trebuie să rămână în echilibru pentru a menține un nivel scăzut de homocisteină. O combinație unică sau modificări ale acestor factori pot influența, în mare măsură, homocisteina serică totală [10, 16]. Există două stări majore care au fost intensiv studiate pentru a explica dezvoltarea hiperhomocysteinemiei: factorii genetici și deficiența de vitamine [9, 10].

Defectele genetice în enzimele responsabile de metabolizarea homocisteinei: MTR, MTHFR, MTRR și CBS sunt capabile să producă creșterea severă a concentrației de homocisteină, iar severitatea depinde de locul mutațiilor genice [10].

Cea mai comună și studiată este mutația genei MTHFR, produsă prin substituția citozinei (C) (alela normală) de timină (T) (alela mutantă) în poziția 677 (677C→T), care convertește în loc de alanină, valină [22]. Mutația homozigotă a genei MTHFR în poziția 677 (T/T) conduce la o enzimă cu stabilitate redusă și activitate specifică și produce o proteină termolabilă [22, 23]. Statusul homozigot al acestei mutații este asociat cu hiperhomocysteinemie, de asemenea, și statusul heterozigot, dar în rândul pacienților cu aport scăzut de acid folic. Se raportează o incidență de 5-25% în populație a statusului homozigot pentru această mutație, iar statusul heterozigot este întâlnit cu o frecvență de 50% [13, 24]. Al doilea cel mai studiat polimorfism al genei MTHFR este A1298C. Acest polimorfism a fost asociat cu o activitate enzimatică scăzută. Este o mutație în care adenina este înlocuită cu citozina în poziția 1298 a exonului 7 a genei MTHFR, iar codonul rezultat va codifica în loc de alanină glutamină și, prin urmare, reduce activitatea enzimatică, care este mai pronunțată în statusul homozigot decât în cel heterozigot [23]. Statusul homozigot pentru MTHFR interferează cu regenerarea metioninei datorită scăderii disponibilității donorului de grup metil MTHF, ceea ce conduce la creșterea homocisteinei intracelular și hiperhomocysteinemie [11, 25]. Deficiența enzimei MTHFR este, de asemenea, frecvent asociată cu concentrații inadecvate de foliați [10].

Enzima MTR este responsabilă pentru regenerarea metioninei din homocisteină. Activitatea redusă a enzimei MTR

reduced and oxidized species of homocysteine. The oxidized form of homocysteine usually comprise 98-99% of total plasma homocysteine in human plasma, 70-80% of which is protein-bound [16, 20]. Approximately 25% of the homocysteine binds with itself to form the dimer homocystine, whereas the remainder (<5%) binds with other thiols, including cysteine, to form a homocysteine - cysteine disulfides mix [10]. The concentration of free homocysteine (reduced form) in plasma is very low and accounts for less than 2% of total plasma homocysteine [10, 19].

In the fasting state, normal plasma levels of homocysteine are between 5 and 12  $\mu\text{mol/l}$  [9, 21]. Values above this range define hyperhomocysteinemia, which can be classified into mild (15-30  $\mu\text{mol/l}$ ), intermediate (30-100  $\mu\text{mol/l}$ ) and severe (>100  $\mu\text{mol/l}$ ) hyperhomocysteinemia [9, 10, 20].

The major determinants of homocysteine levels have been extensively reviewed by many authors and include genetic, dietary and lifestyle factors [9, 10, 19, 20]. There is a complex interaction between multiple genetic, metabolic, and environmental factors that must remain in balance to keep homocysteine levels low. A single or combination of changes in these factors can greatly influence an increase in total serum homocysteine [10, 16]. There are two major disorders that have been heavily studied that explain the development of hyperhomocysteinemia: genetic factors and vitamin deficiency [9, 10].

Genetic abnormalities in the enzymes responsible for homocysteine metabolism: MS, MTHFR, MTRR and CBS, are able to produce a more severe elevation in tHcy levels, and the severity is dependent on the site of the gene mutations [10].

The most common and studied MTHFR gene mutation is produced by the substitution of cytosine (C) (normal allele) by thymine (T) (mutated allele) at nucleotide 677 (677C→T), which converts an alanine residue to a valine [22]. A homozygosity mutation of the gene encoding MTHFR (T/T) produces a thermolabile variant that results in an enzyme with reduced stability and specific activity [22, 23]. Homozygosity is associated with hyperhomocysteinemia, and also heterozygosity among patients with low folate intake. Depending on the population, anywhere from 5% to 25% are homozygous and up to 50% heterozygous for this polymorphism [13, 24]. A second polymorphism in MTHFR (A1298C) has also received much attention. This polymorphism has been associated with a decreased enzyme activity. The adenine to cytosine substitution at nucleotide 1298 in exon 7 of MTHFR gene leads to the substitution of glutamic acid by alanine residue, and therefore, reduces its enzymatic activity, which is more pronounced in the homozygous than the heterozygous state [23]. A homozygous deficiency in MTHFR interferes with regeneration of methionine due to decreased availability of the methyl donor MTHF, resulting in an increased intracellular homocysteine level and hyperhomocysteinemia [11, 25]. MTHFR deficiency is also commonly associated with impaired folate status [10].

MTR is responsible for the regeneration of methionine from homocysteine. Diminished activity of MTR due to a genetic abnormality impairs the remethylation of homocysteine and increases the intracellular homocysteine levels by SAM

din cauza defectelor genetice afectează reacția de remetilare a homocisteinei și crește concentrația homocisteinei intracelulare prin mecanismul SAM dependent [10]. În același timp, MTR și MTRR sunt enzime critice, responsabile de biosinteza metioninei. Cel mai frecvent polimorfism în gena MTR este A2756G, care determină schimbarea de aminoacizi, astfel va codifica în loc de acid aspartic glicina; a fost demonstrată contribuția la alterarea concentrațiilor plasmatică de homocisteină și acid folic [26]. Polimorfismul identificat recent în gena MTRR (66A→G) implică substituția aminoacidului izoleucina cu metionina [27].

Deficitul enzimei CBS este cea mai frecventă cauză genetică a hiperhomocisteiniei severe ereditare și este considerată o boală rară, recisiv autosomală [10]. Pacienții cu deficit de CBS prezintă hiperhomocisteinemie severă și homocistinurie, și dezvoltă complicații vasculare grave precoce [15].

Concentrațiile plasmatică de acid folic, vitamină B<sub>12</sub> și vitamină B<sub>6</sub> sunt invers proporționale cu concentrația de homocisteină serică totală [28, 29], iar aportul insuficient de acid folic și vitamină B<sub>12</sub> duc la scăderea concentrațiilor plasmatică ale ambelor vitamine și creșterea homocisteinei serice totale [29]. Nivelul ridicat de homocisteină este considerat un indicator funcțional de deficit de acid folic și vitamină B<sub>12</sub>, care rezultă din incapacitatea folatilor de a dona gruparea metil necesară pentru a converti homocisteina la metionină [29, 30]. În 2005, *the Third National Health and Nutrition Examination Survey (NHANES III)* a evaluat relația dintre homocisteina serică și folatul seric sau eritrocitar și nivelul seric al vitaminei B<sub>12</sub> și a identificat următoarele valori de departajare pentru deficitul de acid folic și vitamina B<sub>12</sub>, sub care concentrația de homocisteină începe să crească. Astfel, valorile folatului seric <10 nmol/l, folatului eritrocitar <340 nmol/l și vitaminei B<sub>12</sub> <150 pmol/l determină elevarea concentrației homocisteinei serice [29, 30].

#### *Hiperhomocisteinemia și complicațiile vasculare*

Metabolismul homocisteinei se bazează, exclusiv, pe reacția de remetilare, dependentă de acidul folic și vitamina B<sub>12</sub>, deoarece, până în prezent, nu a fost demonstrată existența reacției de transsulfurare în celulele endoteliale vasculare. Din cauza absenței degradării ireversibile a homocisteinei la cisteină, sinteza homocisteinei poate depăși rapid exportul celular, având drept rezultat un prejudiciu celular specific, până la moarte celulară. Comparativ cu alte sisteme de organe, sistemul cardiovascular, prin urmare, este deosebit de sensibil la niveluri ridicate de homocisteină [9].

Hiperhomocisteinemia poate altera morfologia vasculară, stimula inflamația, activa endoteliul și cascada de coagulare a sângelui, și inhiba fibrinoliza. Ca rezultat, hiperhomocisteinemia este asociată cu pierderea funcției antitrombotice a endoteliului vascular și inducerea unui mediu procoagulant [9, 31]. Steed M. și colab. (2011) consideră că trei factori: stresul oxidativ, disfuncția endotelială și remodelarea vasculară sunt principalele mecanisme patologice care stau la baza dezvoltării bolii vasculare mediate de homocisteină [10].

Hiperhomocisteinemia este considerată, în prezent, un factor slab protrombotic [32]. S-a demonstrat rolul protrombo-

- dependent mechanisms [10]. At the same time, MTR and MTRR are critical enzymes responsible for the biosynthesis of methionine. The common polymorphism *MTR* A2756G results in an amino acid change of aspartate to glycine, and has been demonstrated to contribute to alterations in the plasma levels of homocysteine and folate [26]. A common *MTRR* polymorphism (66 A→G) substitution specifying an isoleucine to methionine substitution was recently identified [27].

CBS deficiency is the most common genetic and identifiable cause of severe hereditary hyperhomocysteinemia and is considered a rare recessive autosomal disease [10]. CBS deficient patients have severe hyperhomocysteinemia and homocystinuria, and develop premature serious vascular complications [15].

Plasma levels of folic acid, vitamin B<sub>12</sub> and vitamin B<sub>6</sub> are inversely related to tHcy concentration [28, 29] and inadequate intake of folate and vitamin B<sub>12</sub> leads to low serum or plasma concentrations of both vitamins, and elevated plasma homocysteine [29]. High levels of circulating homocysteine are considered a functional indicator of folate and vitamin B<sub>12</sub> deficiency and results from the inability of folate to donate the methyl group necessary to convert homocysteine to methionine [29, 30]. In 2005, *the Third National Health and Nutrition Examination Survey (NHANES III)* assessed the relationship between homocysteine and plasma or red blood cell folate and vitamin B<sub>12</sub> and identified the cut-off for folate and vitamin B<sub>12</sub> deficiency at the folate and vitamin B<sub>12</sub> concentrations below which homocysteine concentrations start to rise. The serum/plasma folate level <10 nmol/l, the red blood cell folate level <340 nmol/l and plasma vitamin B<sub>12</sub> level <150 pmol/l cause elevation of serum homocysteine concentrations [29, 30].

#### *Hyperhomocysteinemia and vascular damage*

Homocysteine metabolism relies exclusively on folate and vitamin B<sub>12</sub> dependent remethylation reaction since no transsulfuration has to date been demonstrated in endothelial cells of human blood vessels. Because of the absence of irreversible breakdown of homocysteine to cysteine, homocysteine synthesis may rapidly exceed cell export, resulting in specific cell injury to the point of cell death. Compared with other organ systems, the cardiovascular system is therefore particularly sensitive to elevated homocysteine levels [9].

Hyperhomocysteinemia may alter vascular morphology, stimulate inflammation, activate the endothelium and the blood clotting cascade, and inhibit fibrinolysis. As a result, hyperhomocysteinemia is associated with loss of endothelial antithrombotic function and induction of a procoagulant environment [9, 31]. Steed M. *et al.* (2011) believe that three factors: oxidative stress, endothelial dysfunction, and vascular remodeling are the primary pathological mechanisms underlying homocysteine-mediated vascular diseases [10].

Hyperhomocysteinemia is currently considered a relatively weak prothrombotic factor [32]. Rapidly accumulating evidence links elevated homocysteine levels to thrombosis via several mechanisms, such as increased tissue factor expression, attenuated anticoagulant processes, enhanced platelet reactivity, increased thrombin generation, augmented factor V



gen al homocisteinei prin mai multe mecanisme, cum ar fi: expresia crescută a factorului tisular, atenuarea proceselor anticoagulante, favorizarea agregării plachetare, generarea crescută de trombină, activitatea factorului V, potențialul fibrinolitic deficitar și dezvoltarea leziunilor endoteliale, inclusiv, disfuncția endotelială [5, 33, 34]. Mecanismele moleculare care stau la baza complicațiilor trombotice produse de homocisteină sunt incomplet înțelese și implică stresul oxidativ, hipometilarea ADN-ului, asociată cu un efect proinflamator [32].

#### *Homocisteina și sarcina*

Perturbarea metabolizării homocisteinei a fost asociată cu o serie de stări patologice, în special, cu tulburările neurologice, anomaliile congenitale, disfuncția hepatică și renală, cancerul și bolile cardiovasculare. Descoperirea precum că hiperhomocistinemia poate fi, de asemenea, responsabilă pentru apariția mai multor complicații obstetricale, este una recentă. Studiile din acest domeniu sunt, deocamdată, puține și efectuate pe un număr mic de pacienți. Cu toate acestea, este evident faptul că hiperhomocisteinemia este asociată cu avortul spontan recurent, preeclampsia, decolarea prematură a placentei normal inserate, evenimente tromboembolice, defecte ale tubului neural, restricția de creștere intrauterină și moartea intrauterină a fătului.

Femeile însărcinate prezintă valori ale homocisteinei serice totale mai mici decât înafara perioadei de sarcină [21]. Concentrația medie a homocisteinei la femeile gravide este de 5-6  $\mu\text{mol/l}$ , iar concentrații  $>10 \mu\text{mol/l}$  sunt rareori observate. Vollset S. și colab. (2000) sugerează că nivelul plasmatic al homocisteinei  $>10 \mu\text{mol/l}$  este responsabil de apariția complicațiilor în sarcină [6]. Și în cazul femeilor de vârstă reproductivă, homocisteina serică totală este influențată de statutul seric al acidului folic și vitamina B<sub>12</sub> [21]. Andresson A. și colab. (1992) au determinat că niveluri scăzute de homocisteină pot fi identificate al doilea trimestru de sarcină, cu o creștere relativă, de la 32 de săptămâni de gestație și până la termen. O revenire la concentrațiile normale sunt observate după 2-4 zile postpartum [36]. Scăderea homocisteinei nu pare a fi influențată de nivelul estrogenilor sau progesteronului. Hemodiluția și rata sporită a reacției de remetilare a homocisteinei, datorită cererilor crescute de metionină de către făt, ar putea contribui la valorile reduse ale homocisteinei în timpul sarcinii [21, 29]. Suplimentarea cu acid folic poate reduce și mai mult concentrația totală de homocisteină serică pe parcursul sarcinii [37]. Metabolismul acidului folic și homocisteinei sunt interdependente, deoarece folatul este un cofactor necesar pentru enzima MTR, care mediază conversia homocisteinei la metionină [30].

Creșterea homocisteinei serice totale este asociată cu un risc crescut de vasculopatie placentară [21]. Dezvoltarea placentei la etapa timpurie a sarcinii poate fi influențată negativ de creșterea concentrației homocisteinei materne. Studiile experimentale relevă faptul că nivelurile ridicate de homocisteină (16-24  $\mu\text{mol/l}$ ) pot induce stresul oxidativ și efectul citotoxic, ceea ce determină disfuncție endotelială și lezare de endotelium [39]. În plus, expunerea celulelor trofoblastice

activity, impaired fibrinolytic potential, and vascular injury, including endothelial dysfunction [5, 33, 34]. Molecular mechanisms underlying prothrombotic actions of homocysteine are incompletely understood and involve oxidative stress, DNA hypomethylation and proinflammatory effects [32].

#### *Homocysteine and pregnancy*

Disturbances in homocysteine metabolism have been associated with a host of pathologic conditions, including neurological disorders, congenital abnormalities, hepatic and renal dysfunction, cancer and cardiovascular diseases. The discovery that hyperhomocysteinemia may also be responsible for several pregnancy complications has only recently been made. Studies in this area are still scarce and report on limited numbers of patients. It nevertheless appears clear that hyperhomocysteinemia is associated with the syndromes of repeated miscarriage, preeclampsia, placenta abruptio, thromboembolic events, neural tube defects, and with fetal death in utero and intrauterine growth retardation.

Pregnant women have lower plasma tHcy than nonpregnant women [21]. The mean tHcy concentration in pregnant women is 5-6  $\mu\text{mol/l}$ , and tHcy concentrations  $>10 \mu\text{mol/l}$  are rarely observed. Vollset S. *et al.* (2000) suggests that plasma homocysteine  $>10 \mu\text{mol/l}$  is responsible for the complications and adverse outcomes of pregnancy [6]. As with nonpregnant women, tHcy is influenced by cobalamin and folate status [21]. Andresson A. *et al.* (1992) determined that the lowest levels appear to be in the second trimester and a relative increase from about 32 weeks of gestation until term. A return to normal concentrations are seen with 2-4 days postpartum [36]. The decrease of homocysteine does not seem to be related to estrogens or progestogens. Hemodilution and increased remethylation of homocystine due to increased demands of methionine by the fetus might contribute to the reduced homocysteine values during pregnancy [21, 29]. Folic acid supplementation may further reduce the total homocysteine concentration during pregnancy [37]. The metabolism of folate and homocysteine are interrelated, since folate is a necessary cofactor for the MTR enzyme that mediates conversion of homocysteine to methionine [30].

Increased tHcy is associated with an increased risk of a placental vasculopathy [21]. Placental development in early pregnancy may be negatively influenced by increased maternal homocysteine concentrations. Experimental studies revealed that moderately elevated homocysteine concentrations (16-24  $\mu\text{mol/l}$ ) may induce cytotoxic and oxidative stress, leading to endothelial cell impairment [39]. Additionally, exposure of trophoblast cells to homocysteine ( $>15 \mu\text{mol/l}$ ) may increase cellular apoptosis and lead to inhibition of trophoblastic function [30, 39]. Khong and Hague (1999) reviewed the placental pathology in women diagnosed retrospectively to have hyperhomocysteinemia, following a recent history of intrauterine fetal growth restriction or of thromboembolic disease. Most of the placental findings indicated abnormal placentation with absence of trophoblast-induced physiological vascular change in the spiral arteries of the placental bed [30]. Homocysteine is thought to be related to early placentation, so it may affect

la homocisteină (>15  $\mu\text{mol/l}$ ) pot crește apoptoza celulară și inhiba funcția trofoblastică [30, 39]. Savanții Khong și Hague (1999), au evaluat patologia placentară la femeile diagnosticate retrospectiv cu hiperhomocisteinemie, datorită anamnezei obstetricale recente de restricție de creștere intrauterină a fătului sau de boală tromboembolică. Rezultatul a indicat, în cele mai multe cazuri, placentă anormală, cu absența schimbărilor vasculare fiziologice, induse de trofoblast, în arterele spiralate ale patului placentar [30]. Se consideră că homocisteina poate influența placentă timpurie, astfel încât poate afecta creșterea fetală ulterioară [39]. Recent, Di Simone și colab. (2004), au demonstrat faptul că placenta umană este o țintă pentru homocisteină. Atunci când celulele trofoblastice au fost expuse la homocisteină, a fost observată o cascadă de evenimente precum: eliberarea citocromului c în citosol, creșterea celulelor pozitive M30 și clivajul internucleosomal al ADN-ului în fragmente. Ei au sugerat că moartea trofoblastului ar putea reprezenta un mecanism prin care homocisteina provoacă complicațiile obstetricale asociate cu insuficiența placentară [30].

Hiperhomocisteinemia maternă este asociată cu un risc crescut de apariție a malformațiilor congenitale [5], inclusiv, defecte de tub neural (DTN) [40-42], labioschizis, palatoschizis [43] și sindromul Down [44].

Eva Lopez-Quesada și colab. (2003), au observat că hiperhomocisteinemia este prezentă la 18,7% dintre pacientele cu preeclampsie, comparativ cu 3,0% din lotul de control, în al treilea trimestru de sarcină, ceea ce reprezintă un risc de 7,7 ori mai mare de a dezvolta preeclampsia la femeile gravide [45]. Ronnenberg A. și colab. (2002), au constatat că o concentrație serică crescută de homocisteină și o valoare suboptimală a vitaminei B<sub>12</sub> pot crește riscul de naștere prematură [46]. Kramer M. și colab. (2009), au elucidat că homocisteina a fost semnificativ și independent asociată cu riscul de naștere prematură [47].

Datele din studiile de evaluare a prevalenței polimorfismului MTHFR 677C>T (ca determinant genetic al hiperhomocisteinemiei) în diverse complicații ale sarcinii sunt la fel de concludente, cu dovezi puternice de implicare a genotipului TT ca factor de risc pentru decolarea de placenta normal inserată [37]. Studiile efectuate de Nelen W. și colab. (2000) [48], Coulam C. și colab. (2003) [49] și Puri M. și colab. (2013) [50], demonstrează că la femeile însărcinate, hiperhomocisteinemia și polimorfismul MTHFR 677C>T reprezintă factori de risc pentru defecte de tub neural și avortul spontan recurent. Statusul homozigot pentru alela 677T este asociat cu niveluri ridicate de homocisteină, predominant la persoanele care au un nivel plasmatic redus de folat [24]. În plus, nivelul de homocisteină serică poate fi redus la indivizii homozigoți prin suplimentarea cu acid folic. Din acest motiv, toate femeile de vârstă reproductivă ar trebui să administreze suplimente cu acid folic în doză de, cel puțin, 400  $\mu\text{g/zi}$  pe tot parcursul sarcinii [21, 51]. Administrarea acidului folic a demonstrat inhibarea efectelor homocisteinei asupra trofoblastului uman [30].

subsequent fetal growth [39]. Recently, Di Simone *et al.* (2004) provided the first demonstration that human placenta is a target for homocysteine. When trophoblast cells were exposed to homocysteine, a cascade of events was observed: the cytosolic release of cytochrome c, an increase in M30 positive cells and the internucleosomal DNA fragmentation. They suggested that trophoblast death might represent one mechanism by which homocysteine causes pregnancy complications related to placental diseases [30].

Maternal hyperhomocysteinemia is related to birth defects [5], including neural tube defects (NTD) [40-42], orofacial clefts, clubfoot [43] and Down syndrome [44].

Eva Lopez-Quesada *et al.* (2003) observed that hyperhomocysteinemia was present in *preeclampsia group* when compared with those in *control group* (18.7% vs. 3.0%) in the third trimester of pregnancy, which represents that pregnant women had a 7.7-fold higher risk of developing preeclampsia [45]. Ronnenberg A. *et al.* (2002) found that the increased serum homocysteine concentrations and the suboptimal serum levels of vitamin B<sub>12</sub> may increase the risk of premature birth [46]. Kramer M. *et al.* (2009) elucidated that homocysteine was independently associated with the risk of premature birth [47].

Data from studies assessing the prevalence of the MTHFR 677C>T variant (as a genetic determinant of elevated total homocysteine) on various complications of pregnancy are similarly inconclusive, with the strongest evidence implicating TT genotype as a risk factor for abruptio placentae [37]. Studies conducted by Nelen W. *et al.* (2000), Coulam C. *et al.* (2003) and Puri M. *et al.* (2013) [50] demonstrates that in pregnant women hyperhomocysteinemia and MTHFR 677C>T polymorphism are risk factors for NTD and recurrent embryo loss. Homozygosity for the 677T allele is associated with elevated homocysteine levels, predominantly in individuals who have a low plasma folate level [24]. Furthermore, the level of plasma homocysteine can be lowered in homozygous individuals by folate supplementation. For this reason, all women of childbearing age should have a folate intake of at least 400  $\mu\text{g/day}$  during the pregnancy [21, 51]. Folic acid demonstrated a significant inhibition of the effects of homocysteine on human trophoblast [30].

