

## GENETSKA PODLOGA ASEPTIČKE NESTABILNOSTI TOTALNE ENDOPROTEZE ZGLOBA KUKA

### GENETIC BACKGROUND OF ASEPTIC INSTABILITY AFTER TOTAL HIP ARTHROPLASTY

ROBERT KOLUNDŽIĆ, VLADIMIR TRKULJA, DUBRAVKO ORLIĆ\*

**Deskriptori:** Totalna endoproteza zgloba kuka – komplikacije; Osteoliza – genetika, komplikacije; Zglobna nestabilnost – etiologija; Genetska sklonost bolesti; Postoperativne komplikacije

**Sažetak.** Ugradnja totalne endoproteze zgloba kuka dramatično je unaprijedila liječenje niza bolesti zgloba, no ta je metoda, s druge strane, pogodovala nastanku nove bolesti – periprostetske osteolize s posljedičnom aseptičkom nestabilnosti endoproteze. Aseptička nestabilnost najčešća je kasna komplikacija ugradnje endoproteze i glavni uzrok njezine nestabilnosti, odnosno nefunkcionalnosti. Molekularni i stanični mehanizmi ove komplikacije vrlo su opsežno istraženi i jasno je pokazana važnost protetskog materijala i oblikovanja u njezinu nastanku. No, prepoznata je i činjenica da postoji određena individualna sklonost njezinu nastanku koja nije određena ni svojstvima endoproteze ni demografskim ili morbiditetnim svojstvima bolesnika. Posljednjih je godina provedeno nekoliko manjih studija koje su pokušale definirati »genetsku podlogu individualne sklonosti« aseptičkoj nestabilnosti. Sve su slijedile istu logiku – tražena je veza između komplikacije i gena koji kodiraju za medijatore upale i/ili koštanog remodeliranja, posebice onih s poznatim polimorfizmima koji utječu na ekspresiju/aktivnost. Do sada su pronađene neke združenosti, što ovom pristupu daje, barem teorijski, potencijal da rezultira sustavom razmjerno pouzdanog predviđanja individualnog rizika, koji bi pak mogao utjecati na individualizaciju u odabiru protetskih materijala, programa postoperativne terapije ili terapije lijekovima. Međutim ova su istraživanja u ranoj fazi. Budući napori trebali bi biti usmjereni prema a) definiranju genskih markera – pouzdanih prediktora i b) definiranju funkcionalnih veza između određenih genskih markera i aseptičke nestabilnosti. Ti su ciljevi neostvarivi bez primjene tehnika proteomske analize.

**Descriptors:** Arthroplasty, replacement, hip – adverse effects; Osteolysis – genetics, complications; Joint instability – etiology; Genetic predisposition to disease; Prosthesis failure; Postoperative complications

**Summary.** Total hip arthroplasty (THA) has dramatically improved the treatment of an entire range of hip joint diseases. On the other hand, however, it has favored the development of a new disease – periprosthetic osteolysis with a consequent instability of THA. Aseptic instability is the major late complication of THA and the main reason of its malfunction. Molecular and cellular mechanisms of this complication have been thoroughly studied. The importance of prosthetic materials and design have been clearly demonstrated. However, existence of individual susceptibility to development of this complication that is determined neither by endoprosthesis properties nor by demographic or morbidity characteristics of a patient has also been recognized. In the recent years, several smaller studies have tried to define the »genetic background of the individual susceptibility« towards the development of aseptic instability. All these studies followed the same logic – they searched for a link between the complication and genes coding for mediators of inflammation and/or bone remodeling, particularly those with known polymorphisms that influence expression/activity. Several associations have been found indicating, at least theoretically, a potential of developing a system of relatively reliable individual risk prediction, which in turn could result in individualized choice of prosthetic material, postoperative therapy programs and medication therapy. However, this research is at an early stage and future efforts should be focused on a) identification of genetic markers – reliable predictors and b) identification of functional links between particular genetic markers and aseptic instability. It is impossible to meet these goals without application of techniques of proteomic analysis.