## Discussion

Data from multiple studies suggest that elevated homocysteine levels was associated with higher risk of thrombotic events and cardiovascular disease. These achievements have contributed to a substantial extent in assessment of the role of serum homocysteine in the sphere of obstetric. Gained clinical experience allowed establishing a relationship between hyperhomocysteinemia and the risk of adverse outcomes of pregnancy, but definitive and clear answers remains elusive.

Recent studies have highlighted the importance of the determination of total serum homocysteine, particularly in women of childbearing age who have experienced pregnancy complications, such as: pregnancy affected by NTD, children

## Discuții

Datele multiplelor studii, efectuate până acum, sugerează faptul că nivelele crescute de homocisteină sunt asociate cu riscul trombozei și al bolilor cardiovasculare. Aceste realizări au contribuit, într-o măsură substanțială, la evaluarea rolului homocisteinei serice în sfera obstetricală. Experiența, acumulată în practica clinică, a permis stabilirea interconexiunii dintre hiperhomocisteinemie și riscul apariției patologiilor obstetricale, dar un răspuns definitiv și clar rămâne, însă, evaziv.

Studiile recente atestă importanța determinării nivelului homocisteinei serice, în special, la pacientele de vârstă reproductivă cu antecedente obstetricale complicate, așa ca: sarcină afectată de DTN, nașterea copiilor cu DTN, anomalii congenitale, preeclampsie, naștere prematură [21]. Din alt punct de vedere, numărul studiilor concludente care au avut drept obiectiv evaluarea rolului homocisteinei și impactului ei în patologia obstetricală și reproductivă, este încă foarte mic. Aceasta ar impune efectuarea unei analize riguroase, ce presupune ca cercetările să poarte un caracter prospectiv, grupurile de paciente în studiu să fie omogene și comparabile, utilizarea aceluiași protocol standard și complet de urmărire, cuantificare și evaluare a rezultatelor, care să permită identificarea și demonstrarea fără echivoc a unor eventuale corelații între acumularea homocisteinei serice și riscul în dezvoltarea și apariția patologiilor obstetricale.

Un alt aspect, considerat important, este legătura dintre homocisteină și statutul vitaminelor grupului B. În ultimii ani, există un interes tot mai mare față de acidul folic și vitamina B<sub>12</sub> datorită conștientizării faptului că statutul acestor vitamine joacă un rol important în reproducere. Pe de altă parte, în prezent, cel mai important indicator funcțional pentru concentrațiile de acid folic și vitamina B<sub>12</sub> este homocisteina serică totală. Această proprietate conferă concentrațiilor de homocisteină din plasmă calitatea de indicator al statutului de folat și vitamina B<sub>12</sub> [30]. Relația dintre homocisteină, vitaminele grupului B și complicațiile sarcinii este mai complexă și trebuie luată în considerare. În general, sursele bibliografice, identificate pentru această sinteză de literatură, susțin ipoteza că un deficit de acid folic și/sau vitamină B<sub>12</sub> conduce la o hiperhomocisteinemie ușoară. Din acest motiv, toate femeile de vârstă fertilă trebuie să administreze suplimente cu acid folic în doză de, cel puțin, 400 μg/zi pe tot parcursul sarcinii [21, 51].

## Concluzii

Există motive biologice plauzibile precum că nivelul crescut al homocisteinei serice totale reprezintă un factor de risc pentru afecțiunile mediate de insuficiența placentară, cum ar fi: preeclampsia, avortul spontan, decolarea de placentă, defecte congenitale. Totuși, studiile din acest domeniu sunt, deocamdată, puține și efectuate pe un număr mic de persoane. Lucrarea de față subliniază necesitatea derulării unor studii prospective, multicentrice, pe eșantioane mari, pentru a preciza rolul homocisteinei în dezvoltarea patologiilor obstetricale.

born with NTD, *congenital anomalies*, preeclampsia, recurrent early pregnancy loss, premature delivery [21]. From another point of view, the number of studies which attempted to evaluate the role of homocysteine and its impact on obstetric and reproductive pathology is still very small. This requires a rigorous analysis by doing a prospective cohort studies with homogeneous group of patients, using the same protocol standards, quantifying and evaluating the results, that will allow for the unequivocal identification and demonstration of possible correlations between elevated serum homocysteine concentrations and the risk of complications and adverse outcomes of pregnancy.

Another aspect considered important is the link between the homocysteine and B vitamins status. In recent years there has been growing interest in the vitamins folic acid and vitamin B<sub>12</sub> because of the realization that the status of these vitamins play an important role in reproduction. By the other hand, currently, the most important functional indicator is tHcy concentrations for folate and vitamin B<sub>12</sub>. These features make plasma homocysteine concentrations a good indicator of folate and vitamin B<sub>12</sub> status [30]. This relationship between homocysteine, B vitamins and pregnancy outcomes is more complicated, and the interaction between these factors must be considered. Generally speaking, these data collected for this review support the hypothesis that a compromised maternal folate and/or vitamin B<sub>12</sub> status lead to a mild hyperhomocysteinemia, for this reason, all women of childbearing age should have a folate intake of at least 400 μg/day during the pregnancy [21, 51].

## Conclusions

There are biologically plausible reasons that increased total serum homocysteine is a probable risk factor for placenta-mediated diseases, such as preeclampsia, spontaneous abortion, placental abruption birth defects. However, there are only few studies in this field and small numbers of patients have been reported. Our results underline the need of large prospective studies to evaluate the role of homocysteine in all types of complications and adverse outcomes of pregnancy.

## Declaration of conflicting interests

Authors declare no financial or non-financial conflict of interests.

## Authors' contribution

EV proposed the concept and design of the present manuscript, performed the selection of the literature and contributed to the drafting of the text. VM has performed critical reviews and contributed to the editing of the manuscript. The final manuscript was read and approved by all the authors.

### Declarația de conflict de interes

Autorii declară lipsa conflictului de interese financiare sau nonfinanciare.

### Contribuția autorilor

EV a propus conceptul și design-ul studiului, a efectuat selecția literaturii și a contribuit la elaborarea și redactarea textului manuscrisului. VM a efectuat o analiză critică și a ajutat la redactarea manuscrisului. Manuscrisul final a fost citit și aprobat de către toți autorii.

### Referințe / references

- McCully K. The Biomedical Significance of Homocysteine. *Journal of Scientific Exploration*, 2001; 15 (1): 5-20.
- Hurjui L. ș. a. Impactul clinic al hiperhomocisteinemiei: rol, cauze, tratament. *Clasic și modern în fiziopatologie. O abordare integrativă în educație și cercetare*, 2015: 229-235.
- Alan L. et al. Homocysteine metabolism: nutritional modulation and impact on health and disease. *Alternative Medicine Review*, 1997; 4: 234-254.
- Forges T. et al. Impact of folate and homocysteine metabolism on human reproductive health. *Human Reproduction*, 2007; 13 (3): 225-238.
- Gerdes V. et al. Homocysteine and markers of coagulation and endothelial cell activation. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, 2003; 2: 445-451.
- Vollset S. et al. Plasma total homocysteine, pregnancy complications, and adverse pregnancy outcomes: the Hordaland Homocysteine Study. *American Journal of Clinical Nutrition*, 2000; 71: 962-8.
- Picciano M. Is homocysteine a biomarker for identifying women at risk of complications and adverse pregnancy outcomes? *American Journal of Clinical Nutrition*, 2000; 71: 857-858.
- Den Heijer M. et al. Homocysteine, MTHFR and risk of venous thrombosis: a meta-analysis of published epidemiological studies. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, 2000; 3 (2): 292-299.
- Stanger O. et al. Clinical use and rational management of homocysteine, folic acid, and B vitamins in cardiovascular and thrombotic diseases. *Zeitschrift für Kardiologie*, 2004; 93: 439-453.
- Steed M., Tyagi S. Mechanisms of cardiovascular remodeling in hyperhomocysteinemia. *Antioxidants & Redox Signaling*, 2011; 15 (7): 1927-43.
- Finkelstein J. The metabolism of homocysteine: pathways and regulations. *European Journal of Pediatrics*, 1998; 157 (supplement 2): S40-S44.
- Selhub J. Public health significance of elevated homocysteine. *Food and Nutrition Bulletin*, 2008; 29 (2) (supplement): S116-S125.
- Shane B. Folate and vitamin B12 metabolism: overview and interaction with riboflavin, vitamin B6, and polymorphisms. *Food and Nutrition Bulletin*, 2008; 29 (2) (supplement): S5-S16.
- Chen N. et al. Regulation of homocysteine metabolism and methylation in human and mouse tissues. *The FASEB Journal*, 2010; 24: 2804-2817.
- Rocha M. Crossroads of homocysteine, nitric oxide and asymmetric dimethylarginine metabolisms. Involvement of S-adenosylhomocysteine and impaired cellular methylation. Lisbon, 2012: 15-25.
- Djuric D. et al. Homocysteine, folic acid and coronary artery disease: possible impact on prognosis and therapy. *The Indian Journal of Chest Diseases & Allied Sciences*, 2008; 50: 39-48.
- Blom H., Smulders Y. Overview of homocysteine and folate metabolism. With special references to cardiovascular disease and neural tube defects. *J. Inherit. Metab. Dis.* 2011; 34 (1): 75-81.
- Eldibany M., Caprini J. Hyperhomocysteinemia and thrombosis. *Archives of Pathology & Laboratory Medicine*, 2007; 131: 872-884.
- Rasmussen K., Moller J. Total homocysteine measurement in clinical practice. *Annals of Clinical Biochemistry*, 2000; 37: 627-48.
- Jacobsen W. Homocysteine and vitamins in cardiovascular disease. *Clinical Chemistry*, 1998; 44, 8 (B): 1833-1843.
- Refsum H. et al. Facts and recommendations about total homocysteine determinations: an expert opinion. *Clinical Chemistry*, 2004; 50 (1): 3-32.
- Zetterberg H. Methylenetetrahydrofolate reductase and transcobalamin genetic polymorphisms in human spontaneous abortion: biological and clinical implications. *Reproductive Biology and Endocrinology*, 2004; 2: 7.
- Li W. et al. Homocysteine metabolism gene polymorphisms (MTHFR C677T, MTHFR A1298C, MTR A2756G and MTRR A66G) jointly elevate the risk of folate deficiency. *Nutrients*, 2015; 7: 6670-87.
- Durand P. et al. Impaired homocysteine metabolism and atherothrombotic disease. *Laboratory Investigation*, 2001; 5: 645-672.
- Guilliams T. Homocysteine – a risk factor for vascular diseases: guidelines for the clinical practice. *The Journal of the American Nutritional Association*, 2004; 7: 10-24.
- de Cássia Carvalho Barbosa R. et al. Interaction of MTHFR C677T and A1298C, and MTR A2756G gene polymorphisms in breast cancer risk in a population in Northeast Brazil. *Anticancer Res.*, 2012; 32 (11): 4805-11.
- Gaughan D. et al. The methionine synthase reductase (MTRR) A66G polymorphism is a novel genetic determinant of plasma homocysteine concentrations. *Atherosclerosis*, 2001; 157 (2): 451-6.
- Green R. Indicators for assessing folate and vitamin B<sub>12</sub> status and for monitoring the efficacy of intervention strategies. *Food and Nutrition Bulletin*, 2008; 2 (supplement): S52-S63.
- WHO. Conclusions of a WHO Technical Consultation on folate and vitamin B12 deficiencies. *Food and Nutrition Bulletin*, 2008; 29 (2) (supplement): S238-S244.
- WHO. Serum and red blood cell folate concentrations for assessing folate status in populations. Vitamin and Mineral Nutrition Information System. Geneva, World Health Organization, 2012. Disponibil la adresa: [http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/75584/1/WHO\_NMH\_NHD\_EPG\_12.1\_eng.pdf]. Accesat pe: 22.03.2017

31. Antoniadou C. *et al.* Homocysteine and coronary atherosclerosis: from folate fortification to the recent clinical trials. *European Heart Journal*, 2009; 30: 6-15.
32. Undas A., Brozek J., Szczeklik A. Homocysteine and thrombosis: from basic science to clinical evidence. *Thromb. Haemost.*, 2005; 94 (5): 907-15.
33. Harpel P. *et al.* Homocysteine and hemostasis: pathogenic mechanisms predisposing to thrombosis. *The Journal of Nutrition*, 1996; Suppl.: 1285S-1289S.
34. Weiss N. Mechanisms of increased vascular oxidant stress in hyperhomocysteinemia and its impact on endothelial function. *Current Drug Metabolism*, 2005; 6: 27-36.
35. Patel A. *et al.* Effect of homocysteine, vitamin B12, folic acid during pregnancy. *NHL Journal of Medical Sciences*, 2012; 1 (1): 27-31.
36. Andersson A. *et al.* Decreased serum homocysteine in pregnancy. *Eur. J. Clin. Chem. Biochem*, 1992; 30: 377-379.
37. Molloy A. *et al.* Effects of folate and vitamin B12 deficiencies during pregnancy on fetal, infant, and child development. *Food and Nutrition Bulletin*, 2008; 29 (2) (supplement): S101-S111.
38. Di Simone N. *et al.* Effect of folic acid on homocysteine-induced trophoblast apoptosis. *Molecular Human Reproduction*, 2004; 10 (9): 665-669.
39. Bergen N. *et al.* Homocysteine and folate concentrations in early pregnancy and the risk of adverse pregnancy outcomes: the Generation R Study. *BJOG*, 2012; 119 (6): 739-751.
40. Mills J. *et al.* Homocysteine metabolism in pregnancies complicated by neural-tube defects. *Lancet*, 1995; 345: 149-151.
41. Steegers-Theunissen R. *et al.* Neural tube defects and elevated homocysteine levels in amniotic fluid. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, 1995; 172: 1436-1441.
42. Ubbink J. Is an elevated circulating maternal homocysteine concentration a risk factor for neural tube defects? *Nutrition Reviews*, 1995; 53: 173-175.
43. Wong W. *et al.* Nonsyndromic orofacial clefts: association with maternal hyperhomocysteinemia. *Teratology*, 1999; 6: 253-257.
44. James S. *et al.* Abnormal folate metabolism and mutation in the methylenetetrahydrofolate reductase gene may be maternal risk factors for Down syndrome. *American Journal of Clinical Nutrition*, 1999; 70: 495-501.
45. López-Quesada E. *et al.* Plasma total homocysteine in uncomplicated pregnancy and in preeclampsia. *European Journal of Obstetrics and Gynecology and Reproductive Medicine*, 2003; 108 (1): 45-49.
46. Ronnenberg A. *et al.* Preconception homocysteine and B vitamin status and birth outcomes in Chinese women. *American Journal of Clinical Nutrition*, 2002; 76: 1385-1391.
47. Kramer M. *et al.* Vasculopathic and thrombophilic risk factors for spontaneous preterm birth. *International Journal of Epidemiology*, 2009; 38: 715-723.
48. Nelen W. *et al.* Homocysteine and folate levels as risk factors for recurrent early pregnancy loss. *Obstetrics and Gynecology*, 2000; 95: 519-524.
49. Coulam C. *et al.* Multiple thrombophilic gene mutations rather than specific gene mutations are risk factors for recurrent miscarriage. *American Journal of Reproductive Immunology*, 2006; 55 (5): 360-368.
50. Puri M. *et al.* MTHFR C677T polymorphism, folate, vitamin B12 and homocysteine in recurrent pregnancy losses: a case control study among North Indian women. *Journal of Perinatal Medicine*, 2013; 41 (5): 549-554.
51. WHO. WHO recommendations on antenatal care for a positive pregnancy experience. Geneva, World Health Organization, 2016. Disponibil la adresa: [<http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/250796/1/9789241549912-eng.pdf?ua=1>] Accesat pe: 22.03.2017.

ARTICOL DE SINTEZĂ

## Administrarea surfactantului la nou-născuții prematuri: sinteză narativă de literatură

Larisa Crivceanscaia<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Departamentul pediatrie și neonatologie, Universitatea de Stat de Medicină și Farmacie „Nicolae Testemițanu”, Chișinău, Republica Moldova.

Data primirii manuscrisului: 07.11.2016

Data acceptării pentru publicare: 06.06. 2017

Autor corespondent:

Larisa Crivceanscaia, dr. șt. med., conf. univ.

Departamentul pediatrie și neonatologie

Universitatea de Stat de Medicină și Farmacie „Nicolae Testemițanu”

bd. Ștefan cel Mare și Sfânt, 165, Chișinău, Republica Moldova, MD-2004

e-mail: crivceanscaialarisa@yahoo.com

### Ce nu este cunoscut, deocamdată, la subiectul abordat

Nu sunt suficient de bine sistematizate beneficiile, limitările și efectele pe termen scurt și lung ale diferitor metode invazive și noninvazive de administrare a surfactantului la nou-născuții prematuri cu sindrom de detresă respiratorie.

#### Ipoteza de cercetare

Metodele non-invazive de administrare a surfactantului sunt, cel puțin, tot atât de sigure și de eficiente, ca și cele invazive în tratamentul sindromului de detresă respiratorie la nou-născuții prematuri.

#### Noutatea adusă literaturii științifice din domeniu

Tehnicile de ventilare pulmonară artificială noninvazivă, aplicate nou-născuților prematuri cu sindrom de detresă respiratorie, permit utilizarea noilor tehnici de administrare a surfactantului. Tehnicile INSURE și LISA de administrare a surfactantului s-au dovedit a fi eficiente și sigure în tratamentul sindromului de detresă respiratorie acută la nou-născuții prematuri, însă eterogenitatea rezultatelor studiilor impun efectuarea de noi cercetări.

### Rezumat

**Introducere.** Metodele de administrare a surfactantului au cunoscut, pe parcursul anilor, o evoluție, începând cu metoda invazivă INSURE, până la administrarea non-invazivă, metoda LISA. Aceasta din urmă, aplicată la nou-născuții cu termen de gestație de 28-32 de săptămâni, a demonstrat o rată înaltă de succes, cu complicații aferente ne semnificative.

REVIEW ARTICLE

## Surfactant administration in premature newborns: narrative synthesis of literature

Larisa Crivceanscaia<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Department of pediatrics and neonatology, Nicolae Testemitanu State University of Medicine and Pharmacy, Chisinau, Republic of Moldova.

Manuscript received on: 07.11.2016

Accepted for publication on: 06.06.2017

Corresponding author:

Larisa Crivceanscaia, PhD, assoc. prof.

Department of pediatrics and neonatology

Nicolae Testemitanu State University of Medicine and Pharmacy

165, Ștefan cel Mare și Sfânt ave., Chisinau, Republic of Moldova, MD-2004

e-mail: crivceanscaialarisa@yahoo.com

### What is not known, about the topic

The benefits, limits and effects of various invasive and non-invasive methods of surfactant administration in premature newborns, with respiratory distress syndrome, are insufficiently systematized.

#### Research hypothesis

Non-invasive methods of surfactant administration are, at least, as safe and effective as those invasive in the treatment of respiratory distress syndrome in premature newborns.

#### Article's added novelty on the scientific topic

Non-invasive artificial ventilatory techniques, applied to premature newborns with respiratory distress syndrome, allow the use of new surfactant techniques. INSURE and LISA, surfactant administration techniques, have been shown to be effective and safe in the treatment of acute respiratory distress syndrome in premature newborns, but the heterogeneity of study results requires further researches.

### Abstract

**Introduction.** Methods of surfactant administration have evolved over the years, beginning with the invasive INSURE method, to non-invasive administration, the LISA method. The latter, applied to 28-32 weeks gestation newborn babies, showed a high success rate with insignificant afflictions.

**Material and methods.** The material was synthesized

**Material și metode.** Materialul a fost sintetizat în baza articolelor internaționale – studii randomizate, de cohortă, cazuri clinice ș. a. din ultimii 10 ani și din câteva articole mai vechi, pentru a elucida originea și cursul terapiei cu surfactant. În această sinteză, au intrat publicațiile accesibile în limbile română, engleză și rusă, identificate de motorul de căutare *Google Search*.

**Rezultate.** Majoritatea nou-născuților prematuri necesită suport respirator în perioada de adaptare extrauterină. O abordare modernă în managementul unui nou-născut prematur presupune utilizarea metodelor non-invazive de administrare a surfactantului (LISA) și de ventilare pulmonară artificială. Una din strategiile de inițiere a sintezei și de îmbunătățire a calității surfactantului este terapia antenatală cu glucocorticosteroizi. Administrarea surfactantului după naștere reduce necesitatea în oxigen și în ventilare pulmonară artificială. Folosirea precoce a nCPAP permite de a evita ventilarea pulmonară artificială și complicațiile aferente.

**Concluzii.** Utilizarea metodei LISA este sigură, nu implică riscuri sporite și este benefică în managementul nou-născutului prematur în vederea reducerii expunerii la ventilarea pulmonară artificială. Evitarea ventilării pulmonare artificiale diminuează răspunsul inflamator local, pulmonar și cel sistemic, cu efecte pozitive, rată de supraviețuire sporită și fără complicații majore. Această metodă poate fi ușor aplicată în practică. Totuși, limitarea cea mai importantă a metodei rămâne imposibilitatea aplicării la vârste de gestație foarte mici și la nou-născuții în stare extrem de gravă la naștere sau la internare, care necesită, neapărat, intubare orotraheală, ventilare pulmonară artificială și administrare imediată de surfactant.

**Cuvinte cheie:** surfactant, nou-născut prematur, LISA, INSURE.

## Introducere

De-a lungul anilor, s-au utilizat diverse metode de administrare a surfactantului la nou-născuți, fiecare cu avantajele și dezavantajele ei. Ultima dintre elaborări, numită abordarea INSURE, constă în intubarea nou-născuților cu sindrom de detresă respiratorie, administrarea precoce a surfactantului, tendința de extubare precoce și continuarea suportului ventilator prin tehnici noninvazive. Sugarii care au beneficiat de metoda INSURE, au avut o durată mai redusă de ventilare pulmonară artificială și o rată mai redusă de complicații, asociate ventilării mecanice (pneumotorax, leziuni pulmonare). O evidență sistematizată a riscurilor și beneficiilor metodei INSURE pe termen lung nu a fost, deocamdată, efectuată [1, 2].

Pentru nou-născuții prematuri, cu respirație spontană patentă, a fost elaborată o altă metodă de administrare a surfactantului, numită LISA. Aceasta constă în pulverizarea intratraheală de surfactant prin intermediul unei sonde gastrice sau cateter arterial, plasat între corzile vocale ale pacientului [3-5]. Metoda LISA, aplicată la nou-născuții cu vârste de gestație de 28-32 de săptămâni, a demonstrat o rată înaltă de succes, cu complicații nesemnificative, determinate de proce-

on the basis of international articles – randomized studies, cohorts, clinical cases and others over the past 10 years and some older articles to clarify the origin and course of surfactant therapy. In this synthesis, have been included, the publications available in romanian, english and russian, identified by the *Google Search*.

**Results.** Most premature newborns require respiratory support, during the extrauterine adaptation period. A modern approach to the management of a premature newborn, involves the use of non-invasive methods of surfactant (LISA) and artificial pulmonary ventilation. One of the strategies for initiating synthesis and improving the quality of the surfactant is antenatal therapy with glucocorticosteroids. Administration of the surfactant after birth, reduces the need for oxygen and artificial pulmonary ventilation. Early use of nCPAP allows to avoid artificial pulmonary ventilation and related complications.

**Conclusions.** Using the LISA method is safe, does not involve increased risks and is beneficial in premature neonatal management to reduce exposure to artificial pulmonary ventilation. Avoiding artificial lung ventilation diminishes local, pulmonary and systemic inflammatory response with positive effects, increased survival and no major complications. This method can be easily applied in practice. However, the most important restriction of the method, remains the impossibility of applying it to very young gestation age and to babies in extremely serious condition at birth or hospitalization, which necessarily require orotracheal intubation, artificial pulmonary ventilation and immediate administration of surfactant.

**Key words:** surfactant, premature newborn, LISA, INSURE.

## Introduction

Over the years, have been used various methods of administering the surfactant to newborns, each with its advantages and disadvantages. One from the latest elaborations, called the INSURE approach, consists of intubation of newborns with respiratory distress syndrome, early administration of surfactant, early extubation tendency and further ventilator support through non-invasive techniques. Infants who benefited from the INSURE method had a shorter duration of artificial pulmonary ventilation and a lower rate of complications, associated with mechanical ventilation (pneumothorax, pulmonary lesions). A systematic evidence of the long-term risks and benefits of the INSURE method has not been performed [1, 2].

For premature newborns with evident spontaneous breathing, has been developed another method of administration of surfactant, called LISA. It consists of intratracheal spraying of the surfactant via a gastric probe or arterial catheter, placed between the patient's vocal cords [3-5]. The LISA method, applied to newborns with gestational age of 28-32 weeks, demonstrated a high success rate, with insignificant complications, determined by the proper procedure [6]. The scientific evidence of the feasibility of the LISA method is also limited, for now.

dura propriu-zisă [6]. Evidența științifică a fezabilității metodei LISA este și ea, limitată, deocamdată.

Scopul acestei reviste de literatură a fost sistematizarea datelor contemporane referitoare la sistemul surfactant al nou-născutului, precum și la elucidarea avantajelor și dezavantajelor metodelor non-invasive, comparativ cu cele invazive de administrare a surfactantului.

### **Sistemul surfactant**

Surfactantul reprezintă o emulsie de lipide (90%), proteine (10%), glucide și ioni. Frația de lipide este formată din fosfolipide superficial-active, dintre care circa 70% în surfactantul uman matur o reprezintă lecitina (dipalmitoil-fosfatidilcolina – DPPC) și circa 10% – fosfatidil glicerolul. Înafara acestor componente, surfactantul mai conține cantități mici de plasminogen, acizi grași nesaturați (AGNS) și colesterol. Plasminogenul și colesterolul îmbunătățesc semnificativ proprietățile tensioactive ale componentei lipidice [7, 8]. Conținutul sporit de AGNS și plasminogen în secreția traheală scade riscul de dezvoltare a bolii pulmonare cronice [7, 9].

Componentele surfactantului fetal se schimbă pe parcursul dezvoltării plămânilor. În prezent, sunt cunoscute 4 proteine specifice ale surfactantului: PS-A, PS-B, PS-C și PS-D, care se sintetizează de către pneumocitele de tip II. Ele au masă moleculară, structură, proprietăți chimice și rol fiziologic diferit în formarea mielinei tubulare intraalveolare, a peliculei superficial-active la interfața hidroaerică și în procesele de homeostază a surfactantului [7].

Surfactantul din plămâni imaturi conține o cantitate mare de fosfatidilinositol, însă o cantitate redusă de fosfatidilglicerol și un raport mic proteine/lipide, comparativ cu plămâni maturi. Din cauza deficitului de fosfatidilglicerol, surfactantul nou-născuților prematuri are o activitate tensioactivă limitată. Cantitatea de fosfatidilglicerol din componența surfactantului începe să crească abia după 35 s.g. Similară este situația referitoare la sinteza proteinelor surfactantului:

- PS-A – după 32 s.g.;
- PS-B – după 34 s.g.;
- PS-C – pe parcursul dezvoltării precoce a plămânilor;
- PS-D – în ultimul trimestru de gestație [10].

### **Funcțiile surfactantului**

Surfactantul acoperă suprafața căilor aeriene terminale și alveolele sub forma unei pelicule. Asigură funcțiile antiatelectatică, de apărare imună locală, de clearance-ul mucociliar.

Deoarece la naștere plămâni au 25 de milioane de alveole, care conțin un volum de gaz de 25-30 ml/kg, suprafața mare de contact cu aerul extern necesită prezența unui mecanism eficient de apărare și purificare locală [7].

#### **Funcția antiatelectatică**

După naștere, plămâni își măresc semnificativ suprafața interfeței hidroaerice. Tensiunea superficială a lichidului interfeței hidroaerice tinde să micșoreze suprafața dată. În consecință, lichidul se adună în picături, iar alveolele tind să colabeze în urma interacțiunii forțelor, orientate spre axul luminal [7, 11]. Alveolele aerate sunt interconectate. Conform legii Laplace, în lipsa surfactantului, alveola cu rază mai mică va tinde să colabeze, împingând aerul în cea cu rază mai mare, deoarece tensiunea ei superficială este mai înaltă decât la al-

The purpose of this article, was to systematise contemporary data on the newborn surfactant system and to determine the advantages and disadvantages of non-invasive methods compared to invasive surfactants.

### **Surfactant system**

Surfactant is an emulsion of lipids (90%), proteins (10%), carbohydrates and ions. The lipid fraction is composed of superficial active phospholipids, of which about 70% in the mature human surfactant is lecithin (dipalmitoylphosphatidylcholine – DPPC) and about 10% phosphatidyl glycerol. Apart from these components, the surfactant also contains small amounts of plasminogen, unsaturated fatty acids (UFA) and cholesterol. Plasminogen and cholesterol significantly improve the surfactant properties of the lipid component [7, 8]. The increased content of UFA and plasminogen in tracheal secretion, decreases the risk of developing chronic pulmonary disease [7, 9].

The components of the fetal surfactant is changing during the development of the lungs. There are currently 4 specific surfactant proteins: PS-A, PS-B, PS-C and PS-D, which are synthesized by type II pneumocytes. They have molecular mass, structure, chemical properties and a different physiological role in the formation of intra-alveolar tubular myelin, of the superficial-active film at the hydroaeric interface and in the homeostasis processes of the surfactant [7].

Surfactant, in immature lungs, contains a large amount of phosphatidylinositol, but a low amount of phosphatidylglycerol and a low protein / lipid ratio, compared to mature lungs. Because of the phosphatidylglycerol deficiency, the premature infant surfactant has limited surfactant activity. The amount of phosphatidylglycerol from surfactant starts to increase only after 35 weeks of gestation. Similar is the situation regarding the synthesis of surfactant proteins:

- PS-A – after 32 weeks of gestation;
- PS-B – after 34 weeks of gestation;
- PS-C – during the early development of the lungs;
- PS-D – in the last trimester of gestation [10].

### **Functions of the surfactant**

The surfactant covers the surface of the terminal airways and the alveoli in the form of a film. Provides antiatelectatic functions, local immune defense, mucociliary clearance.

Because at birth, the lungs have 25 million alveoli, containing a gas volume of 25-30 ml / kg, the high surface of contact with external air, requires the presence of an effective mechanism of local defense and purification [7].

#### **Anti-atelectasis function**

After birth, the lungs significantly increase the surface of the hydroaeric interface. The surface tension of the hydroaeric interface tends to diminish this surface. Consequently, the liquid gathers in drops, and the alveoli tend to collapse after the interaction of forces, directed towards the luminal axis [7, 11]. The aerated alveoli are interconnected. Under Laplace's law, in the absence of a surfactant, the smaller cell will tend to collapse, pushing the air into the larger radius, because its superficial tension is higher than at the larger alveo-



veola mai mare, la o presiune identică a aerului. Într-un final, în lipsa proprietăților de detergent ale surfactantului (detergentul reduce semnificativ tensiunea superficială), colabează și alveolele cu o rază mai mare.

Surfactantul pulmonar are o capacitate extraordinară de a micșora tensiunea superficială pe măsură ce mărimea alveolelor scade, deoarece concentrația lui sporește în timpul expirului. Când raza alveolei este foarte mică, tensiunea superficială tinde spre zero, iar presiunea necesară pentru a le menține deschise este aproape neglijabilă și acestea nu colabează.

În timpul inflației, raza alveolei crește, iar tensiunea ei superficială crește și mai repede; în consecință, presiunea în alveolele mai mari o va depăși pe cea din alveolele mai mici. Deoarece în plămân alveolele sunt interconectate, gradientul de presiune va orienta fluxul de aer în direcția alveolelor mai mici, egalând, astfel, dimensiunile lor.

Rezultatul cumulativ al alveolelor rămase deschise în timpul expirului reprezintă o relație non-lineară a presiunii și volumului. Plămânul cu surfactant suficient reține gazul în timpul expirului; din contră, lipsa surfactantului favorizează eliminarea completă a aerului din plămân. În consecință, în timpul ventilării pulmonare artificiale, trebuie aplicate presiuni de insuflare sporite pentru a redeschide alveolele colabate și a atinge același volum inspirator.

În absența unei cantități suficiente de surfactant, în plămânii nou-născutului se produce un colaps alveolar generalizat, cu supraextinderea alveolelor deschise. Pentru a redeschide alveolele colabate, este necesară o presiune de insuflare mai mare. Nou-născutul cu deficit de surfactant, pentru a respira, este impus să genereze o presiune intratoracică negativă mai mare, cu un efort respirator sporit (tiraj costal). Nou-născuții pot încerca să prevină colapsul alveolar prin intermediul stridorului (se produce, astfel, o presiune end-expiratorie intrinsecă).

Colapsul alveolar generalizat crește fracția de șunt intrapulmonar și cel de tip dreapta-stânga (prin ductul arterial patent), precum și presiunea în artera pulmonară; în asemenea condiții, schimbul de gaze nu este eficient [12].

#### *Apărarea imună locală*

Două proteine polifuncționale ale surfactantului, PS-A și PS-D, se pot determina la nivelul plămânilor și în ser. Ca o parte componentă a imunității congenitale, ele joacă un rol important în apărarea plămânilor, până la sintetizarea anticorpilor. În calitate de molecule cu funcție de tranziție de la imunitatea congenitală spre cea dobândită, ele acționează asupra celulelor dendritice (macrofagelor alveolare) și limfocitelor T, sunt implicate în neutralizarea virusurilor și bacteriilor, fungilor, celulelor necrozate sau apoptotice. Proteinele menționate sunt implicate, de asemenea, în reglarea reacțiilor alergice și inflamatorii, în eliminarea citokinelor [7, 13-16].

#### *Clearanțul muco-ciliar*

Epiteliul ciliar al căilor aeriene este tapetat cu o peliculă ce constă din lichid dens care este formată dintr-o componentă salină, cu densitate scăzută și una gel, cu densitate înaltă. După fiecare mișcare a cililor, gelul se deplasează în direcție proximală și, astfel, o parte din particulele inhalate sunt evacuate din plămâni (transport mucociliar) [7, 16, 17]. Particulele

lus, at an identical pressure of the air. Finally, in the absence of detergent properties of the surfactant (detergent significantly reduces surface tension), the alveoli with a larger radius also collapse.

The lung surfactant has an extraordinary ability to reduce surface tension as the size of the alveoli decreases, as its concentration increases during expiration. When the alveolar radius is very small, the surface tension tends to zero and the pressure required to keep them open is almost insignificant and they do not collapse.

During inflation, the radius of the alveolus increase, and its superficial tension increase even faster; consequently, the pressure in the larger alveoli will exceed that in the smaller alveoli. Because in the lung the alveoli are interconnected, the pressure gradient will direct the flow of air in the direction of the smaller alveoli, thus equalizing their dimensions.

The cumulative result of the open alveoli, during expiration, represents a non-linear relationship of pressure and volume. The sufficiently surfactant lung, retains the gas during expiration; on the contrary, lack of surfactant, favors the complete removal of air from the lung. Consequently, during artificial pulmonary ventilation, should be applied increased insufflation pressures, to reopen the collapsed alveoli and reach the same inspiratory volume.

In the absence of a sufficient amount of surfactant, a generalized alveolar collapse occurs in the lungs of the newborn, with the overexpanding of the open alveoli. To reopen the collapsed alveoli, is required a higher insufflation pressure. The newborn with a surfactant deficiency, to breathe, is forced to generate a greater negative intrathoracic pressure with increased respiratory effort (intercostal recessions). Newborns can try to prevent alveolar collapse by means of the wheezing (thus, is produced an intrinsic end-expiratory pressure).

Generalized alveolar collapse increases intrapulmonary shunt fraction and right-left shunt fraction (through the patent arterial duct) as well as pulmonary artery pressure; Under such conditions, gas exchange is not effective [12].

#### *Immune local defense*

Two polyfunctional proteins of the surfactant, PS-A and PS-D, can be determined in the lungs and in the serum. As a component part of congenital immunity, they play an important role in the defense of the lungs, up to the synthesis of antibodies. As molecules with a transition function from congenital to acquired immunity, they act on dendritic cells (alveolar macrophages) and T lymphocytes, are involved in the neutralization of viruses and bacteria, fungi, necrotic or apoptotic cells. These proteins are also involved in regulating allergic and inflammatory responses in cytokine elimination [7, 13-16].

#### *Muco-ciliary clearance*

The ciliary epithelium of the airways is taped with a dense liquid film, consisting of a low density, which is formed from a saline component, with low density and a high density gel. After each movement of the cilia, the gel moves in the proximal direction and thus some of the inhaled particles are evacuated from the lungs (mucociliary transport) [7, 16, 17]. The particles retained in the hydroaeric interface film, with the surfac-

reținute în pelicula interfeței hidroaerice, cu ajutorul surfactantului, migrează în faza lichidă, unde, parțial, sunt fagocitate de către macrofagi. Particulele, fiind transportate în profunzimea țesutului, independent de drenajul limfatic, pătrund în ganglionii limfatici și sunt prezentate limfocitelor T.

Sistemul de apărare antioxidant, încă imatur, crește susceptibilitatea nou-născuților prematuri la stresul oxidativ, generând o morbiditate specifică, ce include boala pulmonară cronică a prematurului, retinopatia prematurului și enterocolita ulcero-necrotică. De aceea, hiperoxigenarea în timpul resuscitării nou-născutului prematur în sala de naștere poate fi periculoasă. Hipotermia, infecția perinatală, imaturitatea sistemului respirator și musculatura respiratorie slab dezvoltată sunt cofactorii care impun luarea măsurilor de resuscitare [7].

#### *Circulația alveolară a surfactantului*

În timpul formării, depozitării și secreției, surfactantul se regăsește sub diferite forme fizice: mielină lamelară, tubulară și veziculară. Structura de plasă a mielinei depinde foarte mult de ionii de calciu și de proteinele surfactantului A, B, C și D. Actualmente, se efectuează cercetări clinice care se referă la legăturile dintre mutațiile de gene și homeostazia surfactantului. Mutațiile PS-C și, posibil, PS-A, conduc la formarea proteinelor cu structura anormală, cu acțiune citotoxică și la dezvoltarea maladiilor pulmonare interstițiale [7].

#### **Preparatele de surfactant pentru utilizare clinică**

Terapia cu surfactant a revoluționat îngrijirea respiratorie neonatală [18, 19, 27]. Terapia cu surfactant a fost o măsură excelentă de tratament pentru prematurii cu sindrom de detresă respiratorie, din momentul în care s-a introdus, în 1990. În cazul nou-născuților cu greutate foarte mică la naștere și marilor prematuri, s-a demonstrat o scădere semnificativă a riscului mortalității și morbidității neonatale. Terapia de substituție cu surfactant a redus incidența pneumotoraxului și hemoragiei intraventriculare, a îmbunătățit supraviețuirea nou-născuților prematuri.

Cercetarea terapiei cu surfactant a detresei respiratorii la nou-născuții prematuri abordează paradigmele surfactant natural vs. sintetic, modalităților alternative de administrare, momentului potrivit de administrare, în combinație cu diferite modalități și tehnici de ventilare pulmonară artificială [7, 10].

#### *Surfactantul natural versus sintetic*

Surfactantul natural este derivat fie din lavajul pulmonar, fie din țesutul pulmonar propriu-zis de origine bovină sau porcină. Surfactantul sintetic este un complex combinat de dipalmitoilfosfatidilcolină și alte fosfolipide, lipide neutre, lipoproteine sau alcool [10].

Studiile individuale au comparat eficacitatea și siguranța diferitor tipuri de surfactant natural în tratamentul sindromului de detresă respiratorie, cu rezultate variabile. De exemplu, *poractant-α* acționează mult mai rapid decât *beractantul*. O metaanaliză a 5 studii care a comparat *poractant-α* cu *beractant* în tratamentul copiilor prematuri cu sindrom de detresă respiratorie, nu a identificat diferențe în rezultatele primare referitoare la boala pulmonară cronică (31,5% vs. 29,9%,

igrate into the liquid phase, where they are partially phagocytosed by macrophages. The particles, transported to the depth of the tissue, independent of lymphatic drainage, penetrate into the lymph nodes and are presented to T lymphocytes.

The antioxidant defense system, still immature, increases susceptibility of premature newborns to oxidative stress, generating specific morbidity, including chronic pulmonary disease of the premature newborn, retinopathy and ulcero-necrotic enterocolitis. Therefore, hyperoxygenation during premature neonatal resuscitation in the birthplace, may be dangerous. Hypothermia, perinatal infection, immaturity of the respiratory system and poorly developed respiratory muscles are cofactors that require resuscitation [7].

#### *Alveolar circulation of the surfactant*

During formation, storage and secretion, the surfactant is found in various physical forms: laminar, tubular and vesicular myelin. The myelin mesh structure is highly dependent on calcium ions and surfactant proteins A, B, C and D. Currently, clinical researches concern to the linkage between gene mutations and surfactant homeostasis. PS-C and possibly PS-A mutations lead to the formation of abnormal proteins with cytotoxic action and the development of interstitial lung diseases [7].

#### **Surfactant preparations for clinical use**

Surfactant therapy revolutionized neonatal respiratory care [18, 19, 27]. Surfactant therapy was an excellent treatment for premature newborns with respiratory distress syndrome, since it was introduced in 1990. In the case of infants with very low birth weight and premature babies, was demonstrated a significant decrease in mortality risk and neonatal morbidity. Surfactant replacement therapy reduced the incidence of pneumothorax and intraventricular haemorrhage, improved the survival of premature newborns.

The research of surfactant therapy for respiratory distress in premature neonates, approaches the paradigm about natural surfactant vs synthetic, to alternative ways of administration, to appropriate time of administration, combined with different artificial pulmonary ventilation techniques [7, 10].

#### *Natural versus synthetic surfactant*

The natural surfactant is derived from either the lung lavage or the actual pulmonary tissue of bovine or porcine origin. Synthetic surfactant is a combined complex of dipalmitoylphosphatidylcholine and other phospholipids, neutral lipids, lipoproteins or alcohol [10].

Individual studies compared the efficacy and safety of various types of natural surfactant in the treatment of respiratory distress syndrome with variable outcomes. For example, *poractant-α* acts much faster than *beractant*. A meta-analysis of 5 studies, which compared *poractant-α* with *beractant* in the treatment of premature neonates with respiratory distress syndrome, did not identify differences in primary outcomes for chronic pulmonary disease (31.5% vs. 29.9%, RR=0.98; 95%CI=0.75 – 1.29). Instead, the same meta-analysis found a significant decrease in the mortality rate in favor

RR=0,98; 95%CI=0,75 – 1,29). În schimb, aceeași metaanaliză a constatat o descreștere semnificativă în rata mortalității în favoarea *poractant-α* (RR=0,51; 95%CI=0,3 – 0,89). Totuși, această diferență în mortalitate a fost atribuită folosirii unei doze mari de *poractant-α* (200 mg/kg), comparativ cu *beractant* (100 mg/kg) în 3 din cele 5 studii, incluse în metaanaliză. La recalcularea rezultatelor după excluderea acestor 3 studii din analiză, nu au fost constatate diferențe semnificative în mortalitate.

*Calfactant* are o acțiune mult mai rapidă, fără a influența incidența bolii pulmonare cronice și mortalitatea, comparativ cu *beractant*. Însă, evidențele actuale stipulează că niciun surfactant nu poate fi considerat superior asupra altuia în tratamentul sindromului de detresă respiratorie a copiilor prematuri în termenii reducerii morbidității și mortalității [7, 10].

### Adaptarea perinatală a plămânilor

Adaptarea pulmonară la nou-născuții prematuri depinde de gradul de imaturitate al plămânului, de stadiul lui de dezvoltare (canaliculară sau saculară), fiind mai problematică față de cazul nou-născutului la termen, după criterii morfologice, biochimice și funcționale [7].

Există 2 cauze esențiale pentru deficitul de surfactant în perioada neonatală:

- deficitul primar intraalveolar de surfactant, ca rezultat al imaturității pulmonare sau al unui defect genetic (volum mic de surfactant endogen, biosinteză imatură a secreției de surfactant);
- deficitul secundar, prin inactivarea surfactantului, sintetizat în cantități suficiente, dar supus degradării accelerate în cazul unei suferințe pulmonare perinatale grave (asfixie, sepsis, șoc) [7].

Ambele cauze ale deficitului de surfactant pot coexista, fapt constatat în numeroase condiții clinice (hipotermie, hipotensiune, hipoxie, acidoză). Infecția pulmonară postnatală reprezintă un factor de deteriorare suplimentară [7].

### Afectarea funcției pulmonare ventilatorii

Alterarea funcției pulmonare ventilatorii poate fi provocată de scăderea reabsorbției lichidului pulmonar fetal. În absența surfactantului, tensiunea superficială a lichidului pulmonar blochează căile respiratorii terminale. Ventilarea pulmonară artificială, în condițiile date, necesită presiune de insuflare crescută pentru menținerea expansiei alveolare și oxigenării adecvate. De asemenea, este indicată includerea regimurilor de presiune end-expiratorie pozitivă (PEEP) sau de presiune pozitivă continuă în căile aeriene (CPAP), precum și efectuarea manevrelor de recrutare alveolară [7, 25, 26].