Liječ Vjesn 2012;134:218–223

Tijekom posljednjih desetljeća ugradnja totalne endoproteze zgloba kuka postala je standardni zahvat u liječenju niza stanja karakteriziranih disfunkcijom i boli u kuku (s primarnim osteoartritisom i reumatoidnim artritisom kao vodećim uzrocima) te se pokazala izuzetno uspješnom u smanjenju boli, povećanju funkcionalnosti i kvalitete života.<sup>1,2</sup> Već su prve suvremene endoproteze s početka 1960-ih (Charnley) pokazale odlične rezultate,<sup>3-6</sup> a daljnji doprinosi svojstvima materijala i oblikovanju implantata, kirurškim tehnikama i postoperativnim terapijama unaprijedili su cjelokupnu vrijednost ovog zahvata.

Ipak, koliko god revolucionarna, nepobitna je činjenica da je moderna endoproteza zgloba kuka pogodovala razvoju

posve nove bolesti, prethodno nepoznate u čovjeka – periprotetskoj osteolizi koja rezultira (aseptičkim) popuštanjem i nestabilnošću endoproteze.<sup>7</sup> Zbog polagane i postupne progresije bez dramatičnih simptoma prije posljednje faze, tj. nestabilnosti endoproteze i konačnog iščašenja, ponovno

\* **Klinika za ortopediju, Medicinski fakultet Sveučilišta u Zagrebu, KBC Zagreb** (prof. dr. sc. Robert Kolundžić, dr. med.; prof. dr. sc. Dubravko Orlić, dr. med.), **Katedra za farmakologiju, Medicinski fakultet Sveučilišta u Zagrebu** (doc. dr. sc. Vladimir Trkulja, dr. med.)

Adresa za dopisivanje: Prof. dr. sc. Robert Kolundžić, Klinika za ortopediju, Medicinski fakultet Sveučilišta u Zagrebu, KBC Zagreb, Šalata 6, 10000 Zagreb, e-mail: robert.kolundzic@zg.t-com.hr

Primljeno 31. ožujka 2010., prihvaćeno 22. listopada 2010.

se javljaju bol i disfunkcija koje zahtijevaju reviziju. Prvi je puta primijećena petnaestak godina nakon ugradnje prvih Charnleyevih implantata.<sup>7</sup> Charnleyev implantat nadišao je glavne nedostatke ranih pokušaja zamjene kuka – imao je dobre mehaničke karakteristike te je omogućavao stabilnu fiksaciju čime su izbjegnute frakture ili perakutne masivne osteolize. Kod pravilne ugradnje komplikacije poput infekcija ili iščašenja bile su relativno rijetke.<sup>8</sup> Međutim dugoročna promatranja upozorila su na stopu neuspjeha koja se s vremenom povisuje: u oko 10% implantata bez ranih komplikacija na kraju, tijekom sljedećih 10–15 godina, nastaje nestabilnost, a u oko 20% nestabilnost nastaje tijekom 20–25 godina, većinom zbog nestabilnosti acetabularne komponente, rjeđe zbog nestabilnosti ležišta (ili objiju komponenta).<sup>3–6</sup> I dok su ovi podaci o vremenu »preživljenja« zaista impresivni, posebice kada uzmemo u obzir da bi za mnoge (starije) pacijente pružili dobru uslugu bez komplikacija do kraja njihova prirodnog života, ostaje činjenica da implantati imaju vijek trajanja te da, s gledišta individualnog pacijenta, nema garancije hoće li (ili neće) i kada proteza otkazati.<sup>8</sup> Stoga je aseptičko popuštanje (nestabilnost) zbog periprotetske osteolize glavna kasna komplikacija ugrađene endoproteze – to je vodeći uzrok nestabilnosti endoproteze i potrebe za revizijom.<sup>3–8</sup> Napredak u razumijevanju molekularne i stanične biologije periprotetske osteolize sveobuhvatno je prikazan u nekoliko radova.<sup>9–13</sup> Unatoč nesigurnosti u pojedinim pitanjima i proturječju oko uloge nekih čimbenika biološka podloga ove komplikacije može se sažeti u nekoliko ključnih točaka. Kritični početni korak je stvaranje *debrisa* – otpuštanje malenih čestica protetskih komponenta u okolno tkivo s nosivih površina, cementa ili kontaktnih površina između kosti i protetskih materijala zbog trenja i/ili korozije. Ove čestice imaju pristup zglobu te pridonose daljnjem generiranju *debrisa*, a makrofagi i/ili mononuklearni histiociti ih fagocitiraju. S Charnleyevim implantatima (ili drugima koji sadržavaju klasični polietilen) 70–90% otpuštenih čestica su polietilenske čestice, no važni su također polimetilmetakrilatni (PMMA) koštani cement i metalne čestice. Uz prisutnost velike količine *debrisa* »pokušaji čišćenja« od strane fagocita postaju kontraproduktivni – s obzirom na to da su pretjerano stimulirane, one oslobađaju brojne medijatore upale i time pokreću niz događaja koje karakterizira kompleksno međudjelovanje staničnih i humoralnih čimbenika. Važna karakteristika otpuštenih čestica, u vezi s njihovom sposobnosti pokretanja ove neželjene pojave, jest njihova veličina – one moraju biti dovoljno malene (npr. <10 μm) kako bi mogle biti fagocitirane (veće čestice koje nije moguće fagocitirati također mogu izazvati »reakciju na strano tijelo«, ali one se ne smatraju kritičnima).<sup>9–13</sup> Konačni je rezultat poremećena ravnoteža osteoblasta i osteoklasta, s dominantnom aktivnosti osteoklasta (povećana apoptoza osteoblasta, pojačana osteoklastogeneza, tj. regrutiranje preteča osteoklasta i njihov razvoj u aktivne osteoklaste). Važni stanični čimbenici koji sudjeluju u ovoj kroničnoj upalnoj reakciji i povezuju početne događaje (stvaranje *debrisa*) i konačni rezultat (osteoliza i nestabilnost endoproteze) jesu makrofagi, monostanični histiociti, fibroblasti i T-limfociti [T-limfociti proizvode RANKL – glavni proosteoklastogeni faktor (vidi dolje), kao i gama-interferon, glavni antiosteoklastogeni faktor]. Oni oslobađaju različite kemoatraktante [kemokine poput MCP-1, MIP-1α, interleukina 8 (IL8)], proteinaze koje posreduju u oštećenju tkiva (poput matriksnih-metaloproteinaza, MMP, kolagenaza), proupalne citokine poput prostaglandina E2 (PGE2), interleukina 1 beta