Ventilarea pulmonară artificială, în condiții de deficit de surfactant, produce bule de lichid, care se mișcă înainte-înapoi, în funcție de faza ciclului respirator. Supapa hidrică creată, acționată de presiunea de insuflare sporită, favorizată de elasticitatea sporită a bronșioloanelor terminale (lipsite de cartilaj), generează fenomenul de capcană aerică (l. engl. *air trapping*). Supraextinderea epiteliului alveolar și celui bronșioalar, indusă de capcana aerică, produce leziune pulmonară acută. Supapa hidrică poate dispărea instantaneu, prin jocul de forțe; eliberarea rapidă a gazului captat distal poate produce, de asemenea,

de *poractant-α* (RR=0.51; 95% CI=0.3 – 0.89). However, this difference in mortality was attributed to the use of a high dose of *poractant-α* (200 mg/kg) compared to *beractant* (100 mg/kg) in 3 of the 5 studies, included in the meta-analysis. In the recalculation of the results, after exclusion of these 3 studies from the analysis, no significant differences in mortality were found.

*Calfactant* has a much faster action, without influencing the incidence of chronic pulmonary disease and mortality compared to the *beractant*. However, current evidence states that no surfactant can be considered superior to another in the treatment of respiratory distress syndrome of premature neonates in terms of reducing morbidity and mortality [7, 10].

### Perinatal adaptation of the lungs

Pulmonary adaptation of premature newborns depends on the degree of immaturity of the lung, its stage of development (canalicular or sacular), being more problematic in the case of the newborn on term, according to morphological, biochemical and functional criteria [7].

There are 2 essential causes of neuronal deficiency in surfactant:

- primary intraalveolar deficiency of surfactant as a result of pulmonary immaturity or genetic defect (small volume of endogenous surfactant, immature biosynthesis of surfactant secretion);
- secondary deficiency, by inactivating the surfactant, synthesized in sufficient quantities, but subjected to accelerated degradation in the case of severe perinatal lung pathology (asphyxia, sepsis, shock) [7].

Both causes of surfactant deficiency may coexist, a fact found in many clinical conditions (hypothermia, hypotension, hypoxia, acidosis). Postnatal pulmonary infection is a further deterioration factor [7].

### Impaired pulmonary ventilator function

Impaired pulmonary ventilator function may be caused by decreased reabsorption of fetal lung fluid. In the absence of the surfactant, the surface tension of the pulmonary fluid, blocks the terminal airways. Artificial pulmonary ventilation, under the given conditions, requires increased insufflation pressure to maintain adequate alveolar expansion and oxygenation. It is also advisable to include positive end-expiratory pressure (PEEP) or continuous positive airway pressure (CPAP) regimes as well as alveolar recruitment maneuvers [7, 25, 26].

Artificial pulmonary ventilation, under surfactant-deficient conditions, produces fluid bubbles that move back and forth, depending on the cycle of the respiratory cycle. The created hydric valve, driven by increased insufflation pressure, favored by the increased elasticity of terminal bronchioles (lacking cartilage), generates the air trapping phenomenon. Over-expansion of the alveolar and bronchiolar epithelium, induced by air trapping, produces acute pulmonary lesions. The hydric valve may disappear instantly, through force play; rapid release of distal captured gas can also produce epithelial lesions. Plasma proteins penetrate through the formed lesions, which, together with aggregated cell debris, form hyaline membranes that penetrate the alveoli. The surfactant prevents the forma-

leziuni epiteliale. Prin leziunile formate, pătrund proteinele plasmatică, care, împreună cu detritusul celular agregat, formează membrane hialine, ce tapetează alveolele. Surfactantul împiedică formarea dopurilor de lichid pulmonar prin reducerea tensiunii superficiale. În consecință, lichidul se întinde pe suprafața alveolară ca o peliculă și se reabsoarbe [7, 27].

#### *Afectarea funcției de perfuzie pulmonară*

Deficitul de surfactant contribuie la instalarea hipoxemiei prin hipoventilare și șuntare dreapta-stânga. Hipoxemia produce vasoconstricție pulmonară hipoxică, cu creșterea rezistențelor în teritoriul pulmonar (circulație fetală rezistentă, șuntare dreapta-stânga). Indicatorii care reflectă gradul de afectare pulmonară sunt gradientul alveolo-arterial al presiunii parțiale a oxigenului [ $D_{(A-a)}O_2$ ] și indexul de oxigenare [ $P_aO_2/F_iO_2$ ], însă ei nu reflectă uniformitatea ventilației. Administrarea de surfactant ameliorează valorile indicatorilor menționați [7].

#### *Tulburări ale circulației surfactantului*

Suferința pulmonară la nou-născuții prematur nu afectează doar biosinteza de surfactant, dar alterează și reciclarea lui. Surfactantul inactivat nu mai poate fi reciclat; de asemenea, suferă și mecanismele de captare a metaboliților surfactantului din sânge [7, 29]. În sindromul de detresă respiratorie, concentrația fosfolipidelor și PS-A în secretul traheal crește, treptat, pe parcursul primelor 72-96 de ore, fără modificări ulterioare în următoarele 4 zile; în faza de însănătoșire, concentrațiile sunt similare nou-născuților cu plămâni sănătoși [7, 30]. Sindromul de detresă respiratorie regresează doar atunci, când în alveole există o cantitate suficientă de surfactant activ, iar pătrunderea inhibitorilor lui în spațiul alveolar este oprită. Detresa respiratorie la nou-născuții la termen, în plămâni cărora există o cantitate suficientă de surfactant endogen, este de tip secundar și se poate dezvolta după un episod de asfixie sau în urma unui proces infecțios-inflamator. Hipoxia perinatală și toxinele bacteriene afectează sinteza, secreția și reciclarea surfactantului de către pneumocite. Tulburările funcționale ale surfactantului, cauzate de defecte genetice sau biologice, se întâlnesc rar și se atribuie PS-B. Mutațiile ABCA3 pot fi, de asemenea, o cauză a maladiilor grave pulmonare cronice [7, 31, 32].

#### *Administrarea de surfactant*

O ventilare alveolară omogenă, fără un risc sporit de barotrauma, este foarte dificil de asigurat în lipsa unei concentrații adecvate de surfactant, fapt ce impune administrarea lui în căile respiratorii superioare faza de inspir. Surfactantul se repartizează, ulterior, cu ajutorul fluxului de aer până la bronșiolele terminale și alveolele ventilate.

Se estimează că 50% dintre nou-născuții extrem de premauri pot fi tratați numai cu CPAP nazal, fără administrare de surfactant, însă, în acest caz, frecvența enfizemului pulmonar interstițial sau a pneumotoraxului este semnificativ mai mare (5,5% vs. 3,6% și 9,1% vs. 3,1%, respectiv, comparativ cu lotul care a primit surfactant). Frecvența bolii pulmonare cronice a fost identică pentru ambele loturi. Rezultate similare au fost obținute și în cercetări randomizate controlate efectuate la

tion of the lung fluid plugs by reducing the superficial tension. Consequently, the liquid spreads over the alveolar surface as a film and reabsorbs [7, 27].

#### *Impaired pulmonary perfusion function*

Deficiency of surfactant contributes to the installation of hypoxemia by hipoventilation and right-left shunt. Hypoxemia produces hypoxic pulmonary vasoconstriction, with increased lung resistance (persistent fetal circulation, right-left shunt). Indicators reflecting the degree of pulmonary damage are the alveolo-arterial gradient of partial oxygen pressure [ $D_{(A-a)}O_2$ ] and the oxygenation index [ $P_aO_2/F_iO_2$ ], but they do not reflect the uniformity of ventilation. The administration of surfactant improves the values of mentioned indicators [7].

#### *Surfactant circulatory disorders*

Pulmonary suffering at premature newborns does not only affect surfactant biosynthesis, but also alters its recycling. Inactivated surfactant can no longer be recycled; also suffers and mechanisms for the capture of the surfactant metabolites in the blood [7, 29]. In respiratory distress syndrome, the concentration of phospholipids and PS-A in tracheal secrecy, increases gradually over the first 72-96 hours, without further changes over the next 4 days; in the recovery phase, the concentrations are similar to healthy newborns [7, 30]. Respiratory distress syndrome regresses only when there is a sufficient amount of active surfactant in the alveoli, an dis stopped the penetration of its inhibitors into the alveolar space. Respiratory distress in term newborns, in the lungs of which there is a sufficient amount of endogenous surfactant, is of the secondary type and may develop after an asphyxia episode or an infectious-inflammatory process. Perinatal hypoxia and bacterial toxins affect the synthesis, secretion and recycling of surfactants by pneumocytes. Functional disorders of the surfactant, caused by genetic or biological defects, rarely occur and is PS-B attributed. ABCA3 mutations may also be a cause of chronic lung disease [7, 31, 32].

#### *Administration of the surfactant*

Homogeneous alveolar ventilation, without increased risk of barotrauma, is very difficult to assure in the absence of an adequate surfactant concentration, which requires its administration in the upper respiratory airways. The surfactant is distributed with the air flow to the terminal bronchioles and ventilated alveoli.

It is estimated that, 50% of extremely premature neonates, can only be treated with nasal CPAP, without surfactant, but in this case, the incidence of interstitial lung enfizema or pneumothorax is significantly higher (5.5% vs. 3.6% and 9.1% vs. 3.1%, respectively, compared to the group receiving the surfactant). The frequency of chronic pulmonary disease was identical for both groups. Similar results have also been obtained in randomized controlled trials, performed at premature newborn, that has a longer term. The conclusion is that surfactant treatment, should be established in all cases with increased risk of respiratory distress with the first breathing movements [7]. There are different stabilization strategies, in

prematurul mare. Concluzia este că tratamentul cu surfactant ar trebui instituit în toate cazurile cu risc sporit de detresă respiratorie, odată cu primele mișcări respiratorii [7].

Există diferite strategii de stabilizare în sala de naștere a nou-născutului cu risc crescut de dezvoltare a sindromului de detresă respiratorie [28]:

- intubare orotraheală în sala de naștere și administrare profilactică de surfactant, cu instituirea ventilării pulmonare artificiale;
- intubare orotraheală în sala de naștere și administrare profilactică de surfactant, fără instituirea ventilării pulmonare artificiale (strategia INSURE);
- stabilizare precoce cu ventilare nazală în regim de presiune pozitivă continuă în căile aeriene (CPAP);
- stabilizare precoce cu ventilare nazală în regim CPAP și administrare profilactică de surfactant.

Unii autori pledează în favoarea CPAP pentru a evita intubarea orotraheală și administrarea de surfactant la nou-născuții prematuri [33-35].

Conform recomandărilor oficiale [36, 37], profilaxia sindromului de detresă respiratorie și a altor complicații respiratorii nu se limitează doar la administrarea precoce de corticosteroizi și surfactant, dar implică și o serie de măsuri în perioada perinatală. Rațională se consideră administrarea de surfactant la nou-născuții prematuri până la 27 de săptămâni de gestație și la nou-născuții prematuri, care nu au primit corticosteroizi. Nou-născuții la termen de 27-32 de săptămâni, care au primit corticosteroizi antenatal, prezintă rezultate similare cu cei tratați cu surfactant [38].

Tratamentul cu surfactant determină în 80% din cazuri ameliorarea oxigenării, creșterea volumului de aer în plămâni și distribuția lui uniformă [7, 39, 40]. Se ameliorează parametrii mecanicii respiratorii. Administrarea surfactantului în cazul sindromului de detresă respiratorie scade riscul de emfizem pulmonar interstițial, pnemotorax, pneumomediastin și reduce mortalitatea, durata de ventilare pulmonară artificială și frecvența bolii pulmonare cronice [7, 41].

În cazul nou-născuților extrem de prematuri, este mai eficientă administrarea profilactică a surfactantului, imediat după naștere; astfel, 60% dintre acești nou-născuți se vor recupera fără ventilare pulmonară invazivă [18, 45]. Surfactantul este mai eficient la administrare precoce [42-46] și atunci când necesarul de oxigen este mai mic ( $FiO_2 < 45\%$ ) [42, 47]. Monitorizarea gazelor sanguine la nou-născuții care beneficiază de suport ventilator non-invaziv, de administrare precoce de surfactant sau în cazul în care există semne de decompensare respiratorie, este indispensabilă [42, 48].

#### Strategiile INSURE și LISA

O posibilă soluție a „conflictului” dintre administrarea precoce a surfactantului și a intenției de ventilare non-invazivă ar putea fi abordarea INSURE (intubare, surfactant, extubare). Nou-născuții cu sindrom de detresă respiratorie sunt electiv intubați, după care li se administrează surfactantul. Urmează extubarea rapidă și plasarea pe suport respirator non-invaziv.

Extubarea rapidă poate fi facilitată prin evitarea premedicației, prin utilizarea de medicamente sedative cu durată de

the newborn's room with, with an increased risk of developing respiratory distress syndrome [28]:

- orotracheal intubation in the newborn's room and prophylactic administration of the surfactant, with artificial pulmonary ventilation;
- orotracheal intubation in the newborn's room and prophylactic administration of surfactant, without the establishment of artificial pulmonary ventilation (INSURE strategy);
- early stabilization with nasal ventilation under continuous positive airway pressure (CPAP);
- early stabilization with nasal ventilation under CPAP regime and prophylactic administration of surfactant.

Some authors support CPAP to avoid orotracheal intubation and the use of surfactants at premature neonates [33-35].

According to official recommendations [36, 37], the prophylaxis of respiratory distress syndrome and other respiratory complications, is not limited to the early administration of corticosteroids and surfactants, but also involves a series of measures, during the perinatal period. Rational is the administration of surfactant to premature newborns up to 27 weeks of gestation and to premature neonates, who have not received corticosteroids. 27-32 weekly newborns who received antenatal corticosteroids, show similar results to those treated with surfactant [38].

Surfactant treatment determines in 80% cases, improvement in oxygenation, increased air volume in the lungs and uniform distribution [7, 39, 40]. Are improved the parameters of respiratory mechanics. Administration of surfactant in respiratory distress syndrome, decreases the risk of interstitial pulmonary emphysema, pnemothorax, pneumomediastin and reduces mortality, duration of artificial pulmonary ventilation and chronic pulmonary disease [7, 41].

In the case of extremely premature newborns, the prophylactic administration of the surfactant is more effective immediately after birth, so 60% of these newborns will recover without invasive pulmonary ventilation [18, 45]. Surfactant is more effective at early administration [42-46] and when oxygen demand is lower ( $FiO_2 < 45\%$ ) [42, 47]. Monitoring of blood gases at neonates receiving non-invasive ventilatory support, early administration of surfactant, or in the case of signs of respiratory decompensation, is indispensable [42, 48].

#### INSURE and LISA strategies

A possible solution to the „conflict” between the early administration of the surfactant and the intention of non-invasive ventilation, could be the INSURE approach (intubation, surfactant, extubation). Newborns with respiratory distress syndrome are electively intubated, after which is administered the surfactant. After, follow the fast extubation and non-invasive respiratory support.

Rapid extubation, can be facilitated by avoiding premedication, by using short-acting sedative drugs, antagonizing the effects of opioid analgesics with naloxone. Babies, who benefited from the INSURE method, had a shorter duration of

acțiune scurtă, antagonizarea efectelor analgezicelor opioide cu naloxonă. Sugarii care au beneficiat de metoda INSURE, au avut o durată mai redusă de ventilare pulmonară artificială, mai puține pneumotoraxuri și leziuni de boală pulmonară cronică. Beneficiile pe termen lung ale metodei INSURE nu au fost, deocamdată, evaluate [42, 47].

Administrarea precoce a surfactantului în primele două ore de la naștere este benefică în terapia sindromului de detresă respiratorie [49, 50]. Utilizarea timpurie, însă indispensabilă, a ventilării pulmonare artificiale este principalul factor de risc pentru apariția bolii pulmonare cronice la nou-născuții premauri, cu greutate mică la naștere. Pe de altă parte, administrarea repetată de surfactant și CPAP are efecte sinergice în tratamentul detresei respiratorii, precum și în reducerea incidenței bolii pulmonare cronice [50-52].

Unele studii au relevat o scădere a ratei complicațiilor, în timp ce altele au raportat că nu există diferențe semnificative în frecvența apariției pneumotoraxului și bolii pulmonare cronice, fie că se aplică strategia INSURE, fie că se utilizează ventilarea pulmonară artificială de lungă durată [49, 53-57].

Cu toate că are anumite avantaje, metoda INSURE nu este lipsită de dezavantaje: ea nu evită intubarea traheei cu ventilarea pulmonară artificială ulterioară, necesitatea sedării – toate acestea fiind asociate cu numeroase efecte adverse. Sedarea, *per se*, rămâne un subiect controversat, dacă este privită prin prisma beneficiu-dauă [10, 60].

Cu scopul evitării efectelor negative ale ventilării pulmonare artificiale, a fost elaborată o altă tehnică de administrare endotraheală a surfactantului pentru nou-născuții premauri cu respirație spontană patentă. Aceasta constă în plasarea unei sonde gastrice sau unui cateter arterial printre corzile vocale ale nou-născutului prematur cu sindrom de detresă respiratorie, care respiră cu suport CPAP. Cu toate beneficiile evidente ale metodei, aceasta nu s-a bucurat de o mare răspândire, până când Kribbs A. și coaut. (2007) [40, 44] nu au descris o abordare similară, denumită LISA, care a demonstrat o rată de succes de cca 80%. Ulterior, prin studii randomizate, s-a demonstrat că utilizarea acestei metode a redus necesitatea instituirii ventilării pulmonare artificiale și rata bolii pulmonare cronice.

Un studiu de cohortă, efectuat pe 75 de nou-născuți premauri, a scos în evidență faptul că metoda noninvazivă de administrare a surfactantului este la fel de eficientă ca și INSURE în evitarea ventilării pulmonare artificiale și are mai puține efecte adverse. Nou-născuții care au beneficiat de surfactant noninvaziv au avut o scădere semnificativă a necesității de ventilare pulmonară artificială în primele 72 de ore de viață, comparativ cu cei care au beneficiat de metoda INSURE (30% vs. 45%) [61]. În 36% din cazuri, administrarea non-invazivă de surfactant a fost repetată, deoarece prima doză a fost de 100 mg/kg, comparativ cu metoda INSURE (200 mg/kg, prima doză). Studiile clinice și farmacocinetice au sugerat că doza de 200 mg/kg are o durată de înjumătățire mai mare [18, 63] și un răspuns acut mai bun [18, 64].

Metoda LISA de administrare a surfactantului constă în [3, 55, 61]:

- stabilizarea nou-născutului, aplicarea de CPAP nazal, cu ajustarea fracției necesare de inspir a oxigenului;

artificial pulmonary ventilation, fewer pneumothoraxes and chronic lung disease. The long-term benefits of the INSURE method have not yet been evaluated [42, 47].

Early administration of the surfactant, during the first two hours of birth, is beneficial in the therapy of respiratory distress syndrome [49, 50]. Early, but indispensable use of artificial lung ventilation, is the main risk factor for the occurrence of chronic pulmonary disease in premature neonates with low birth weight. On the other hand, repeated administration of surfactant and CPAP regime, has synergistic effects in the treatment of respiratory distress, as well as in reducing the incidence of chronic pulmonary disease [50-52].

Some studies have shown a decrease in the rate of complications, while others have reported that there are no significant differences in the occurrence of pneumothorax and chronic pulmonary disease, either the INSURE strategy applies, or is used long-term artificial lung ventilation [49, 53-57].

Although it has certain advantages, the INSURE method is not without disadvantages: it does not avoid intubation of the trachea, with subsequent artificial pulmonary ventilation, the need for sedation – all of which are associated with numerous adverse effects. Sedation, *per se*, remains a controversial topic, if it is through benefit-damage prism [10, 60].

In order to avoid the negative effects of artificial pulmonary ventilation, has been developed another technique for the endotracheal administration of surfactant for premature neonates, with evident spontaneous breathing. It consists by placing a gastric probe or arterial catheter among the vocal cords of the premature neonate with respiratory distress syndrome, that breathes with CPAP support. With all the obvious benefits of the method, it did not enjoy a great spread until Kribbs A. and co-authors (2007) [40, 44] did not describe a similar approach, called LISA, which demonstrated a success rate of about 80%. Subsequently, randomized studies have shown that the use of this method has reduced the need for artificial pulmonary ventilation and the rate of chronic pulmonary disease.

A cohort study, performed on 75 preterm newborns, revealed that the non-invasive method of administration of surfactant is as effective as INSURE in avoiding artificial lung ventilation and has fewer side effects. Newborns, who received non-invasive surfactants, had a significant decrease in the need for artificial pulmonary ventilation during the first 72 hours of life compared to those who benefited from the INSURE method (30% vs. 45%) [61]. In 36% of cases, non-invasive administration of the surfactant was repeated, because the first dose was 100 mg / kg, compared to the INSURE method (200 mg/kg, first dose). Clinical and pharmacokinetic studies have suggested that the 200 mg/kg dose has a longer half-life [18, 63] and a better acute response [18, 64].

The LISA method, for the administration of the surfactant, consists of [3, 55, 61]:

- stabilization of the newborn, application of nasal CPAP, adjusting the required oxygen-inspired fraction;
- intravenous caffeine 20%, 20 mg/kg;
- lateral decubitus positioning of the newborn;

- administrarea intravenoasă de cafeină 20%, 20 mg/kg;
- poziționarea în decubit lateral a nou-născutului;
- la 30 minute după naștere, în trahee se introduce o sondă de alimentare (Ch04) cu ajutorul pensei Magill, sub ghidare laringoscopică directă;
- surfactantul se introduce timp de 2-5 minute, sincronizat cu inspirațiile spontane ale copilului.

Doza optimală de surfactant (100 sau 200 mg/kg) nu a fost stabilită, deocamdată.

Administrarea surfactantului prin metoda INSURE la nou-născuții care se aflau pe CPAP nazal cu  $F_{iO_2} > 40\%$  vs. metoda non-invazivă, condiții similare, la care surfactantul s-a administrat rapid, timp de 30-60 de secunde, utilizând o sondă de 5 Fr, a demonstrat o rată a necesității de (re)intubare în primele 72 de ore de 45% vs. 30%, respectiv. De asemenea, în lotul cu administrarea non-invazivă a surfactantului, durata de suport respirator (CPAP și/sau ventilare pulmonară artificială) s-a micșorat semnificativ și s-a diminuat, de asemenea, rata bolii pulmonare cronice (10% vs. 20%) [66-68].

Surfactantul mai poate fi administrat intratraheal și prin nebulizare (cu jet sau ultrasonoră, timp de 20 de minute) [3, 69, 70]. Metoda este ușor adaptabilă pentru copiii extrem de prematuri, care se află pe suport respirator de tip CPAP nazal, este bine tolerată și sigură. Și prin administrarea cu nebulizatorul a surfactantului, s-a constatat reducerea riscului de intubare orotraheală în primele 72 de ore la prematurii cu sindrom de detresă respiratorie.

Un studiu mic a raportat administrarea surfactantului prin mască laringiană, comparativ cu un lot de nou-născuți prematuri, care nu au primit surfactant. Studiul dat a fost efectuat pe un lot de nou-născuți cu sindrom de detresă respiratorie de până la 72 de ore de viață, cu o greutate mai mare de 1200 g, tratați cu CPAP nazal și  $F_{iO_2}$  30-60%. După intervenție,  $S_{pO_2}$  s-a menținut în ambele grupuri între 88-95%. În rezultat, s-a presupus că administrarea de surfactant prin mască laringiană este sigură și poate fi considerată drept o alternativă. Totuși, această metodă este mai fezabilă pentru nou-născuții cu greutatea la naștere cuprinsă între 1500-5000 g, care suferă de deficit de surfactant de cauză secundară (de exemplu, în urma aspirației de meconiu sau hipoxiei severe).

## Concluzii

Utilizarea metodei LISA este sigură, nu implică riscuri sporite și este benefică în managementul nou-născutului prematur în vederea reducerii expunerii la ventilarea pulmonară artificială. Evitarea ventilării pulmonare artificiale diminuează răspunsul inflamator local, pulmonar și cel sistemic, cu efecte pozitive, rată de supraviețuire sporită și fără complicații majore. Această metodă poate fi ușor aplicată în practică. Totuși, limitarea cea mai importantă a metodei rămâne imposibilitatea aplicării la vârste de gestație foarte mici și la nou-născuții în stare extrem de gravă la naștere sau la internare, care necesită, neapărat, intubare orotraheală, ventilare pulmonară artificială și administrare imediată de surfactant.

Evidența științifică deținută în prezent, referitoare la administrarea non-invazivă a surfactantului, este promițătoare

- 30 minutes after birth, a feeding probe (Ch04) is inserted into the trachea by means of the Magill pens, under direct laryngoscopic guidance;
- the surfactant is inserted for 2-5 minutes, synchronized with the child's spontaneous inspiration.

The optimal dose of surfactant (100 or 200 mg/kg) has not yet been established.

Administration of surfactant, by the INSURE method in neonates who were on nasal CPAP with  $F_{iO_2} > 40\%$  vs. the non-invasive method, similar conditions, to which the surfactant was administered rapidly for 30-60 seconds using a 5 Fr probe, demonstrated a rate of need for (re)intubation in the first 72 hours of 45% vs. 30%, respectively. Also, in the non-invasive surfactant group, the duration of respiratory support (CPAP and/or artificial pulmonary ventilation) decreased significantly and the rate of chronic pulmonary disease has diminished too (10% vs. 20%) [66-68].

The surfactant may also be administered intratracheally by nebulization (jet or ultrasonic for 20 minutes) [3, 69, 70]. The method is easily adaptable to extremely premature newborns, which are on nasal CPAP, is well tolerated and safe. And by administering with the nebulizer the surfactant, there was a reduction in the risk of orotracheal intubation in the first 72 hours at premature neonates with respiratory distress syndrome.

A small study reported the administration of the surfactant through the laryngeal mask, compared to a group of premature neonates, who did not receive the surfactant. This study was performed on a group of infants with respiratory distress syndrome of up to 72 hours of life weighing more than 1200 g, treated with nasal CPAP and 30-60%  $F_{iO_2}$ . After intervention,  $S_{pO_2}$  remained in both groups between 88-95%. As a result, the administration of surfactant through the laryngeal mask is believed to be safe and can be considered as an alternative. However, this method is more feasible for infants with a birth weight of between 1500-5000 g, which suffer from secondary cause surfactant deficiency (e.g., as a result of meconium aspiration or severe hypoxia).

## Conclusions

The use of the LISA method is safe, does not involve increased risks and is beneficial in premature neonatal management to reduce exposure to artificial pulmonary ventilation. Avoiding artificial lung ventilation diminishes local, pulmonary and systemic inflammatory response with positive effects, increased survival and no major complications. This method can be easily applied in practice. However, the most important limitation of the method remains the impossibility of applying it to very young gestation age and to babies in extremely serious condition at birth or hospitalization, which necessarily require orotracheal intubation, artificial pulmonary ventilation and immediate administration of surfactant.

The current scientific evidence, regarding the non-invasive administration of the surfactant, is promising and in favor of this approach. However, the non-invasive administration of the surfactant is currently insufficiently well documented due

și în favoarea abordării date. Cu toate acestea, administrarea non-invazivă a surfactantului este, deocamdată, insuficient de bine documentată din cauza eșantioanelor reduse de studiu, heterogenității loturilor și a parametrilor de eficiență raportați. În această ordine de idei, sunt necesare studii suplimentare, multicentrice, cu o metodologie de cercetare bine pusă la punct, efectuate pe eșantioane largi de pacienți, cu parametri de rezultat relevanți și unificați.

### Declarația de conflict de interes

Autorul declară lipsa conflictului de interes.

### Referințe / references

- Kribbs A. Early administration of surfactant in spontaneous breathing with nCPAP: feasibility and outcome in extremely premature infants. *Pediatr. Anesthes.*, 2007; 17: 364-9.
- Kanmaz H., Erdeve O., Canpolat F., Mutlu B., Dilmen U. Surfactant administration via thin catheter during spontaneous breathing: randomized controlled trial. *Pediatrics*, 2013; 131 (2): e502-e509.
- Vento M., Cheung P., Aguar M. The first golden minutes of the extremely-low-gestational-age neonate: a gentle approach. *Neonatology*, 2009; 92: 286-98.
- Morley C., Davis P., Doyle L. *et al.* Nasal CPAP or intubation at birth for very preterm infants. *N. Engl. J. Med.*, 2008; 358: 700-8.
- Finer N., Carlo W., Walsh M. *et al.* Early CPAP versus surfactant in extremely preterm infants. *N. Engl. J. Med.*, 2010; 362: 1970-9.
- Wyckoff M., Salhab W., Heyne R., Kendrick D., Stoll B., Laptook A. Outcome of extremely low birthweight infants who received delivery room cardiopulmonary resuscitation. *J. Pediatr.*, 2012; 160: 239-44.
- National Institutes of Health consensus development conference statement. August 17-18, 2000. Antenatal Corticosteroids Revisited: Repeat Courses. ([www.destatis.de/jetspeed/portal/cms](http://www.destatis.de/jetspeed/portal/cms)). Accessed on August 29, 2013.
- Whitsett J., Wert S., Weaver T. Alveolar surfactant homeostasis and the pathogenesis of pulmonary disease. *Ann. Rev. Med.*, 2010; 61: 105-19.
- Roberts D., Dalziel S. Antenatal corticosteroids for accelerating fetal lung maturation for women at risk of preterm birth. Review. The Cochrane Collaboration. Published by John Wiley & Sons (2006).
- Wright J. Host defense functions of pulmonary surfactant. *Biol. Neonate*, 2004; 85: 326-32.
- ACOG Committee on Obstetric Practice. ACOG Committee Opinion no. 475. Antenatal corticosteroid therapy for fetal maturation. *Obst. Gynecol.*, 2011; 117: 422.
- Schleh C. Die Interaktion zwischen pulmonalem Surfactant und Partikeln. *Sudwestdeutscher Verlag für Hochschulschriften*, 2010; 140.
- David G. *et al.* European Consensus Guidelines on the Management of Neonatal Respiratory Distress Syndrome in Preterm Infants, 2013 Update. Published online: May 31, 2013. 16 p.
- Soll R, Ozek E. Prophylactic protein free synthetic surfactant for preventing morbidity and mortality in preterm infants. *Cochrane Database Syst. Rev.*, 2010: CD001079.
- Rüdiger M., Tölle A., Meier W., Rüstow B. Naturally derived commercial surfactants differ in composition of surfactant lipids and in surface viscosity. *Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.*, 2005; 288: L379-L383.
- Andersson S., Pitkänen O., Janér C., Helve O. Lung fluid during postnatal transition. *Chinese Medical Journal*, 2010; 123: 2919-2923.
- Barker P., Olver R. Lung edema clearance: 20 years of progress. Invited review: clearance of lung liquid during the period. *J. Appl. Physiol.*, 2002; 93: 1542-8.
- Helve O., Pitkänen O., Janér C. *et al.* Pulmonary fluid balance in the human newborn infant. *Neonatology*, 2009; 95: 347-352.
- Onland W., de Laat M., Mol B., Offringa M. Effects of antenatal corticosteroids given prior to 26 weeks' gestation: a systematic review of randomized controlled trials. *Am. J. Perinatol.*, 2011; 28: 33-44.
- Wilson S., Olver R., Walter D. Developmental regulation of luminal lung fluid and electrolyte transport. *Resp. Physiol. Neurobiol.*, 2007; 159: 247-255.
- Robertson D. Pathology and pathophysiology of neonatal surfactant deficiency. In: Robertson B., Van Golde L., Batenburg J. (eds.). *Pulmonary Surfactant*. Amsterdam, Elsevier Science, 1984; pp. 383-418.
- Hooper S., Kitchen M., Sliew M. *et al.* Imaging lung aeration and liquid clearance at birth using phase contrast X-ray imaging. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.*, 2009; 36: 117-125
- EuroNeoStat: General report for very low birth weight infants. Data from 2003 to 2007. <http://www.euroneostat.org>.
- Saugstad O., Hansen T., Rønnestad A., Nakstad B., Tølløfsrud P. Novel mutations in the gene encoding ATP binding cassette protein member A3 (ABCA3) resulting in fatal neonatal lung disease. *Acta Paediat.*, 2007; 96: 185-90.
- Hooper S., Kitchen M., Sliew M. *et al.* Imaging lung aeration and liquid clearance at birth using phase contrast X-ray imaging. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.*, 2009; 36: 117-125
- Hallman M., Peltoniemi O., Kari A. Enhancing functional maturity before preterm birth. *Neonatology*, 2010; 97: 373-378
- Hawkes C., Ryan C., Dempsey E. Comparison of the T-piece resuscitator with other neonatal manual ventilation devices: a qualitative review. *Resuscitation*, 2012; 83: 797-802.
- Chelly N., Mouhieddine-Gueddiche O.-B., Barlier-Mur A.-M., Chailley-Heu B., Bourbon J. Keratinocyte growth factor enhances maturation of fetal rat lung type II cells. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.*, 1999; 20: 423-431.
- Chelly N., Henrion A., Pintier C., Chailley-Heu B., Bourbon J. Role of keratinocyte growth factor in the control of surfactant synthesis by fetal lung mesenchyme. *Endocrinology*, 2001; 142: 1814-19.
- Dani C., Bertini G., Pezzati M. *et al.* Early extubation and nasal continuous positive airway pressure after treatment for respiratory distress syndrome among preterm infants <30 weeks gestation. *Pediatrics*, 2004; 113: e560-e563.



31. Moretti C., Papoff P., Giannini L. *et al.* Surfactant and non invasive ventilation. *Pediatr. Med. Chir.*, 2005; 27 (5): 26-9.
32. Reininger A., Khalak R., Kendig J. *et al.* Surfactant administration by transient intubation in infants 29 to 35 weeks' gestation with respiratory distress syndrome decreases the likelihood of later mechanical ventilation: a randomized controlled trial. *J. Perinatol.*, 2005; 25 (11): 703-8.
33. Bohlin K., Jonsson B., Gustafsson A. *et al.* Continuous positive airway pressure and surfactant. *Neonatology*, 2008; 93 (4): 309-15.
34. Parmigiani S. Non-invasive surfactant administration in newborn babies. *Infant*, 2011; 7 (4): 112-115.
35. Jobe A. The new bronchopulmonary dysplasia. *Curr. Opin. Pediatr.*, 2011; 23: 167-72.
36. Mercado-Deane M., Burton E. *et al.* Swallowing dysfunction in infants less than 1 year of age. *Pediatr. Radiol.*, 2001; 6: 423-28.
37. Niemarkt H. *et al.* Effects of less-invasive surfactant administration on oxygenation, pulmonary surfactant distribution, and lung compliance in spontaneously breathing preterm lambs. *Pediatric Research*, 2014; 76 (2): 166-170.
38. Vento M. Noninvasive respiratory support in the delivery room: introduction. *Neoreviews*, 2012; 13 (6): e334-e335.
39. Jobe A. Pharmacology review: why surfactant works for respiratory distress syndrome. *Neoreviews*, 2006; 7 (2): e95-e106.
40. Kribbs A. Early administration of surfactant in spontaneous breathing with nCPAP: feasibility and outcome in extremely premature infants. *Pediatr. Anesthes.*, 2007; 17: 364-9.
41. Cogo P., Facco M., Simonato M. *et al.* Dosing of porcine surfactant: effect on kinetics and gas exchange in respiratory distress syndrome. *Pediatrics*, 2009; 124: e950-e957.
42. Singh N., Hawley K., Viswanathan K. Efficacy of porcine vs. bovine surfactants for preterm newborns with respiratory distress syndrome: systematic review and meta-analysis. *Pediatrics*, 2011; 128: e1588-e1595.
43. Guttentag S., Foster C. Update in surfactant therapy. *Neoreviews*, 2011; 12 (11): e625-e634.
44. Kribs A., Pillekamp F., Hünseler C., Vierzig A., Roth B. Early administration of surfactant in spontaneous breathing with nCPAP: feasibility and outcome in extremely premature infants (postmenstrual age <27 weeks). *Paediatr. Anaesth.*, 2007; 17 (4): 364-369.
45. Kanmaz H., Erdevi O., Canpolat F., Mutlu B., Dilmen U. Surfactant administration via thin catheter during spontaneous breathing: randomized controlled trial. *Pediatrics*, 2013; 131 (2): e502-e509.
46. Aguar M., Cernada M., Brugada M., Gimeno A., Gutierrez A., Vento M. Instillation of surfactant by tracheal catheterization with an orogastric tube versus standard INSURE technique: a prospective observational study. *Acta Paediatr.*, 2014; 103 (6): e229-33.
47. Mazela J., Merritt T., Finer N. Aerosolized surfactants. *Curr. Opin. Pediatr.*, 2007; 19 (2): 155-162.
48. Hummler H. Non-invasive intermittent mandatory ventilation in preterm infants with respiratory distress syndrome immediately after extubation: a controlled study on synchronized non-invasive mechanical ventilation and review of the literature. Universität Ulm. 76 p.
49. Kirpalani H. *et al.* A trial comparing noninvasive ventilation strategies in preterm infants. *The New England Journal of Medicine*, 2013; 611-620.
50. Mehler K. *et al.* Outcome of extremely low gestational age newborns after introduction of a revised protocol to assist preterm infants in their transition to extrauterine life. *Acta Paediatrica*, 2012; 101: 1232-1239.
51. Neubauer A., Voss W., Kattner E. Outcome of extremely low birth weight survivors at school age: the influence of perinatal parameters on neurodevelopment. *Eur. J. Pediatr.*, 2008; 167: 87-95.
52. Marlow N., Hennessy E., Bracewell M., Wolke D. Motor and executive function at 6 years of age after extremely preterm birth. *Pediatrics*, 2007; 120: 793-804.
53. Wyckoff M., Salhab W., Heyne R., Kendrick D., Stoll B., Laptook A. Outcome of extremely low birthweight infants who received delivery room cardiopulmonary resuscitation. *J. Pediatr.*, 2012; 160: 239-44.
54. Jobe A. Transition/adaptation in the delivery room and less RDS: "Don't just do something, stand there!". *J. Pediatr.*, 2005; 147: 284-6.
55. O'Donnell C. Resuscitation of extremely preterm and/or low-birth-weight infants – time to call it? *Neonatology*, 2008; 93: 295-301.
56. Pohlandt F. Frühgeburt an der Grenze der Lebensfähigkeit des Kindes. *Z. Geburtshilfe Neonatol.*, 2008; 212 (3): 109-13.
57. Sweet D., Carnielli V., Greisen G., Hallman M., Ozek E., Plavka R. *et al.* European consensus guidelines on the management of neonatal respiratory distress syndrome in preterm infants – 2010 update. *Neonatology*, 2010; 97: 402-17.
58. Thomas C., Meinzen-Derr J., Hoath S., Narendran V. Neurodevelopmental outcomes of extremely low birth weight infants ventilated with continuous positive airway pressure vs. mechanical ventilation. *Indian J. Pediatr.*, 2012; 79: 218-23.
59. Fuchs H. *et al.* Techniques and devices to improve noninvasive ventilation in the delivery room. *Neo Reviews*, 2012; 13 (6): 353-363.
60. Pas A., Davis P., Hooper S., Morley C. From liquid to air: breathing after birth. *J. Pediatr.*, 2008; 152 (5): 607-611.
61. Pas A., Walther F. A randomized, controlled trial of delivery room respiratory management in very preterm infants. *Pediatrics*, 2007; 120 (2): 322-329.
62. Morley C., Davis P., Doyle L., Brion L., Hascoet J., Carlin J.; COIN Trial Investigators. Nasal CPAP or intubation at birth for very preterm infants. *N. Engl. J. Med.*, 2008; 358 (7): 700-708.
63. Finer N., Carlo W., Walsh M. *et al.* SUPPORT Study Group of the Eunice Kennedy Shriver NICHD Neonatal Research Network. Early CPAP versus surfactant in extremely preterm infants. *N. Engl. J. Med.*, 2010; 362 (21): 1970-1979.
64. Badiie Z. *et al.* Noninvasive positive pressure ventilation or conventional mechanical ventilation for neonatal continuous positive airway pressure failure. *International Journal of Preventive Medicine*, 2014; 5 (8): 1045-1053.
65. Diblasi R. Nasal continuous positive airway pressure (CPAP) for the respiratory care of the newborn infant. *Respir. Care*, 2009; 54: 1209-35.
66. Davis P., Morley C., Owen L. Non-invasive respiratory support of preterm neonates with respiratory distress: Continuous positive airway pressure and nasal intermittent positive pressure ventilation. *Semin. Fetal Neonatal Med.*, 2009; 14: 14-20.
67. Lemyre B., Davis P., de Paoli A. Nasal intermittent positive pressure ventilation (NIPPV) versus nasal continuous positive airway pressure (NCPAP) for apnea of prematurity. *Cochrane Database Syst. Rev.*, 2002; 1: CD002272.
68. Poets C. Interventions for apnoea of prematurity: a personal view. *Acta Paediatr.*, 2010; 99: 172-7.



centrul stomatologic

**vivodent**

# TRĂIEȘTE ZÎMBIND!

- Igiena bucală
- Terapie
- Restaurare estetică
- Protezare
- Ortodonție
- Viziografie/OPG(digital)  
(Rentghen diagnostic)
- Chirurgie/Implantologie
- Parodontologie



str. București, 13/1  
[www.vivodent.md](http://www.vivodent.md)

e-mail: [receptie@vivodent.md](mailto:receptie@vivodent.md)

<https://www.facebook.com/CentrulStomatologicVivodent>

**Centrul Stomatologic Vivodent**

tel.: 022 54 64 00

mob.: 079 523 377

## IMAGINI DIN PRACTICA CLINICĂ

## Modificările sistemice – apanajul astmului bronșic dificil?

**Victor Botnaru<sup>1</sup>, Doina Rusu<sup>1,4\*</sup>, Mircea Bețiu<sup>2</sup>, Angela Savin<sup>2</sup>, Eugeniu Bendelic<sup>3</sup>, Victoria Nicolaev<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>Disciplina pneumologie și alergologie, Departamentul de medicină internă, Universitatea de Stat de Medicină și Farmacie „Nicolae Testemițanu”, Chișinău, Republica Moldova;

<sup>2</sup>Catedra de dermatovenerologie, Universitatea de Stat de Medicină și Farmacie „Nicolae Testemițanu”, Chișinău, Republica Moldova;

<sup>3</sup>Catedra de oftalmologie, Universitatea de Stat de Medicină și Farmacie „Nicolae Testemițanu”, Chișinău, Republica Moldova;

<sup>4</sup>Institutul de fiziopneumologie „Chiril Draganiuc”, Chișinău, Republica Moldova.

**Data primirii manuscrisului: 02.05.2017**  
**Data acceptării spre publicare: 05.06.2017**

**Autor corespondent:**

Dr. Doina Rusu

Disciplina pneumologie și alergologie, Departamentul de medicină internă  
Universitatea de Stat de Medicină și Farmacie „Nicolae Testemițanu”  
bd. Ștefan cel Mare și Sfânt, 165, Chișinău, Republica Moldova, MD-2004  
e-mail:doina.rusu@usmf.md

La un pacient cu vârsta de 71 de ani și istoric de astm bronșic de peste 20 de ani, internat în Clinica de pneumologie pentru exacerbarea severă a astmului, se constată necompliancea la tratamentul de fond cu corticosteroizi inhalatori, substituit prin autoadministrarea, practic zilnică, de dexametazon parenteral (8 mg) pe parcursul ultimilor 2 ani. Mai prezintă toracolumbalgii, erupții cutanate pruriginoase extinse pe membre, feșe și abdomen, distrofiile unghiale plantare, echimoze, iar printre comorbidități sunt semnalate hipertensiunea arterială, glaucomul pe dreapta și cataracta pe stânga, diabetul zaharat primar depistat.

**Întrebări:**

- 1) Ce modificări constituționale și tegumentare observați (Figura 1)?
- 2) Care sunt modificările de pe radiografia și CT-ul toracelui (Figurile 2, 3)?
- 3) Considerând datele anamnestică, care ar fi cauza cea mai probabilă a modificărilor descrise?

## IMAGES FROM CLINICAL PRACTICE

## Are systemic changes an attribute of difficult asthma?

**Victor Botnaru<sup>1</sup>, Doina Rusu<sup>\*1,4</sup>, Mircea Betiu<sup>2</sup>, Angela Savin<sup>2</sup>, Eugeniu Bendelic<sup>3</sup>, Victoria Nicolaev<sup>1</sup>**

<sup>1</sup> Division of pneumology and allergology, Department of internal medicine, Nicolae Testemitanu State University of Medicine and Pharmacy, Chisinau, Republic of Moldova;

<sup>2</sup> Chair of dermatology, Nicolae Testemitanu State University of Medicine and Pharmacy, Chisinau, Republic of Moldova;

<sup>3</sup> Chair of ophthalmology, Nicolae Testemitanu State University of Medicine and Pharmacy, Chisinau, Republic of Moldova;

<sup>4</sup> Chiril Draganiuc Institute of phthysiopneumology, Chisinau, Republic of Moldova.

**Manuscript received on: 02.05.2017**  
**Accepted for publication on: 05.06.2017**

**Corresponding author:**

Dr. Doina Rusu

Division of pneumology and allergology, Department of internal medicine  
Nicolae Testemitanu State University of Medicine and Pharmacy  
165, Ștefan cel Mare si Sfânt ave., Chisinau, Republic of Moldova, MD-2004  
e-mail: doina.rusu@usmf.md

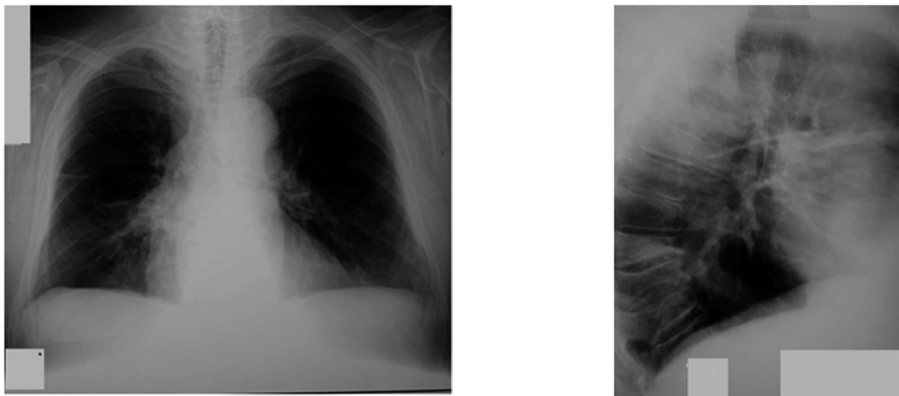
A 71 years old patient with a 20 years asthma history was admitted in pneumology department for severe asthma exacerbation. A noncompliance for inhaled corticosteroids was revealed with almost daily parenteral dexamethasone (8 mg) use as self-treatment during the last 2 years. Last months the patient presented thoracic and lumbar pain, extended itching rash on the limbs, buttocks and abdomen, easy bruising. Among comorbidities arterial hypertension, right eye glaucoma, left eye cataract, and diabetes mellitus were noticed.