(IL-1β), interleukina 6 (IL-6), čimbenika nekroze tumora alfa 1 (TNF-α1), čimbenike rasta poput čimbenika rasta kolonija makrofaga (M-CSF), transformirajućeg čimbenika rasta beta (TGF-β, koji može izravno utjecati na aktivnost osteoklasta) ili čimbenika rasta 1 sličnog inzulinu (IGF-1) i glavni medijator za regrutaciju i aktivaciju osteoklasta – ligand za receptor aktivator jezgrinog čimbenika kapa-B (NFκB) – RANKL. RANKL se veže na svoj receptor RANK na površini osteoklastnog progenitora i osteoklasta te pospješuje njihovo sazrijevanje i aktivaciju. Osteoprotegerin (OPG) protein je koji veže RANKL i prevenira njegovo vezanje na RANK. Vjeruje se da se osteoliza javlja kada je omjer RANKL/osteoprotegerin vrlo visok. Od unutarstaničnih čimbenika transkripcijski čimbenik NFκB čini se presudnim u ovom procesu, ne samo zbog svoje uloge u sazrijevanju–aktivaciji osteoklasta već i zato što se većinom aktivira u makrofagima putem interakcije s oslobođenim česticama, a poznato je da pogoduje izlučivanju niza proupalnih citokina.<sup>9–13</sup>

### Čimbenici koji pospješuju periprotetsku osteolizu i aseptičku nestabilnost i mogućnosti njihove kontrole

Razumijevanje temeljnih procesa periprotetske osteolize razvilo je naporima za razvoj materijala koji omogućuju manje stvaranje *debrisa* i koji su manje bioreaktivni. Razvijane su alternativne nosive površine (metal na metal, keramika na keramiku, visokokrižno vezani polietilen, križno vezani polietilen itd.) i materijali u kontaktu s kosti, ovojnice i završni slojevi proteza, unaprijedene su tehnike cementiranja te uvedene bescementne endoproteze. Pojedine inovacije možda nisu ispunile početna očekivanja (npr. one kod kojih su upotrebljavani titan, kobalt i krom te keramika), ali općenito govoreći, smatra se da su razvoj ovojnice i završnog sloja, kao i primjena visokokrižno vezanog polietilena uvelike postigli željene ciljeve, iako neki od njih još nisu evaluirani u dugotrajnoj primjeni.<sup>7–16</sup> Drugi smjer u istraživanju mogućnosti kontrole periprotetske osteolize i nestabilnosti endoproteze potaknut otkrićima temeljnih molekularnih procesa jest onaj usmjeren prema potencijalnoj terapiji lijekovima. S tim u vezi postoji nekoliko potencijalno zanimljivih ciljeva i mogućnosti.<sup>17</sup> Blokada TNF-α rekombinantnim humanim topljivim receptorom za TNF-α pokazala je zanimljiva svojstva *in vitro* i u animalnim modelima, no skromni rezultati ranih kliničkih studija, visoki troškovi (etanercept je, baš kao i monoklonska protutijela protiv TNF-α infliksimab i adalimumab, još uvijek vrlo skup) i potencijalno vrlo štetni neželjeni učinci ne čine ovu mogućnost posebno obećavajućom, barem za sada. Imajući u vidu ulogu PGE2 u periprotetskoj osteolizi, nesteroidni su antireumatici (NSAR) predloženi kao potencijalno korisni.<sup>7</sup> Međutim rezultati *in vitro* i u životinjskim modelima zasad su skromni.<sup>17</sup> Štoviše, NSAR mogu potencirati resorpciju kosti te se rabe u liječenju heterotopične osifikacije nakon endoproteze ili traume.<sup>18</sup> Bifosfonati su uobičajena terapija u prevenciji resorpcije kosti u postmenopauzi i u liječenju metastatskih kancerogenih lezija te su bili prirodan odabir za istraživanje i kada je riječ o periprotetskoj osteolizi. Podaci ispitivanja na životinjama sa sistemski ili lokalno (implantati presvučeni bifosfonatom) primjenjivanim lijekovima pokazali su prilično jasne učinke na koštano remodeliranje, gustoću koštanih minerala, osteointegraciju implantata te, stoga, i potencijalno preventivne učinke na osteolizu uzrokovanu endoprotezom. Međutim kliničke studije u toj indikaciji nisu dale uvjerljive rezultate, iako se čini da su bi-

fosfonati povoljni glede očuvanja koštane mase.<sup>17</sup> U ispitivanjima na životinjama protutijela na RANK ili RANKL i primjena OPG-a dali su obećavajuće rezultate u suzbijanju/prevenaciji osteolitičkih procesa. Humano monoklonsko protu-RANKL-protutijelo denosumab nedavno je u Europskoj Uniji odobreno za liječenje osteoporozе u menopauzi (<http://www.ema.europa.eu/humandocs/Humans/EPAR/prolia/prolia.htm>). Denosumab i OPG davani su i nekolicini bolesnika s izraženom metastatskom bolesti kostiju, kao i mladima s Pagetovom bolesti, te su poboljšali gustoću kostiju. Ipak, njihovu potencijalnu ulogu i korist u prevenciji/liječenju osteolize i aseptičke nestabilnosti nakon ugradnje endoproteze zgloba kuka tek valja procijeniti.<sup>17</sup> Konačno, nekoliko čimbenika rasta, uključujući TGF- $\beta$ , čimbenik rasta fibroblasta 2 (FGF-2) i koštani morfogenetski proteini (BMP) u obliku omotača implantata, pokazali su u životinjskim modelima poboljšanu osteointegraciju implantata, ali i njih tek treba ocijeniti u vezi s aseptičkom nestabilnosti nakon ugradnje totalne endoproteze kuka.<sup>17</sup> Stoga, iako su mogućnosti za farmakološko liječenje privlačne i izazovne, trenutačno (a kako izgleda i još neko vrijeme u budućnosti), »upravljanje« periprotetskom osteolizom primarno je vezano uz identifikaciju i izbjegavanje čimbenika koji povećavaju rizik od njezina nastanka.