**Questions:**

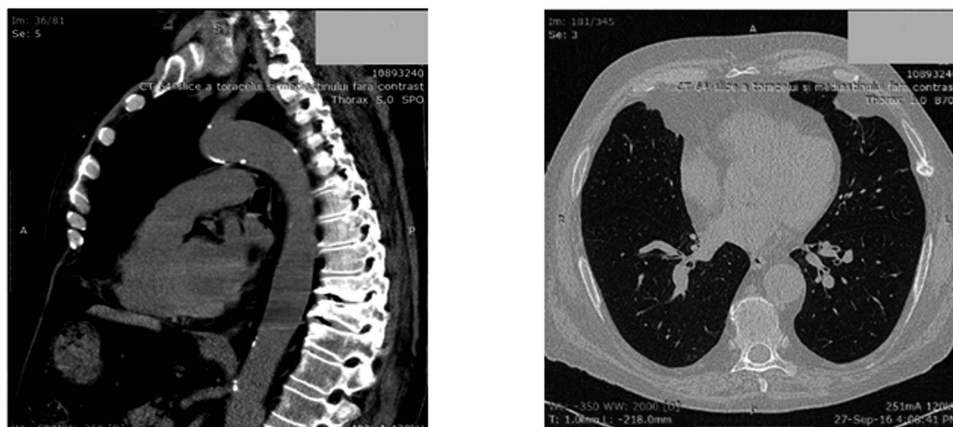
- 1) What body and skin changes do you notice? (Figure 1)
- 2) What are the changes on chest X-ray and chest computed tomography? (Figures 2, 3)
- 3) Considering history what is the most likely cause of these changes?



**Fig. 1** Aspectele constituționale, modificările tegumentelor și fanerelor.  
**Fig. 1** Constitutional issues, skin and nail changes.



**Fig. 2** Radiografia toracelui în incidențele posteroanterioară și laterală dreaptă.  
**Fig. 2** Chest X-ray in posteroanterior and right lateral view.



**Fig. 3** Tomografia computerizată a toracelui.  
**Fig. 3** Chest computed tomography.

### Răspunsuri:

1) Față „în lună plină”, pletorică, cu pomeții rumeni. Obezitate tronculară (circumferința taliei – 130 cm), țesut adipos în partea superioară a spatelui, la baza gâtului („ceafă de bivoliță”) și deasupra claviculelor (pernuțe supraclaviculare), cifoza. Tegumentele cu echimoze, teleangiectazii, atrofiere cutanată cu subțierea dermului și vizualizarea vascularizației țesutului subcutanat. Plagă pe gambă cu întârzierea cicatrizării. Hiperkeratoza coatelor din poziția forțată în accesele de astm bronșic. Leziuni eritemato-scuamoase extinse, cu margine papuloasă ridicată, pe fese, coapse, picioare, brațe, abdomen, care sunt suspecte pentru o infecție fungică. Hiperkeratoză plantară, onicodistrofie plantară, eventual, de origine micotică. *Tinea corporis, pedis et unguium*, confirmată, ulterior, prin examen micologic (microscopie directă și cultură, Figura 4).

2) La radiografia toracelui, în incidențele postero-anterioară și laterală dreaptă, se evidențiază desenul pulmonar accentuat și deformat, indurația pleurei interlobare pe dreapta și calcificări în hiluri (sechele posttuberculoase). Fracturi costale consolidate pe stânga – suspexie de fracturi tasate ale corpurilor vertebrelor toracice. Osteoporoza severă la nivelul coloanei vertebrale și fracturile tasate ale corpului vertebrelor Th9, Th10, Th11, cu angulare cifotică în zona dată, sunt confirmate la tomografia computerizată toracică. De asemenea, CT pune în evidență lipomatoză mediastinală (depuneri de țesut adipos în mediastinul anterior).

3) Modificările descrise se încadrează în sindromul Cushing iatrogen (medicamentos). Prezența acestor modificări la un astmatic semnalează, mai des, o necomplianță la tratamentul inhalator cu administrarea excesivă a steroizilor sistemici.

### Discuții

Sindromul Cushing, descris de Harvey în 1912, include simptomele și semnele cauzate de excesul plasmatic de glucocorticoizi liberi. Forma endogenă a sindromului este o boală rară, pe când varianta exogenă, iatrogenică, este mult mai frecvent întâlnită. Apare, mai des, ca urmare a administrării sistemice de glucocorticoizi (injectare sau pe cale orală), dar și în cazurile cu diferite alte căi de administrare, inclusiv, epidural, prin inhalare, intranasal, topic. În toate cazurile, este importantă durata prelungită a tratamentului și activitatea înaltă a substanței.

Reacțiile adverse ale glucocorticoizilor sunt multiple și variate. Efectele de tip anabolizant cu favorizarea eliberării acizilor grași, cu redistribuirea specifică a țesutului adipos se asociază cu obezitatea de tip central (raportul talie-șold mai mare de 1 la bărbați și de 0,8 la femei), cu creșterea depunerii de țesut adipos în mediastin și peritoneu, ușor de observat și măsurat la CT toracelui, abdomenului. Efectele catabolice, imunosupresia, de rând cu modificările atrofici tegumentare, se complică cu cicatrizarea întârziată a plăgilor. Complicațiile osoase, fracturile tasate de corpuri vertebrale, necroza aseptică a șoldului sunt printre cele mai invalidizante. Osteoporoza și fracturile, miopatia cortizonică sunt cauzele cele mai frecvente ale sindromului algic (dureri de spate, dureri radiculare, osalgii). Miopatia cortizonică cu diminuarea masei musculare,

### Answers:

1) The “moon face”, facial plethora with ruddy cheeks. Central obesity (waist circumference was 130 cm in our patient) with increased adipose tissue on the upper back and neck (buffalo hump), above the clavicles (supraclavicular pads). Kyphosis. Ecchymoses, telangiectasias. Purple striae on the thighs, lower abdomen. Cutaneous atrophy with thinning dermis and exposure of subcutaneous tissue vascularization. Calf wound with slow healing. Large erythematous-squamous lesions with elevated papulous rim on the back, buttocks, thighs, legs, arms and abdomen, suspected for a fungal infection. Plantar hyperkeratosis and nails dystrophy, eventually of fungal origin. *Tinea corporis, pedis et unguium*, confirmed by mycological examination (direct microscopy and culture).

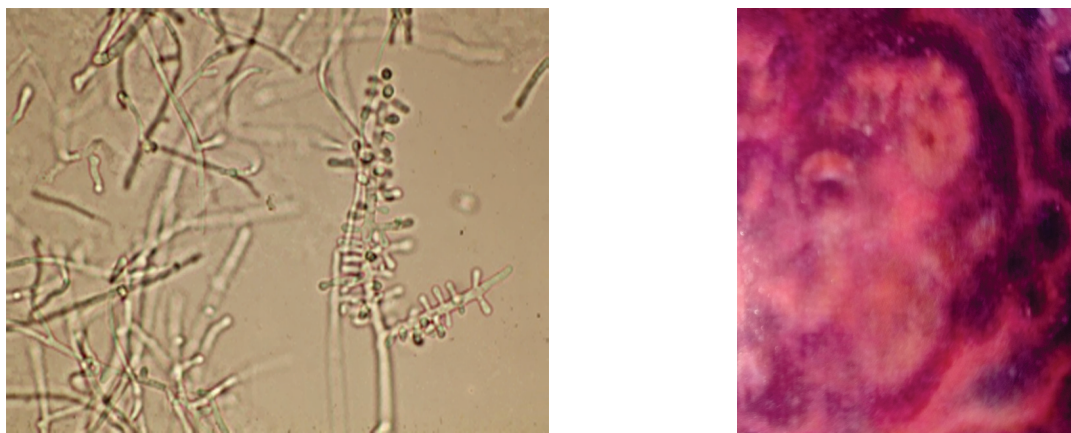
2) At the chest X-ray in the posterior-anterior and right lateral view are highlighted increased and deformed pulmonary markings, thickened right interlobular pleura, and calcification in the hilum (tuberculosis sequelae). Consolidated left ribs fractures. Suspicion of vertebral fracture with compressed thoracic vertebrae. On the chest computed tomography were confirmed severe spine osteoporosis with compressed fractures of the Th9, Th10, and Th11 vertebrae with kyphotic angulation in this area. CT also shows mediastinal lipomatosis (deposits of fat in the mediastinum)

3) Described changes are characteristic for an iatrogenic Cushing syndrome (drug induced). The presence of these changes in an asthmatic patient often reveals noncompliance to inhaled corticosteroid therapy and excessive administration of systemic steroids.

### Discussion

Cushing syndrome, described by Harvey in 1912, includes symptoms and signs caused by the excess of the free glucocorticoids in the plasma. Endogenous form of the syndrome is a rare disease, while the exogenous one, iatrogenic, is much more common. Iatrogenic Cushing syndrome occurs commonly after systemic corticosteroids administration (oral or injection), however the disease was reported in other routes of administration, including epidural, inhaled, intranasal, and topical. In all cases, the prolonged period of treatment and the high potency of the substance is important.

Side effects of glucocorticoids are multiple and varied. Anabolic effects favoring the release of fatty acids with specific redistribution of body fat are associated with central type of obesity (waist-to-hip ratio greater than 1 in men and 0.8 in women), with increased deposition of fat in mediastinum and peritoneum, easily observed and measured on thoracic and abdominal CT. Catabolic effects and immunosuppression, along with atrophic skin changes, are complicated with delayed wound healing. Bone complications, compressed vertebral fractures, aseptic necrosis of the hip are among the most disabling. Osteoporosis and fractures, cortisone myopathy are the most common causes of a pain syndrome (back pain, radicular pain, and bone pain). Cortisone myopathy with reduced muscular mass, especially in the thigh, and proximal



**Fig. 4** Filamente miceliene lungi ramificate. Cultură de *Trichophyton rubrum*.  
*Fig. 4* Long branched filaments of mycelia. *Trichophyton rubrum* culture.



**Fig. 5** Modificările constituționale, ale tegumentelor și fanerelor în aspect evolutiv, după tratament.  
*Fig. 5* Constitutional, skin and nail changes – evolution after treatment.

îndeosebi la mușchii coapsei și miastenia proximală sunt lent reversibile la întreruperea tratamentului.

Lista manifestărilor sindromului Cushing cuprinde și hipertensiunea arterială, diabetul zaharat, glaucomul și cataracta, cu pierderea consecutivă a vederii, tulburările de comportament cu iritabilitate, anxietate, insomnii, depresii sau psihoze, tulburările de creștere (la copii), dereglarea ciclului menstrual, hirsutism, disfuncție erectilă sau pierderea libidoului, tulburările hidroelectrolitice. Totuși, cele mai de temut complicații sunt perforația viscerelor (din ulcere peptice) și infecțiile fungice oportuniste.

În sindromul Cushing iatrogen, față de cel endogen, mai puțin pronunțate sunt hipertensiunea arterială, oligomenoreea și hirsutismul, tulburările psihice, pe când manifestările de osteoporoză, necroză aseptică de cap femural, manifestările oculare (glaucom, cataractă) și de pancreatită sunt, relativ, mai grave.

La examenul microscopic direct al scoamelor din erupțiile cutanate s-au evidențiat filamente miceliene lungi, ramificate. La însămânțarea materialului patologic pe mediul de cultură Sabouraud s-a depistat *Trichophyton rubrum* (Figura 4).

La un tratament antimicotic cu itraconazol, 200 mg de 2 ori pe zi, timp de 7 zile, a câte 3 cicluri consecutive, cu pauză de 3 săptămâni între ele și inițierea tratamentului de fond (inhalator) pentru astmul bronșic, peste 6 luni la pacient s-a observat o ameliorare vădită, atât a patologiei de bază, cât și a modificărilor cutanate: atenuarea expresiei sindromului Cushing, dispariția echimozelor; involuția clinică, practic completă, a leziunilor eritemato-scuamoase diseminate, precum și ameliorarea clinică evidentă a onicomicozei și a micozei plantare. (Figura 5).

myasthenia are slowly reversible after discontinuation of glucocorticoid treatment.

Other manifestations of Cushing syndrome are arterial hypertension, diabetes, glaucoma and cataract with consequent vision loss, behavioral disorders like irritability, anxiety, insomnia, depression or psychosis, growth disorders (in children), menstrual cycle disorders, hirsutism, erectile dysfunction and decreased libido, electrolyte disorders. However, the most feared complications are visceral perforation (from peptic ulcers) and opportunistic fungal infections.

In iatrogenic Cushing syndrome, the hypertension, oligomenorrhea and hirsutism are less pronounced; whereas psychiatric disorders, osteoporosis, femoral head aseptic necrosis, ocular manifestations (glaucoma, cataract) and pancreatitis are, relatively more severe

At the microscopic examination of the squams from skin lesions long branched filaments of mycelia were revealed. In Sabouraud culture environment of the pathological material, *Trichophyton rubrum* was detected (Figure 4).

Due to an antimycotic treatment with itraconazol 400 mg per day, for 7 days, in three consecutive cycles, with a three weeks break between them, and the initiation of the background inhalatory therapy for bronchial asthma, after 6 months was observed an improvement of basic pathology and skin lesions, decrease of the Cushing syndrome expression: disappearing of the ecchymoses; almost total clinical involution of the disseminated erythematous-squamous lesions, also, the clinical improvement of onychomycosis and plantar mycosis (Figure 5).

## Referințe / references

1. Nguyen H. Iatrogenic Cushing Syndrome. Clinical Presentation. [www.emedicine.medscape.com](http://www.emedicine.medscape.com) (updated: July, 20, 2016).
2. Hopkins R., Leinung M. Exogenous Cushing's syndrome and glucocorticoid withdrawal. *Endocrinol. Metab. Clin. North Am.*, 2005; 34: 371-84.
3. Gilbertson E., Spellman M., Piacquadio D. *et al.* Super potent topical corticosteroid use associated with adrenal suppression: clinical considerations. *J. Am. Acad. Dermatol.*, 1998; 38: 318-21.
4. Decani S., Federighi V., Baruzzi E. *et al.* Iatrogenic Cushing's syndrome and topical steroid therapy: case series and review of the literature. *J. Dermatolog. Treat.*, 2014; 25 (6): 495-500.

# Revista de Științe ale Sănătății din Moldova

Moldovan Journal of Health Sciences

## Ghidul autorului

### Criteria pentru publicare

Articolele originale trebuie să conțină cercetări noi (originale), rezultatele cărora contribuie la acumularea de noi cunoștințe în domeniul publicat și cu condiția că rezultatele prezentate nu au mai fost publicate înainte sau nu sunt depuse, în paralel, la o altă revistă, în vederea publicării.

Manuscrisele prezentate trebuie să corespundă standardelor STROBE (<http://www.strobe-statement.org>).

### Prezentarea manuscrisului

Manuscrisele trebuie să fie prezentate doar în formă electronică, în limba română sau engleză. Dacă manuscrisul a fost depus doar în limba română, odată ce a trecut procedura de recenzare internă, acesta va fi tradus integral de către autori în limba engleză, pentru a putea trece procedura de recenzare externă. În același manuscris se permite utilizarea *US English* sau *British English*, dar nu mixt. Varianta tipărită (hârtie) nu va fi acceptată. Doar autorul corespondent va putea depune manuscrisul la redacție; tot el va deține responsabilitatea completă de procesul de depunere, de corespondența cu redacția pe durata procesului de publicare.

Procesul de publicare poate fi amânat, întrerupt sau anulat, la discreția autorului corespondent. Odată manuscrisul depus, autorul corespondent va primi un cod electronic de identificare a manuscrisului, pe care îl va folosi în corespondența ulterioară cu redacția.

În scopul menținerii integrității editoriale și a standardelor internaționale de calitate, Redacția *Moldovan Journal of Health Sciences – Revista de Științe ale Sănătății din Moldova* utilizează un sistem de detectare a plagiatului și va supune manuscrisul unei verificări antiplagiat. Depunerea manuscrisului pentru publicare înseamnă, implicit, acordul tuturor autorilor cu verificarea lui antiplagiat. În cazul suspectării că manuscrisul depus a încălcat politicile de publicare, acesta poate fi suspendat sau respins, indiferent de etapa procesului de publicare.

### Scrisoarea de însoțire

La depunere, autorul corespondent va anexa la manuscris o scrisoare de însoțire. Formularul tipizat al Scrisorii de însoțire este oferit de către Redacție. Scrisoarea de însoțire include: (1) titlul manuscrisului; (2) o scurtă descriere despre relevanța manuscrisului pentru scopul promovat de Revistă; (3) contribuțiile aduse de manuscris pentru domeniul său; (4) modul în care manuscrisul adaugă valoare la literatura științifică de specialitate; (5) numele și semnăturile tuturor coautorilor; (5) datele complete de contact ale Autorului corespondent, cu menționarea instituției și adresei instituționale, nr. de telefon, nr. de fax și adresa e-mail.

În scrisoarea de intenție, Autorul corespondent trebuie să indice

## Instructions for Authors

### Criteria for publication

Original articles should contain new (original) results, which bring new knowledge in the field. The submitted manuscripts should contain data unpublished before and not submitted in parallel for publication to another journal.

Manuscripts submitted must meet STROBE standards (<http://www.strobe-statement.org>).

### Manuscript submission

Manuscripts must be submitted only in electronic form in Romanian or English. Once past the internal reviewing procedure, the manuscript was submitted only in Romanian will be fully translated by the authors in English to pass the external reviewing procedure. In the manuscript are allowed to use U.S. English or British English, but not mixed. Printed version (paper) will not be accepted. Only the corresponding author may submit the manuscript. The corresponding author holds full responsibility of the submission and correspondence with the editor during reviewing and publication process.

The publication of the manuscript may be postponed, stopped or canceled at the request of the corresponding author. Once the manuscript is submitted, the corresponding author will receive an electronic identification code of the manuscript, which should be used for subsequent correspondence with the editor.

In order to maintain editorial integrity and international quality standards, editor of the *Moldovan Journal of Health Sciences* reserves the right to use a plagiarism detection system. Thus the submitted manuscript will be checked for plagiarism. Manuscript submission involves agreement of all coauthors for checking for plagiarism. If the submitted manuscript violates copyright policies; it can be suspended or dismissed, regardless of the stage of the publishing process.

### Cover letter

A submitted manuscript should be accompanied by a Cover letter. A template of Cover letter is provided by editor. Cover letter should include: (1) the title of the manuscript; (2) a short statement regarding the relevance of the manuscript for the journal proposes; (3) contributions of the manuscript for to field; (4) what is the added value of the manuscript to the already published scientific literature; (5) the names and signatures of all coauthors; (5) the full contact details of corresponding author, indicating the institution and institutional address, no. telephone, no. fax and e-mail.

In the Cover letter, the corresponding author should clearly indicate that: (1) the paper contain original data; (2) the paper has not been published before; (3) the manuscript is not submitted for publication to another journal; (4) all authors have contributed to the manuscript; (5) the informed consent were obtained from all study



în mod clar că: (1) lucrarea menționată este originală; (2) lucrarea menționată nu a fost publicată anterior; (3) lucrarea menționată nu este depusă pentru publicație în altă revistă; (4) toți autorii subsemați au contribuit la elaborarea manuscrisului; (5) de la subiecții incluși în studiu a fost obținut consimțământul informat; (6) toți autorii subsemați au aprobat versiunea finală a manuscrisului; (7) acordul implicit de verificare antiplagiat al manuscrisului; (8) au fost declarate orice potențiale conflicte de interes. De asemenea, Autorul corespondent poate include orice informație suplimentară în Scrisoarea de intenție, dacă consideră că aceasta poate fi utilă pentru Redacție.

#### **Consimțământul informat**

Orice manuscris care comunică rezultate experimentale, obținute de la subiecți umani, trebuie să fie bazat pe studii, în care a fost obținut consimțământul informat de la subiect (ți) și/sau tutore (i). În scrisoarea de intenție, autorul corespondent trebuie să indice în mod clar obținerea consimțământului informat. În caz de necesitate, Redacția este în drept să solicite probe suplimentare, care atestă obținerea consimțământului informat.

#### **Comitetul de Etică**

Pentru orice studiu experimental, efectuat pe oameni sau animale, este necesar de a menționa evaluarea etică a proiectului de cercetare. În acest sens, în articol vor fi menționate numărul procesului verbal și data ședinței Comitetului de Etică, când a fost aprobat proiectul de cercetare.

#### **Permisuni**

În conformitate cu ghidurile Comitetului Internațional al Editorilor Revistelor Medicale (*ICMJE Guidelines*), în cazul când în manuscrisul prezentat este folosită sau reprodusă o informație publicată anterior, sau un material cu drepturi de autor, este de responsabilitatea Autorului corespondent să obțină permisiunea în scris a deținătorului de drepturi (*Copyright*) și să citeze corect sursa originală. Cu scopul de a menține transparența, se recomandă ca această permisiune, sub formă de copie, să fie depusă împreună cu manuscrisul.

#### **Fotografiile cu pacienți identificabili**

În conformitate cu ghidurile internaționale ale Comitetului de Etică a Publicațiilor (*COPE Guidelines*), în cazul când în imaginile prezente în manuscris (fotografii, radiograme, rezultate de laborator, rezultatele investigațiilor paraclinice, înregistrări video sau sonore ș. a.) o persoană este identificabilă fizic, de la aceasta trebuie obținută o permisiune în scris de utilizare a imaginii date. Se recomandă ca permisiunea dată să fie depusă împreună cu manuscrisul, iar în manuscris să fie stipulat în mod clar, că această permisiune a fost obținută.

#### **Specificarea medicamentelor și dispozitivelor**

În manuscris se vor utiliza nume generice de medicamente, urmate, dacă este cazul, de denumirea lor comercială între paranteze. Pentru medicamente și dispozitive, includeți numele producătorului și localizarea acestuia (țara de origine).

#### **Formatul fișierelor**

Se acceptă următoarele formate de text pentru manuscrisul principal: Microsoft Word (97, 2003, 2007, 2010) și formatele „.rtf”, „.doc”, „.docx”. Se acceptă următoarele formate pentru imagini: „.jpeg”, „.tiff”, „.eps”, „.ppt”, „.pptx”. Este posibil ca imaginile articolului să fie transmise în format „.ppt” sau „.pptx” (o imagine – un slide). Calitatea imaginilor, indiferent de format, trebuie să fie, minim: pentru desene – 800 dpi, pentru imagini cu detalii fine – 1000 dpi, pentru imagini alb-negru – de 300 dpi.

subjects (6) all coauthors approved the final version of the manuscript; (7) agreement for checking of the manuscript for plagiarism; (8) any potential conflicts of interest were disclosed. Corresponding author may include in the Cover letter any other additional information which could be useful for the editor.