Danas je na tržištu dostupno 150–200 različitih modela endoproteza kuka.<sup>19</sup> Brojne studije evaluirale su i usporedivale rizik od periprotetske osteolize i/ili aseptičke nestabilnosti povezane s različitim tipovima/materijalima.<sup>8,16,20–26</sup> a analiza njihovih rezultata izvan je okvira ovog teksta. Općenito, većina modernih implantata zadovoljava kriterij stope preživljenja  $\geq 90\%$  10 godina nakon operacije,<sup>27</sup> ali neki su povezani s povećanim rizikom od aseptičke nestabilnosti u usporedbi s drugima. Nedavna je analiza<sup>20</sup> došla do zanimljivog zaključka da je pojava aseptičke nestabilnosti manje vjerojatna kod skupljih implantata. Međutim valja istaknuti da se periprotetska osteoliza i aseptička nestabilnost mogu pojaviti kod bilo kojeg tipa implantata/bilo kojeg materijala, u bilo koje vrijeme nakon implantacije. Niz istraživanja bavio se i drugim mogućim čimbenicima rizika od nastanka periprotetske osteolize/aseptičke nestabilnosti, međutim nezavisna povezanost pokazana je samo za nekoliko. Nekoliko je studija upozorilo na povećani rizik kada je endoproteza ugrađena zbog prijeloma vrata bedrene kosti ili razvojne displazije kuka (*developmental dysplasia of the hip*, DDH) u odnosu prema primarnom osteoartritisu kao temeljnoj patologiji,<sup>20,28</sup> no taj se doprinos riziku pokazao bitno manje važnim od tipa proteze (npr. cementne vs. bescementne).<sup>29</sup> Mlada životna dob (u različitim studijama rabljene su različite definicije, npr. <55 godina, <46 godina ili <40 godina) sigurno je združena s većim rizikom od aseptičke nestabilnosti,<sup>20,28–30</sup> a čini se da postoji i interakcija između tipa proteze i dobi – neki su implantati bolji od drugih za mlade, dok su neki drugi implantati povoljniji za starije osobe.<sup>20,22,23,28–30</sup> U nekim,<sup>31</sup> ali ne svim<sup>20</sup> studijama, muški je spol identificiran kao čimbenik rizika, dok je izražena pretilost, čini se, čimbenik rizika od aseptičke nestabilnosti u slučajevima kada se endoproteza ugrađuje zbog frakture vrata bedrene kosti,<sup>32</sup> ali ne i u slučajevima gdje je temeljna bolest primarni osteoartritis.<sup>33</sup> Drugi čimbenici za koje je pokazano da mogu pridonijeti riziku od nastanka ove komplikacije uključuju iskustvo operatera (rizik je veći kad je operater manje iskusna),<sup>20,34</sup> duljinu operacije<sup>35</sup> pa čak i kirurški pristup.<sup>36</sup> Svaki od ovih čimbenika pokazuje i određenu interakciju s tipom proteze, tj. njihov pojedinačni doprinos riziku nije jednak za različite vrste implantata. Međutim nijedan od tih čimbenika »nevezanih za tip prote-

ze« nije kritično važan za nastanak i vrijeme nastanka periprotetske osteolize/aseptičke nestabilnosti. U nedavnoj detaljnoj analizi 4750 bolesnika s endoprotezom<sup>20</sup> uzet je u obzir niz potencijalnih čimbenika rizika (tipovi proteze i materijali, demografska svojstva, morbiditet i komorbiditet, kirurška vještina). U slučaju nestabilnosti čašice najveći pojedinačni nezavisni doprinos riziku bio je onaj tipa endoproteze [prilagođeni omjer rizika (*hazard ratio*, HR) za cementne polietilenske u odnosu prema pritisnom spoju, keramici ili metalnoj podlozi=2,68 (95% granice pouzdanosti, CI=1,48 do 4,83)]. Drugi najveći pojedinačni nezavisni doprinos riziku bio je onaj temeljne patologije [HR za posljedice prirodnih ili pedijatrijskih bolesti kuka u odnosu prema primarnom osteoartritisu=2,32 (95% CI 1,49 do 3,62), a HR za prijelom vrata bedrene kosti u odnosu prema primarnom osteoartritisu = 1,98 (95% CI 1,24 do 3,17)]. Jedini preostali značajni nezavisni doprinos riziku bio je onaj mlađe životne dobi [HR za dob <40 godina u odnosu prema 40–69 godina=2,02 (95% CI 1,21 do 3,38)]. Rezultati su bili slični i u pogledu nestabilnosti ležišta endoproteze u bedrenoj kosti.<sup>20</sup> Ovi nalazi ponovno usmjeravaju pozornost na svojstva implantata kao kritične čimbenike rizika (posebno imajući u vidu pojedinačnog bolesnika određene dobi i s određenom temeljnom bolesti).