#### **Informed consent**

Manuscripts that report experimental results obtained on human subjects must be based on studies in which informed consent was obtained from study subjects and/or their legal representative. The corresponding author should clearly indicate in his letter of intention about the obtaining of the informed. Editor reserved the right to request additional evidence attesting the obtaining of the informed consent.

#### **Ethic Committee**

For any experimental study conducted on humans or animals, it is necessary to mention in the article the ethical evaluation of the research project (such as date of evaluation and reference number of approval).

#### **Permissions**

In accordance with the guidelines of the International Committee of Medical Journals Editors (ICMJE Guidelines) if the submitted manuscript used or reproduced information/material previously published or copyrighted is the responsibility of the corresponding author to obtain a written permission from the owner of the copyright and properly cite the original source. In order to maintain transparency, it is recommended to submit the permission, as a copy, along with the manuscript.

#### **Pictures**

In accordance with international guidelines of the Publications Committee of Ethics (COPE Guidelines), if the manuscript contains pictures (photographs, radiograms, laboratory results, results of laboratory investigations, videos or sound etc.) which allows physical identification of the person, it must be obtained a written permission for the use of the image data. It is recommended to submit the permission along with the manuscript. Also in the manuscript text should be clearly stated that permission was obtained.

#### **Drugs and devices specifications**

In manuscript generic names of drugs, followed by their trade name in parentheses (if appropriate) should be used. For drugs and devices, manufacturer's name and location (country of origin) should be mentioned.

#### **Files format**

The following file formats for manuscript text are accepted: Microsoft Word (97, 2003, 2007, 2010) “.rtf”, “.doc”, “.docx”. Pictures should be submitted in one of the following formats: “.jpeg”, “.tiff”, “.eps”, “.ppt”, “.pptx”. The images could be transmitted also, in a format item “.ppt” or “.pptx” (one image – one slide). Scanning resolution should be as follows: drawings – at least 800 dpi, fine line images – 1000 dpi and greyscale images – at least 300 dpi.

#### **Structure of the manuscript**

*Moldovan Journal of Health Sciences* follows STROBE recommendations for reporting observational biomedical research studies. To facilitate the development of the manuscript, please consult this information available online at [www.strobe-statement.org](http://www.strobe-statement.org).

The volume of the manuscript text should not exceed 6000 words.

### Structura manuscrisului

Publicația Periodică *Moldovan Journal of Health Sciences – Revista de Științe ale Sănătății din Moldova* respectă recomandările STROBE de raportare a cercetărilor observaționale biomedicale. Pentru a vă ușura procesul de elaborare și structurare a manuscrisului, vă recomandăm să consultați informația respectivă, disponibilă online, pe site-ul [www.strobe-statement.org](http://www.strobe-statement.org).

Volumul textului unui manuscris nu trebuie să depășească 6000 de cuvinte. Cu toate că numărul figurilor și tabelelor în manuscris rămâne la discreția autorilor, se recomandă ca numărul lor să fie limitat la 5, pentru a nu reduce din lizibilitatea articolului pe paginile Revistei.

### Structura unui articol original trebuie să respecte următoarea consecutivitate:

- Titlul lung (formulat în conformitate cu ghidurile STROBE)
- Numele și prenumele complete ale autorului (autorilor)
- Afilierile autorului (autorilor)
- Datele de contact ale autorului corespondent
- Titlul scurt (va fi utilizat în calitate de colontitlu pe paginile Revistei)
- Elementele scoase în evidență din articol:
  - Ce nu este, deocamdată, cunoscut la subiectul abordat (descriș în 1-3 fraze)
  - Ipoteza de cercetare (formulată în 1-2 fraze)
  - Noutatea adusă de articol literaturii științifice din domeniu (limitată la 1-3 fraze).
- Rezumatul articolului (compus din: introducere, materiale și metode, rezultate, concluzii), limitat la maximum 350 de cuvinte.
- Cuvinte cheie
- Introducere
- Materiale și metode
- Rezultate
- Discuții
- Concluzii
- Lista abrevierilor utilizate (dacă este cazul)
- Declarația de conflict de interese
- Contribuțiile autorilor
- Mulțumiri și finanțare (dacă este cazul)
- Referințe bibliografice
- Tabele și legende la tabele (dacă este cazul)
- Ilustrații și figuri (dacă este cazul)
- Legendele figurilor (dacă este cazul)
- Descrierea datelor suplimentare, anexe (dacă este cazul)

### Pe pagina de titlu a manuscrisului trebuie să fie prezente următoarele elemente:

- **Titlul manuscrisului:** formulat în conformitate cu ghidurile STROBE, trebuie să fie laconic, relevant pentru conținutul manuscrisului, să reflecte tipul (*design*-ul) studiului și să nu depășească 25 de cuvinte. Nu se admit prezența abrevierilor în titlu.
- **Titlul scurt** (ce va fi utilizat drept colontitlu pe paginile Revistei) reprezintă o versiune scurtă, de esență, a titlului complet. Va fi limitat la 40 de caractere, inclusiv spațiile.
- **Numele autorului (autorilor).** Autori sunt numiți doar acele persoane, care au avut o contribuție substanțială la lucrare. Exemple de contribuție esențială la lucrare sunt: elaborarea *design*-ului studiului, recrutarea pacienților, participarea în colectarea datelor, analiza datelor, interpretarea rezultatelor, scrierea propriu-zisă a articolului, realizarea tehnică a testelor, investigațiilor, realizarea imaginilor, formularea concluziilor. Pot fi citați până la 10 autori indivi-

Although, the number of figures and tables in the manuscript is at the discretion of the authors, in order to not reduce article legibility it is recommended to limit their number to five.

### Structure of original article must comply with the following sequence:

- Full title (according to the STROBE guidelines)
- Full authors' name
- Authors' affiliations
- Contact details of corresponding author
- Short title (to be used as a running head on the journal)
- Article highlights:
  - What is not yet known on the issue addressed in the submitted manuscript (described in 1-3 sentences)
  - The research hypothesis (described in 1-2 sentences)
  - The novelty added by manuscript to the already published scientific literature (limited to 1-3 sentences).
- Abstract (consisting of background, materials and methods, results and conclusions), to not exceed 350 words.
- Keywords
- Introduction
- Materials and methods
- Results
- Discussions
- Conclusions
- List of abbreviations used (if applicable)
- Declaration of conflict of interests
- Authors' contributions
- Acknowledgements and funding (if applicable)
- References
- Tables and tables' captions (if applicable)
- Pictures and figures (if applicable)
- Figures' legends (if applicable)
- Description of additional data, appendices (if applicable)

### The cover page of the manuscript should include:

▪ **Title of the manuscript:** written according to the STROBE guidelines, should be concise, relevant to the content of the manuscript, and reflect the study design. The title length should not exceed 25 words. It is not allowed the presence of abbreviations in the title.

▪ **Short title:** (to be used as a running title) is a short version of the essential of the full title. Short title will be limited to 40 characters, including spaces.

▪ **Author(s) name:** Authors list must include only those persons who had a substantial contribution to the work. Examples of essential contribution to the work are: developing of the study design, patients recruitment, participation in data collection, data analysis, interpretation of results, writing of the manuscript, performing of the tests, pictures taking, drawing conclusions. The authors list should not exceed 10 persons. If the research group exceed 10 individual authors, in the "Authors name" section first two will be cited, all others should be mentioned at the end of the article, in the "Acknowledgements and funding" section.

Members of the research group who do not meet the formal criteria of the authorship, but have had some contribution to the paper, may be mentioned in the "Acknowledgements and funding" section.

**Note:** To differentiate the corresponding author, as well as authors who have an equal contribution to the work, using special

duali. În cazul când grupul de lucru depășește 10 autori individuali, vor fi citați în secțiunea „Numele și prenumele autorilor” doar primii doi, iar restul vor fi menționați la sfârșitul articolului, la secțiunea „Mulțumiri și finanțare”.

Membrii grupului de lucru, care nu îndeplinesc criteriile formale de autor enumerate, dar au avut o oarecare contribuție la lucrare, pot fi menționați în secțiunea „Mulțumiri și finanțare”.

**Notă:** Pentru a diferenția autorul corespondent și autorii care au contribuit în aceeași măsură la lucrare, folosiți caractere speciale, ca exponenți, la sfârșitul numelor lor:

(\*) – pentru Autorul corespondent;

(†) – pentru Autorii care au avut o contribuție egală.

(De exemplu: Adrian Belii\*, Adrian Belii†)

Nu se vor menționa gradele și titlurile științifice și cele științifico-didactice.

▪ **Afilieri.** Afilieră autorilor se va scrie după secțiunea „Numele autorului (autorilor)”. În acest sens, se va menționa numele complet al instituției de afiliere a autorului (autorilor), localitatea și țara.

Afilieră se marchează cu cifre arabe, în superscript (de exemplu: Adrian Belii<sup>1</sup>)

▪ **Elementele scoase în evidență din articol:**

- Ce nu este, deocamdată, cunoscut la subiectul abordat (descrie în 1-3 fraze)
- Ipoteza de cercetare (formulată în 1-2 fraze)
- Noutatea adusă de articol literaturii științifice din domeniu (limitată la 1-3 fraze).

#### Din pagină nouă:

##### Rezumatul

Rezumatul trebuie să fie scris la timpul trecut, persoana a treia. Acesta trebuie să ofere un sumar concis al scopului, obiectivelor, rezultatelor semnificative și concluziilor studiului, în limitele la 350 de cuvinte, organizate în următoarele secțiuni:

- **Introducere** – unde se va reflecta, pe scurt, contextul și scopul principal al studiului;
- **Material și metode** – cum a fost realizat studiul și ce teste statistice au fost aplicate;
- **Rezultate** – prezintă rezultatele principale ale studiului;
- **Concluzii** – o scurtă trecere în revistă a constatărilor făcute, cu posibile implicări pentru studii ulterioare.

Nu utilizați abrevieri și citații în rezumatul articolului.

##### Cuvintele cheie

Enumerați 4-10 cuvinte cheie, care sunt reprezentative pentru conținutul articolului. Pentru a ușura găsirea articolului Dvs. de către motoarele de căutare ale bazelor de date, folosiți termeni recomandați din lista de titluri cu subiect medical de pe <http://nlm.nih.gov/mesh>.

##### Înregistrarea trialului clinic

În caz dacă articolul Dvs. comunică rezultatele unui trial clinic, vă rugăm să indicați Registrul trialului și numărul unic de înregistrare a trialului.

Exemplu: „*Current Controlled Trials ISRCTN61362816*”. Atenție! Nu trebuie să existe niciun spațiu între literele și cifrele numărului unic de înregistrare a trialului. Pentru mai multe informații, va rugăm să accesați <http://www.isrctn.org> (*International Standard Randomized Controlled Trial Number*) și <http://www.icmje.org> (*International Committee of Medical Journal Editors*).

characters as a superscript index at the end of their names is recommended:

(\*) – Corresponding author;

(†) – Authors with equal contribution.

(e.g. Adrian Belii\*, Adrian Belii†)

▪ **Affiliation:** Please state the full name of institution, city and country to which the author(s) is affiliated. Affiliation should be marked with Arabic numerals in superscript after the author(s) name (e.g. Adrian Belii<sup>1</sup>)

##### ▪ Article highlights:

- What is not yet known on the issue addressed in the submitted manuscript (described in 1-3 sentences)
- The research hypothesis (described in 1-2 sentences)
- The novelty added by manuscript to the already published scientific literature (limited to 1-3 sentences).

##### From new page:

##### Abstract

The abstract should be written using the past tense, third person. It should provide a concise summary of the purpose, objectives, significant results and conclusions of the study. The summary text should not exceed 350 words organized into the following sections:

- **Introduction** – reflect in short the context and purpose of the study;
- **Material and methods** – describe how the study was conducted and specify the applied statistics;
- **Results** – present the key results of the study;
- **Conclusions** – a brief overview of the findings, with possible implications for further studies.

Do not use abbreviations or citations in the abstract of the article.

##### Key words

List 4-10 keywords that are representative for the contents of the article. To facilitate finding of your article by search engines of electronic databases, use MESH keywords list (available on <http://nlm.nih.gov/mesh>).

##### Registered clinical trial

In case if your article reported the results of a clinical trial, please indicate Trial Register and the unique registration number of the trial.

E.g.: “Current Controlled Trials ISRCTN61362816”

Attention! There should be no space between letters and numbers of the unique record number of the trial. For more information, please visit <http://www.isrctn.org> (International Standard Randomized Controlled Trial Number) and <http://www.icmje.org> (International Committee of Medical Journal Editors).

##### From new page:

##### Introduction

The Introduction section should be written using past tense, third person, and should:

- provide information that would allow readers outside of the field to enter the context of the study, to understand its meaning;
- define the problem addressed and explain why it is important;
- include a brief review of recent literature in the field;
- mention any controversy or disagreement existing in the field;
- formulate research hypothesis and present the main and secondary assessed outcomes;

**Din pagină nouă:****Introducerea**

Introducerea, scrisă la timpul trecut, persoana a treia, trebuie:

- să ofere informații care ar permite cititorilor din afara domeniului să intre în contextul studiului, să-i înțeleagă semnificația;
- să definească problema abordată și să explice de ce aceasta este importantă;
- să includă o scurtă trecere în revistă a literaturii recente din domeniu;
- să menționeze orice controverse sau dezacorduri relevante în domeniu;
- să formuleze ipoteza de cercetare și să prezinte parametrul principal și cei secundari de rezultat;
- să concludă cu scopul lucrării și cu un comentariu care să ateste dacă scopul propus a fost atins.

**Material și metode**

În secțiunea „Materiale și metode” trebuie să fie descrise cu detalii suficiente procedurile efectuate. Aici se vor menționa protocoalele detaliate privind metodele utilizate precum și informații justificative. Se vor include: *design*-ul studiului, descrierea participanților și materialelor implicate, descrierea clară a tuturor intervențiilor și comparațiilor efectuate, precum și testele statistice aplicate. Se vor specifica denumirile generice de medicamente. Atunci când în cercetare sunt folosite branduri, se indică în paranteze denumirea lor comercială. În cazul studiilor pe subiecți umani sau pe animale, trebuie să fie menționată aprobarea etică (data și nr. procesului verbal al ședinței Comitetului de Etică, președintele CE și denumirea instituției, în cadrul căreia activează CE), precum și consimțământul informat al persoanelor.

**Rezultate**

Rezultate și discuțiile vor fi prezentate în secțiuni separate.

Autorii trebuie să prezinte rezultate clare și exacte. Rezultatele prezentate trebuie explicate (nu justificate sau comparate, în această secțiune) cu constatări fundamentale, evident, referitoare la ipoteza care a stat la baza studiului. Rezultatele trebuie redade concis și logic, cu accentuarea celor noi.

**Discuții**

Se va descrie impactul, relevanța și semnificația rezultatelor obținute în domeniul respectiv. Rezultatele obținute se vor compara cu cele provenite din studiile anterioare din domeniu și se vor trasa potențiale direcții viitoare de cercetare. Discuțiile trebuie să conțină interpretări importante ale constatărilor și rezultatelor, în comparație cu studiile anterioare. De asemenea, se vor menționa limitele studiului și factorii potențiali de *bias*.

**Concluzii**

Această secțiune trebuie să concludă laconic întregul studiu și să specifice, care este plus-valoarea adusă la informațiile disponibile despre subiectul abordat. În concluzii nu se vor oferi informații noi și nu se vor dubla (repetă) cele prezentate în secțiunea „Rezultate”.

**Abrevieri**

Folosii numai abrevieri standard. De asemenea, pot fi formulate și alte abrevieri, cu condiția că acestea vor fi descifrate în text atunci când sunt utilizate pentru prima dată. Abrevierile din figuri și tabele vor fi descifrate în legendă. Abrevierile trebuie folosite cât mai rar posibil.

- conclude with the research’ propose and a short comment whether the purpose has been achieved.

**Material and methods**

“Materials and methods” section should present în sufficient details all carried out procedures. Here should be described protocols and supporting information on the used methods. It will include study design, subjects’ recruitment procedure, clear description of all interventions and comparisons and applied statistics. În the manuscript text the generic names of drugs should be used. When drug brands are used their trade name will be shown în parentheses. For studies on humans or animals a statement about ethical approval and informed consent of study subjects should be include. Please specify date and number of Ethics Committee (EC) decision, chair of the EC as well as institution within EC is organized.

**Results**

Results and discussion should be presented în separate sections. Authors must present results în a clear and accurate manner. Results should be explained (not justified or compared în this section) and include fundamental statements related to hypothesis behind the study. The results should be presented concisely and logically, emphasizing on new original data.

**Discussion**

Describe the impact, relevance and significance of the obtained results for the field. The results are compared with those from previous publications and draw potential future research directions. Discussions should include important interpretations of the findings and results compared with previous studies. Also, study limitations and potential bias should be mentioned.

**Conclusions**

This section should conclude laconically entire study, and highlight the added-value brought on the studied issue. The conclusions should not provide new information or double (repeat) those presented în the “Results” section.

**Abbreviations**

Use only standard abbreviations. Other abbreviations may be defined and provided when are used for the first time în the manuscript. Abbreviations în the figures and tables will be explained în legend. Abbreviations should be used as rare as possible.

**Declaration of conflict of interests**

Following publication, persons or organizations involved în the study become public and thus their reputation may be influenced. Therefore, authors must disclose financial and non-financial relationship with people or organizations and to declare conflicts of interest related to the data presented în the manuscript. În accordance with the ICMJE guidelines, authors must fulfill a statement of conflicts of interest, which will be published at the end of the article.

Complementing the declaration of conflicts of interest the following will be taken into consideration

**For financial conflicts of interest**

- specify whether any organization has financial relationship with research presented în the manuscript, including funding, salary, reimbursements;
- mentioned, if the article has any impact on the eventually in-

### Declarația de conflict de interese

După publicare, persoanele sau organizațiile implicate în studiu vor deveni publice și astfel poate fi influențată reputația lor. Prin urmare, autorii trebuie să dezvăluie relația financiară sau non-financiară cu persoane sau organizații și să declare conflictele de interese pentru datele și informațiile prezentate în manuscris. În conformitate cu ghidurile ICMJE, Autorul (autorii) trebuie să completeze o declarație privind Conflictele de interese, care va fi prezentată la sfârșitul articolului publicat.

Completând declarația referitoare la Conflictele de interes, se vor lua în considerație:

#### Pentru Conflicte de interese financiare

- specificați dacă vreo organizație are relație financiară cu lucrarea științifică reflectată în manuscris, inclusiv de finanțare, salariu, rambursări;
- menționați, dacă articolul are un impact asupra organizației date, ce ar genera pierderi sau profituri după publicare, în prezent sau în viitor;
- autorul (autorii) trebuie să precizeze dacă dețin cote de proprietate în orice organizație care ar putea să suporte pierderi sau să aibă profituri după publicare, în prezent sau în viitor. De asemenea, se recomandă să se specifice dacă autorul (autorii) dețin(e) sau aplică pentru orice drepturi de proprietate (brevet) în legătură cu conținutul utilizat în manuscris;
- precizați dacă există oricare alte conflicte de interese.

#### Pentru Conflicte de interese non-financiare

- Vă rugăm să specificați oricare conflicte de interese non-financiare legate de politică, individuale, religioase, ideologice, educaționale, raționale, comerciale etc., care au legătură cu manuscrisul.

### Contribuția autorilor

Această secțiune a manuscrisului are rolul de a specifica contribuția și gradul de implicare a fiecărui autor. În acest sens, vă rugăm să respectați formatul exemplului propus: „*HW a conceput studiul, a participat la design-ul studiului și a ajutat la redactarea manuscrisului. MG a efectuat procesarea exemplarelor, a metodelor de cultură ale țesutului și a elaborat manuscrisul. TK a efectuat testele de imunofluorescență. PN a participat la colorarea probelor și la analiza citometrică prin flux. AR a participat la elaborarea design-ului studiului și a efectuat analiza statistică. Manuscrisul final a fost citit și aprobat de către toți autorii*”.

Fiecare Autor trebuie să aibă o contribuție individuală în desfășurarea cercetării, pregătirii manuscrisului și publicării lucrării. Un Autor trebuie să contribuie semnificativ la conceptul și design-ul lucrării, la efectuarea procedurilor experimentale, la colectarea datelor, la compilarea, analiza, interpretarea și validarea rezultatelor.

Conform recomandărilor Comitetului Internațional al Editorilor Revistelor Medicale, ICMJE, ([www.icmje.org](http://www.icmje.org)), drept autor poate fi considerată persoana care se încadrează în toate cele 4 criterii:

1. a adus o contribuție individuală substanțială conceperii, elaborării design-ului cercetării, sau a colectat, analizat sau interpretat datele;
2. a elaborat manuscrisul sau l-a revăzut în mod critic, aducând o contribuție intelectuală importantă;
3. a aprobat versiunea finală a manuscrisului, gata pentru publicare;
4. este de acord să fie responsabilă pentru toate aspectele legate de cercetarea efectuată și de manuscrisul depus pentru publicare și să dea asigurare, că toate întrebările referitoare la acu-

volved organization and could generate losses or profits after publication, now or in the future;

- authors must indicate if they have shares ownership in any organization that may incur losses or take profits after publication, now or in the future. Also, you should specify whether the author (s) own (s) or apply to any property rights (patent) on the content used in the manuscript;
- indicate if there are any other conflicts of interest.

#### For non-financial conflicts of interest

- Please specify any non-financial conflicts of interest: political individual, religious, ideological, educational, rational, commercial etc. related to manuscript.

### Authors' contributions

This section of the manuscript is to specify the input and involvement of each author. In this regard, please follow the suggested format: “*HW conceived the study and participated in study design and helped drafting the manuscript. MG performed the processing of specimens and tissue culture methods and drafted the manuscript. TK performed immunofluorescence tests. PN participated in staining and flow-cytometry. AR participated in the study design and performed the statistical analysis. Final manuscript was read and approved by all authors*”.

Each author must have an individual contribution to the research, manuscript preparation and work publication. An author should contribute substantially to one of the following: the concept and design of the work, performing of the experimental procedures, data collection, compilation, analysis, interpretation and validation of results.

According to the International Committee of Medical Journals Editors, ICMJE ([www.icmje.org](http://www.icmje.org)), as author may be a person who fit all four of following criteria:

1. has made a substantial personal contribution in designing, developing research protocol, or collected, analyzed and interpreted data;
2. developed or reviewed critically the manuscript bringing a significant intellectual contribution;
3. approved the final version of the manuscript ready for publication;
4. agrees to be responsible for all aspects of the conducted research and submitted manuscript and to assure that all questions relating to accuracy or completeness of the work was adequately assessed and resolved.

**Note:** Persons who have contributed to the work, but not fit the four criteria mentioned above cannot be considered as authors. Their contribution will be mentioned in the “Acknowledgment and funding section” of the manuscript. Also, people who have only been involved in data collection, monitoring, technical assistance and funding, are not eligible as coauthors, but they may be mentioned in the “Acknowledgements and funding” section. Mere position of head of unit, department or institution, on which the research was conducted, without fulfilling all four ICMJE criteria, doesn't provide the right to be a coauthor of the work.