S obzirom na to da se količina/koncentracija oslobođenih čestica smatra kritičnim čimbenikom u započinjanju procesa koji dovodi do osteolize, manje trošenje materijala željena je karakteristika.<sup>7,9–15</sup> Međutim povezanost trošenja materijala i osteolize nije »savršena«. U seriji od 142 endoproteze Vervest i suradnici<sup>21</sup> nisu pronašli združenosť između stope trošenja i pojave osteolize. Drugim riječima, osteoliza/nestabilnost može se javiti i uz malo *debrisa*, dok endoproteza može biti savršeno stabilna i uz obilan *debris*. To je pomalo zbunjujuća situacija. S jedne strane, svojstva implantata presudna su u određivanju rizika od periprotetske osteolize/aseptičke nestabilnosti, ali je jasno da postoji varijabilnost u reakcijama bolesnika, što opet upućuje na ulogu drugih čimbenika. S druge strane, »klasični« čimbenici vezani uz bolesnike (demografski, morbiditetni) ne čine se pretjerano relevantnima unatoč svojoj »statistički značajnoj« povezanosti s ishodom u nekim studijama. U seriji od 82 endoproteze (sve istog tipa) koje je ugradio isti iskusni kirurg te koje su potom praćene 5–18 godina, pronašli smo da su demografski, morbiditetni i biomehanički čimbenici objasnili ukupno samo oko 17% (tj. manji udio) varijabilnosti u pojavi aseptičke nestabilnosti (»najbolji« model odabran prema kriteriju najvećeg R<sup>2</sup>).<sup>37</sup> Ukupno uzevši, ova su opažanja sukladna sa zaključkom da bi pojava periprotetske osteolize/aseptičke nestabilnosti mogla biti uvelike određena »individualnom sklonošću« koja, pak, nije posljedica demografskih i/ili morbiditetnih čimbenika.<sup>9</sup>

#### Uloga genetike i proteomike u određivanju individualne sklonosti aseptičkoj nestabilnosti nakon ugradnje totalne endoproteze zgloba kuka

Koncept »individualne sklonosti« periprotetskoj osteolizi/nestabilnosti iznikao je iz opažanja da pojedini bolesnici s »neuspješnim« protezama imaju pojačan specifični imunosni odgovor na metalne i/ili polietilenske čestice oslobođene iz implantata [za detaljan pregled vidi Jacobs i sur.<sup>9</sup>] te je predložena uloga genetski određenih individualnih karakteristika. Međutim rano je prepoznato da specifični imunitet nije vjerojatan ključni element procesa.<sup>9</sup> Razvoj i primjena novih metoda proteomike (proučavanje strukture i

funkcije proteina) pridonijeli su boljem razumijevanju prirode molekularnih mehanizama osteolize. Primjenjujući metodologiju reverzne transkriptaze-polimerazne lančane reakcije u stvarnom vremenu (*real time polymerase chain reaction, RT-PCR*) u analizi periprotetskog mekog tkiva bolesnika s osteolizom, Kolouvaris i sur.<sup>38</sup> pronašli su povećano lučenje markera alternativne aktivacije makrofaga (neovinske o limfocitima) (CHIT1, CCL18), kemokina (IL-8, MIP 1 alfa) i diferencijacije osteoklasta (katapsin K, TRAP, DC-STAMP) te smanjeno lučenje molekula koje sudjeluju u osteogenezi (BMP-4, FGF-18) i OPG (s promijenjenim omjerom RANKL: OPG). Kao što je nedavno sistematski prikazao Purdue<sup>39</sup> primjena proteomskih tehnika i tehnika genetičkog profiliranja omogućila je bolje razumijevanje procesa alternativne aktivacije makrofaga i njegove važnosti u periprotetskoj osteolizi. Istodobno, tijekom posljednjih nekoliko godina objavljen je veći broj istraživanja u kojima se pokušala prepoznati »genetska pozadina individualne sklonosti« aseptičkoj nestabilnosti endoproteze. Sva su slijedila istu logiku i dijele određene zajedničke karakteristike: istraživanja je povezanost određenih genskih markera, tj. genotipova i rizika od aseptičke nestabilnosti endoproteze, počevši s genima koji kodiraju za molekule uključene u osteolitički proces i koji pokazuju polimorfizme pojedinačnih nukleotida (*single nucleotide polymorphisms* SNP). Wilkinson i sur.<sup>40</sup> prvi su 2003. godine izvjestili o združenosti SNP-a i rizika od aseptičke nestabilnosti endoproteze. Analizirani su SNP u promotorskoj regiji gena za TNF- $\alpha$  u kojoj se nalaze dva polimorfna mjesta, -238 i -308, koja karakteriziraju tranzicije gvanina u adenin (G $\rightarrow$ A). Prisutnost manje čestog A-alela na tim mjestima združena je s povišenom koncentracijom cirkulirajućeg TNF- $\alpha$  i s povećanim rizikom od raznih upalnih bolesti. S obzirom na uključenost TNF- $\alpha$  u osteolitički proces, taj je gen dobar kandidat za istraživanje.<sup>40</sup> U provedenoj su studiji sve čašice bile besceimentne s polietilenskom nosećom površinom (85% ih je bilo tipa Charnley). Ukupno je genotipizirano 214 bolesnika koji su doživjeli aseptičku nestabilnost endoproteze i 267 bolesnika s još uvijek stabilnim protezama te 500 zdravih osoba bez endoproteze. Analizirana je prevalencija A-alela te njegova združenost s nestabilnosti endoproteze iskazana kao omjer šanse (*odds ratio*, OR). Uzimajući u obzir dob (<55 godina ili stariji), vrijeme proteklo od operacije (do 12 ili više od 12 godina), indeks tjelesne mase i količinu polietilenskog *debrisa*, šansa za nestabilnost endoproteze bila je veća u osoba s A-alelom na lokusu -238 (genotip AA ili GA u odnosu prema GG): OR=1,8 (95% CI 1,0 do 3,2). Povezanost je bila i čvršća u bolesnika u kojih su bili nestabilni i čašica i ležište: OR=2,3 (95% CI 1,1 do 4,5). Nije nađena povezanost genotipova na lokusu -308 i aseptičke nestabilnosti. Funkcionalna veza između genotipa i događaja ostala je nerazjašnjena – a to je odlika i svih ostalih sličnih istraživanja. Opažene združenosti nisu posebno čvrste (omjeri šansi oko 1,8 i 2,0) pa je zaključeno<sup>40</sup> da genska pozadina aseptičke nestabilnosti vjerojatno uključuje niz »malih doprinosa« različitih gena. S obzirom na biološku složenost aseptičke osteolize, to je vjerojatno točno. No, opažena »slaba združenost« možda odražava i relativnu (ne)važnost TNF- $\alpha$  u osteolitičkom procesu: o njegovoj ulozi postoje oprečni nalazi,<sup>9-13</sup> a i strategija antagoniziranja TNF- $\alpha$  etanerceptom u smislu prevencije osteolize pokazala se neuspješnom.

Sličnim pristupom (analizirajući prevalenciju genotipova/alela), Malik i sur.<sup>41</sup> proveli su 2006. g. *case-control* studiju (slučajevi=bolesnici s aseptičkom nestabilnosti endo-