### Acknowledgements and funding

People who contributed to the study design, data collection, analysis and interpretation, manuscript preparation and editing, offered general or technical support, contributed with essential materials to the study, but do not meet ICMJE authorship criteria will not be

rateșea sau integritatea lucrării vor investigate și rezolvate în mod corespunzător.

**Notă:** Persoanele, care au contribuit la realizarea lucrării, însă nu se încadrează în toate cele 4 criterii enunțate mai sus, nu pot fi considerate drept autori; contribuția acestora va fi menționată în secțiunea „mulțumiri și finanțare” a manuscrisului. De asemenea, persoanele care au fost implicate doar în colectarea datelor, supraveghere, asistență tehnică și finanțare, nu dețin drept de Autor, dar ei pot fi menționați în secțiunea „mulțumiri și finanțare”. Simpla deținere a funcției de șef de unitate, departament sau instituție, în cadrul căreia s-a efectuat cercetarea, fără îndeplinirea tuturor celor 4 recomandări ale ICMJE, nu oferă dreptul de a fi (co)autor al lucrării.

### Mulțumiri și finanțare

Persoanele care au contribuit la elaborarea *design*-ul studiului, colectarea datelor, analiza și interpretarea acestora, la pregătirea manuscrisului și la redactarea lui critică, au oferit suport general sau tehnic, au contribuit cu materiale esențiale pentru studiu, dar care nu îndeplinesc criteriile ICMJE de Autor, nu vor fi considerate drept Autori, dar contribuția lor va fi menționată în secțiunea „mulțumiri și finanțare”. Tot în această secțiune se vor menționa sursele de finanțare ale lucrării. Menționarea persoanelor fizice sau juridice, care au contribuit la realizarea lucrării și manuscrisului, poate fi făcută doar după obținerea unei permisiuni de la fiecare dintre ele.

### Tabelele

Fiecare tabel va fi creat cu dublu-spațiere și amplasat pe o pagină separată, după textul manuscrisului. Enumerarea tabelelor va fi consecutivă, cu cifre arabe, în ordinea primei lor citări în text, scris cu caractere grase (**bold**), alinierea – pe stânga, deasupra tabelului. Fiecare tabel va avea un titlu laconic, care va fi scris cu caractere normale (regular) sub numărul tabelului. Nu utilizați caractere bold în interiorul tabelului. Urmați exemplul prezentat:

**Tabelul 1.** Evenimente adverse intra-anestezice și imediat post-extubare

	Lot experimen- tal (n=100)	Lot control (n=100)	p
Disritmii	6,0%	3,0%	0,49
Instabilitate hemodinamică	7,0%	1,0%	0,034
Trezire prelungită*	11,0%	4,0%	0,19
GVPO† post-extubare	8,0%	27,0%	0,007
Durere intensă la trezire	17,0%	19,0%	1,0

Notă: \* – trezire neobișnuit de lentă, după ce concentrația cerebrală a reziduurilor de anestezice a trecut sub pragul de inducere a hipnozei; † – greață și vomă postoperatorie. Analiza statistică utilizată: testul Fisher.

Legendele și notele explicative vor fi făcute sub tabel. Toate abrevierile non-standard se vor explica în notele de subsol, folosind următoarele simboluri, în următoarea ordine: \*, †, ‡, §, ||, ¶, \*\*, ††, ‡‡, §§, ||||, ¶¶ etc.

Menționați, de asemenea, testele statistice aplicate și tipul de date prezentate. Asigurați-vă că fiecare tabel este citat în text. Dacă utilizați date din altă sursă publicată sau nepublicată, trebuie să obțineți permisiunea și să declarați pe deplin sursa sub tabel.

considered as authors, but their contribution will be mentioned in section “Acknowledgements and funding”. Also in this section must be specified the sources of work funding. Mention of persons or institutions who have contributed to the work and manuscript can be made only after obtaining permission from each of them.

### Tables

Content of each table should be double-spaced and placed on a separate page after the text of the manuscript. Tables numbering will be done using consecutive Arabic numerals in the order of their first citation in the text; it should be written in bold, align to left and place above the table. Each table should have a concise title that will be written in bold (regular) under table number. Do not use bold within the table. Please follow the example:

**Table 1.** Intra-anesthetic and immediately post-extubation adverse events

	Experimental Cohort (n=100)	Control Cohort (n=100)	p
<i>Dysrhythmia</i>	6.0%	30%	0.49
Hemodynamic instability	7.0%	1.0%	0.034
Prolonged awakening*	11.0%	4.0%	0.19
PONV† post-intubation	8.0%	27.0%	0.007
Strong pain on awakening	17.0%	19.0%	1.0

Note: \* – Unusually slow awaking, after that cerebral concentration of the anesthetic reach the under hypnotic level; † – postoperative nausea and vomiting. Used statistical analysis: Fisher’s exact test.

Legends and notes will be placed under the table. All non-standard abbreviations should be explained in footnotes, using the following symbols, in the following order: \*, †, ‡, §, ||, ¶, \*\*, ††, ‡‡, §§, ||||, ¶¶ etc.

Applied statistical tests and the type of presented data should be also mentioned. Make sure that each table is cited in the text. If you use data from another published or unpublished source, you must obtain permission and cited the source below the table.

### Figures

Figures will be included in the main manuscript, and also submitted as separate files. The manuscript figures should be presented, each one on a separate page and should be numbered consecutively with Arabic numerals in the order of their citation in the text. Figure numbering will be written abbreviated (**Fig. 1**), using bold fonts, left alignment, and placed under the figure. Each figure should have a laconic title that will be written using regular font and placed in the right of the figure’s number.

Figures’ quality should assure the visibility of details. Pictures of persons potentially identified must be accompanied by written permission to use it. If a figure has been previously published, please cite the original source and submit the written permission to reproduce the figure from the copyright owner. Permission can be taken from both the author and the publisher, except the documents of public domain.

For figures, the following file formats are accepted:

- TIFF
- JPEG
- EPS (preferred format for diagrams)

## Figurile

Figurile vor fi prezentate atât în manuscris, cât și pe fișiere separate. În manuscris, figurile vor fi prezentate după textul lucrării, fiecare pe pagină separată și vor fi numerotate consecutiv, cu cifre arabe, în ordinea citării lor în text. Numerotarea va fi scrisă abreviat (**Fig. 1**), cu caractere grase (**bold**), alinierea – pe stânga, sub figură. Fiecare figură va avea un titlu laconic, care va fi scris cu caractere normale (regular) în dreptul numerotării.

Figurile trebuie să fie calitative, vizibile în detaliu. Fotografiile cu persoane potențial identificabile trebuie să fie însoțite de permisiunea scrisă de a utiliza fotografia. În caz contrar, fața persoanelor trebuie acoperită cu o bandă neagră. În cazul în care o figură a fost publicată anterior, faceți referință la sursa originală și prezentați permisiunea scrisă de la deținătorul drepturilor de autor pentru a reproduce figura. Permisiunea poate fi luată atât de la autorul figurii, cât și de la editor, cu excepția documentelor din domeniul public.

Pentru figuri, sunt acceptate următoarele formate de fișiere:

- TIFF
- JPEG
- EPS (format preferat pentru diagrame)
- PowerPoint (figurile trebuie să fie de mărimea unui singur diapozitiv)

Titlul fișierului va consta din numărul figurii și un titlu scurt, identificabil.

## Legendele figurilor

Legenda figurii va fi scrisă în continuare, imediat după titlul figurii. Descrierea figurii nu trebuie să repete descrierea din textul manuscrisului. Când sunt folosite simboluri, săgeți, numere sau litere pentru a identifica, descrie părți ale ilustrațiilor, identificați-le și explicați-le pe fiecare în mod clar în legendă. Explicați scala internă și identificați metoda de colorare în microfotografii.

Vă rugăm să rețineți că este de responsabilitatea autorului (autorilor) de a obține permisiunea de la deținătorul drepturilor de autor pentru a reproduce figuri sau tabele care au fost publicate anterior în altă parte. Imaginile color vor fi tipărite din contul autorilor.

## Referințele bibliografice

Toate referințele bibliografice trebuie să fie numerotate consecutiv, între paranteze pătrate [ ], în ordinea în care sunt citate în text. Citatele de referință nu trebuie să apară în titluri sau subtitluri. Fiecare referință trebuie să aibă un număr individual. Citările multiple din cadrul unui singur set de paranteze trebuie să fie separate prin virgulă și spațiu. În cazul în care există trei sau mai multe citări secvențiale, acestea ar trebui să fie indicate sub formă de serie. Exemplu: [1, 5-7, 28].

Vă rugăm să evitați folosirea excesivă a referințelor. În cazul în care se folosesc sisteme automate de numerotare, numerele de referință trebuie să fie finalizate, iar bibliografia trebuie formatată complet înainte de depunere. Lista de referință trebuie să conțină toți autorii. Abrevierea revistelor trebuie să fie în conformitate cu Index Medicus / MEDLINE. Pot fi citate doar articolele sau rezumatele care au fost publicate și care sunt disponibile, accesibile prin intermediul serverelor publice. Orice rezumate sau articole nepublicate sau cu caracter personal nu trebuie să fie incluse în lista de referință, dar pot fi incluse în text și citate în mod corespunzător, indicând cercetătorii implicați. Obținerea permisiunii printr-o scrisoare de la autori pentru a le cita comunicările sau datele nepublicate sunt în responsabilitatea autorului corespondent al articolului.

## Formatul referințelor

Autorii sunt rugați să furnizeze cel puțin un link pentru fiecare referință bibliografică (preferabil PubMed).

○ PowerPoint (figures should be of the size of a single slide)

The file title should include the figure number and an identifiable short title.

## Figures' legends

Figure's legend should be written immediately after the figure's title. Figure's description should not repeat the description in the text of the manuscript. When used symbols, arrows, numbers or letters to describe parts of the figure, explain clearly each one of them in the legend. Explain the internal scale and identify the staining method of the photomicrographs.

Please note that it is the responsibility of the author(s) to obtain permission from the copyright holder to reproduce figures or tables that have been published previously elsewhere. Color images will be printed at the expense of the manuscript authors.

## References

All references must be numbered consecutively, in square brackets [ ], in the order they are cited in the text. Reference citations should not appear in titles or subtitles. Each reference should have an individual number. Multiple citations within a single set of brackets must be separated by commas and spaces. If there is a sequence of three or more citations, they have to be given as a range (e.g. [1, 5-7, 28]).

Please avoid excessive use of references. If an automatic system of citation is used, reference numbers must be finalized and the bibliography must be fully formatted before submission. Reference list should include all authors. Journals' abbreviation must be in accordance with Index Medicus/MEDLINE. It may be cited only articles or abstracts that have been published and are available through public servers. Any abstracts or unpublished data or personal items should not be included in the reference list, but may be included in the text and cited accordingly, indicating the involved researchers. It is of manuscript authors' responsibility to obtain the permission to refer to unpublished data.

## References format

Authors are asked to provide at least one link for each citation (preferably PubMed).

### ○ Journal article reference

Surname and initials of the author(s), separated by commas (regular). Title of article (regular). Abbreviated name of the journal (in italics), followed by the year, volume number: pages number (regular). Articles in press should be specified as "***In press***" (italic, bold), after the pages number. All the authors should be listed.

e.g.: "1. Belfi A., Cobăletchi S., Casian V., Belfi N., Severin G., Chesov I., Bubulici E. Les aspects pharmaco-economiques dans la gestion de la douleur periopératoire. Mise au point. *Ann Fr Anesth Réanim*, 2012; 31: 60-66. "

### ○ Book reference

Surname and initials of the author (s), separated by commas (regular). Title of chapter (regular) (cited page(s) number). In: Title of book. Details of the editor, publisher, place, year of publication.

e.g. "Belii A. Risk management and patient safety version anesthesia and intensive care unit (p. 115-134). In: Recommendations and Protocols in Anesthesia, Intensive care and Emergency medicine. Editors: Sandesc D., Bedreag O., Papurica M. Ed. Mirton, Timisoara, Roma-

○ *Referință la revistă*

Numele și inițialele autorului sau al autorilor, separate prin virgulă (regular). Titlul articolului (regular). Forma abreviată a denumirii revistei (italic), urmat de anul, numărul volumului: numărul paginilor (regular). Articolele în curs de publicare citate vor fi menționate cu „***In press***” (italic, bold), după numărul paginilor. Se vor menționa toți autorii articolului.

Ex: „1. Belîi A., Cobălețchi S., Casian V., Belîi N., Severin G., Chesov I., Bubulici E. Les aspects pharmaco-economiques dans la gestion de la douleur periopératoire. Mise au point. *Ann Fr Anesth Réanim*, 2012; 31: 60-66.”

○ *Referință la carte*

Numele și inițialele autorului sau al autorilor, separate prin virgulă (regular). Titlul capitolului (regular) (numărul paginii sau paginilor citate). În: Titlul cărții. Detalii privind Editorul. Editura, locul, anul editării.

Ex: „1. Belîi A. Gestiunea riscului și siguranța pacientului în anestezie și terapie intensivă (p. 115-134). În: Recomandări și protocoale în anestezie, terapie intensivă și medicină de urgență. Editori: Săndesc D., Bedreag O., Păpurică M. Ed. Mirton, Timișoara, România, 2010.”

○ *Referința la Web*

Numele și inițialele autorului sau al autorilor, separate prin virgulă, sau denumirea deținătorului de drept de autor (regular). Titlul. Numele site-ului. Disponibil la adresa: [URL]. Accesat pe: data.

Exemplu: „Agency For Healthcare Research and Quality (AHRQ). Production pressures. WebM&M. Disponibil la adresa: [http://webmm.ahrq.gov/case.aspx? caseID=150]. Accesat pe: 18.06.2010.”

**Pentru precizări și informații suplimentare:**

Adrian Belîi, dr. hab. șt. med., prof. univ.,  
Redactor-șef  
tel: +373 79579474  
e-mail: editor.mjhs@usmf.md

nia, 2010”.

○ *Web reference*

Name and initials of the author(s), separated by commas, or Copyright holder (regular). Title. Site Name. Available at: [URL]. Accessed: date.

E.g.: “Agency for Healthcare Research and Quality (AHRQ). Production Pressures. WebM & M. Available at: [http://webmm.ahrq.gov/case.aspx? caseID = 150]. Accessed on: 18.06.2010”.

**For more details, please contact:**

Adrian Belîi, PhD, university professor  
Editor-in-chief  
tel: +373 79579474  
e-mail: editor.mjhs@usmf.md



## SCRISOARE DE ÎNSOȚIRE

Titlul manuscrisului: \_\_\_\_\_

Relevanța manuscrisului pentru scopul promovat de Revistă: \_\_\_\_\_

Ce aduce nou manuscrisul domeniului (specialității) în care este publicat: \_\_\_\_\_

Modul în care manuscrisul adaugă valoare la literatura științifică de specialitate: \_\_\_\_\_

Noi, autorii subsemnați ai manuscrisului, declarăm că (bifați):

- lucrarea menționată este originală;
- lucrarea menționată nu a fost publicată anterior;
- lucrarea menționată nu este depusă pentru publicare în altă revistă;
- toți autorii subsemnați au contribuit la elaborarea manuscrisului;
- de la subiecții incluși în studiu a fost obținut consimțământul informat;
- toți autorii subsemnați au aprobat versiunea finală a manuscrisului;
- suntem de acord cu verificarea antiplagiat a manuscrisului;
- au fost declarate orice potențiale conflicte de interes.

Prin prezenta, autorii sunt de acord să transfere drepturile de proprietate (copyright) *Revistei de Științe ale Sănătății din Moldova – Moldovan Journal of Health Sciences*, în caz că manuscrisul va fi publicat.

**Autorii (nume, prenume complet, semnătură):**

1. \_\_\_\_\_
2. \_\_\_\_\_
3. \_\_\_\_\_
4. \_\_\_\_\_
5. \_\_\_\_\_
6. \_\_\_\_\_
7. \_\_\_\_\_

Locul și data: \_\_\_\_\_

**Datele de contact ale autorului corespondent:**

Instituția: \_\_\_\_\_

Adresa: \_\_\_\_\_

e-mail: \_\_\_\_\_

tel./fax: \_\_\_\_\_

## DECLARAȚIA AUTORILOR

Titlul manuscrisului: \_\_\_\_\_

Toate persoanele care îndeplinesc criteriile de autor sunt menționate drept autori. Toți autorii certifică faptul că au participat suficient elaborarea lucrării, încât să își asume responsabilitatea publică pentru conținutul remis, inclusiv pentru concept, design, analiză, scris sau revizuire a manuscrisului. Mai mult decât atât, fiecare autor certifică faptul că acest material sau un material similar nu a fost și nu va fi propus spre publicare sau publicat în orice altă ediție periodică, înainte de apariția lui în Revista de Științe ale Sănătății din Moldova.

**Contribuția autorilor:**

Vă rugăm să indicați contribuțiile specifice efectuate de fiecare autor (înscrieți inițialele autorilor, urmate de numele lor, de exemplu: A. Belfi, Gh. Rojnovceanu). Numele fiecărui autor trebuie să apară cel puțin o dată în fiecare dintre cele trei categorii, menționate mai jos.

**Categoria 1**

Concepția și design-ul studiului: \_\_\_\_\_;

Achiziția de date: \_\_\_\_\_;

Analiza și/sau interpretarea datelor: \_\_\_\_\_.

**Categoria 2**

Elaborarea (drafting-ul) manuscrisului: \_\_\_\_\_;

Revizuirea semnificativă a manuscrisului, cu implicare intelectuală semnificativă: \_\_\_\_\_.

**Categoria 3**

Aprobarea versiunii „gata pentru tipar” a manuscrisului (trebuie menționate numele tuturor autorilor):

\_\_\_\_\_;

\_\_\_\_\_.

**Mulțumiri:**

Toate persoanele care au adus contribuții importante la lucrul raportat în scris (de exemplu, ajutor tehnic, scris și asistență la editare, suport general), dar care nu îndeplinesc criteriile de autor, sunt menționate în secțiunea „Mulțumiri”, iar acestea și-au dat acordul în scris ca să fie menționate. Dacă secțiunea „Mulțumiri” lipsește din manuscris, atunci acest fapt semnifică că nu au existat contribuții substanțiale din partea non-autorilor.

\_\_\_\_\_.

**Prezenta declarație este semnată de către toți autorii:***(puteți utiliza o fotocopie a formularului dat în cazul existenței mai mult de 6 autori)*

Numele autorului (tipărit)

Semnătura autorului

Data

\_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

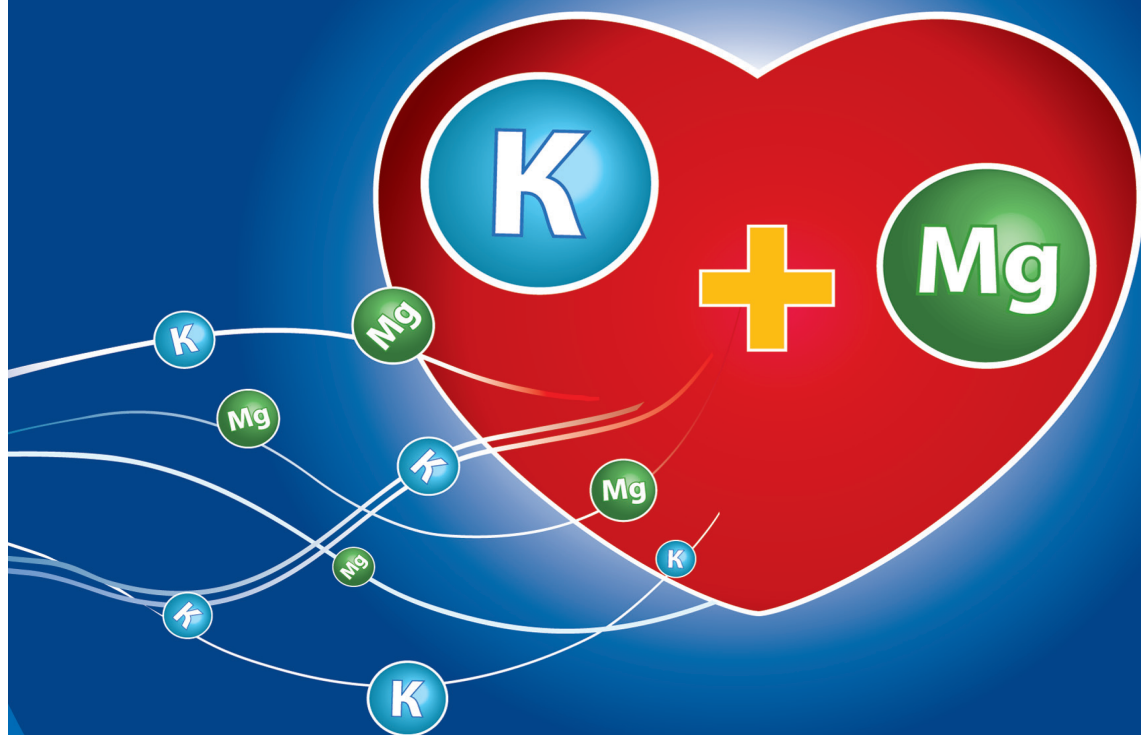
\_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

Vă rugăm să transmiteți acest formular completat și scanat pe adresa: editor.mjhs@usmf.md

# PANANGIN®

## Vital pentru inimă!



- Aportul regulat de magneziu reduce riscul atacului de cord de 2 ori. <sup>1</sup>
- Suplimentarea cu potasiu scade riscul de accident vascular cerebral cu 40%. <sup>2</sup>
- Panangin conține magneziu și potasiu

1. Магний и сердечно-сосудистые заболевания. РМЖ, № 20 2007, 1498-1501  
2. Ascherio A, Rimm EB, Hernan MA, et al. Intake of potassium, magnesium, calcium, and fiber and risk of stroke among U.S. men. Circulation. 1998;98:1198-1204, Khaw KT, Barrett-Connor E. Dietary potassium and stroke-associated mortality: a 12-year prospective population study. N Engl J Med. 1987;316:235-240



GEDEON RICHTER

Acesta este un medicament. Citiți cu atenție prospectul. Dacă apar manifestări neplăcute, adresați-vă medicului sau farmacistului.  
Nr. 13490 din 23.10.2008

**NOU**

**mertenil**<sup>®</sup>  
rosuvastatin

**Cel mai puternic statin de ultimă generație**

**Corecție rapidă a nivelului de lipide**

**Tot spectrul de doze: 5 mg, 10 mg, 20 mg, 40 mg**



**ATENȚIE**



**PROTECȚIE**



**MERTENIL**

Nr. 16902; 16899; 16900; 16901 din 05.10.2011

**Un aliat prietenos în gestionarea colesterolului**



GEDEON RICHTER

Reprezentanța în Republica Moldova, Chișinău, str. A. Pușkin, 47/1, bl. A, of.1; Tel./Fax: 22-14-49; 22-26-71;  
[www.gedeonrichter.md](http://www.gedeonrichter.md)