proteze, n=91; kontrole= bolesnici sa stabilnim protezama, n=150) kako bi ispitali združenost nestabilnosti i određenih SNP-a u genima za RANK i OPG. Svi ispitanici imali su cementna monoblok Charnleyeva ležišta i polietilenske acetabularne čašice. Analizirani su ovi polimorfizmi: tranzicija A $\rightarrow$ G na poziciji -163 u OPG-promotoru (OPG -163), tranzicija timin (T) $\rightarrow$ G na poziciji -245 u OPG-promotoru (OPG -245) i tranzicija citozin (C) $\rightarrow$ G na poziciji 575 u eksonu 6 RANK-gena (RANK +575). Za te je SNP prethodno nađena povezanost s funkcijom sustava RANK/OPG. Uočena je združenost aseptičke nestabilnosti i prisutnosti A-alela na OPG -163 (OR 3,76, 95% CI 2,31 do 6,11) te aseptičke nestabilnosti i prisutnosti T-alela na RANK+575 (OR 1,77, 95% CI 1,20 do 2,59). Valja međutim uočiti da se radi o jednosmjernim združenostima, tj. u analizi nisu uzeti u obzir istodobno određivani genotipovi, odnosno drugi »ne-genetski« čimbenici (npr., dob, spol, tjelesna masa, temeljna bolest i sl.) pa je moguće i da procjena nije nepristrana. Rabeći istu skupinu ispitanika i isti »matematički pristup« (određivanje jednosmjerne združenosti na temelju OR), isti su autori ispitali i neke druge SNP. Naravno da u interpretaciji i tih daljnjih rezultata vrijede ista ograničenja. Nađena je združenost između aseptičke nestabilnosti i prisutnosti C-alela na poziciji -550 u promotorskoj regiji gena za MBL (lektin koji veže manozu). MBL je serumski protein akutne faze, a za navedeni SNP pretpostavlja se povezanost s razinom cirkulirajućeg proteina) (OR 2,23, 95% CI 1,42 do 3,50), odnosno prisutnosti G-alela u kodonu 54 istoga gena (za taj se SNP pretpostavlja povezanost s određenim strukturnim promjenama proteina) (OR 2,17, 95% CI 1,18 do 3,98).<sup>42</sup> Također,<sup>43</sup> nađena je združenost aseptičke nestabilnosti i SNP-a u jednom od sedam polimorfnih lokusa u promotorskoj regiji jedne metaloproteinaze (MMP1) (OR 3,27, 95% CI 2,21 do 4,83), ali ne i nekoliko drugih (MMP2, MMP4). Važnost te združenosti nije jasna budući da na transkripciju *MMP1* utječe više od jednoga polimorfno mjesta.<sup>44</sup> U istom istraživanju<sup>43</sup> nije nađena združenost aseptičke nestabilnosti i SNP-a u genu za receptor za vitamin D, odnosno aseptičke nestabilnosti i prisutnosti rjeđeg C-alela na poziciji -174 u promotorskoj regiji gena za IL-6. To, naravno, ne isključuje mogućnost da su neki SNP u genu za IL-6 povezani s osteolizom – promotorska regija u genu za IL-6 ima barem četiri polimorfna mjesta, a kontrola ekspresije *IL-6* posljedica je njihove kompleksne interakcije.<sup>45</sup>

Nedavno,<sup>46</sup> a rabeći istu metodologiju kao i u svom istraživanju iz 2003. g.,<sup>40</sup> Wilkinson i suradnici ispitali su združenost aseptičke nestabilnosti i SNP-a u genu nazvanom *FRZB* koji kodira protein sFRP3 (od *secreted frizzled-related protein 3*), važan u regulaciji funkcije hondrocita. Dva SNP-a u *FRZB*-genu, koja rezultiraju njegovom strukturnom promjenom [tranzicija C $\rightarrow$ T u eksonu 4 rezultira zamjenom arginina triptofanom (Arg200Trp), a $\rightarrow$ tranzicija C $\rightarrow$ G u eksonu 6 rezultira zamjenom arginina glicinom (Arg324Gly)] povezana su s nastankom osteoartritisa.<sup>47</sup> Svi analizirani ispitanici bolovali su od primarnog osteoartritisa, a imali su cementne endoproteze s polietilen-metalnim čašicama (80% tipa Charnley). Uzimajući u obzir dob, spol, vrijeme proteklo od ugradnje endoproteze i stupanj istrošenosti polietilena, prisutnost manje čestog Trp-alela na poziciji 200 (*FRZB* 200Trp) bila je združena s manjom učestalosti nestabilnosti endoproteze (OR 0,62, 95% CI 0,38 do 0,99). Također, učestalost nestabilnosti bila je najveća među nositeljima najčešćeg haplotipa (*FRZB* 200Arg; 324Arg) (OR 1,50, 95% CI 1,09 do 2,07). Prije nekoliko godina<sup>48</sup> izvjestili smo o rezultatima genotipizacija u skupi-

ni bolesnika s endoprotezama iz prethodno opisane serije.<sup>37</sup> U odnosu prema drugim ovdje prikazanim studijama naša je malena studija bila (41 bolesnik, 45 proteza), ali je imala neka svojstva koja se mogu smatrati povoljnima. Prvo, u analizi smo u obzir uzeli relevantne čimbenike [dob, spol, temeljnu bolest i sve ostale SNP koji su određeni pored onog analiziranog (G→A na poziciji -597 i G→C na poziciji -572 u promotoru *IL-6*; G→A na poziciji -308 u  $\alpha$ promotoru *TNF- $\alpha$*  i T→C na poziciji 29 u signalnoj sekvenciji *TGF- $\beta$* )], dok je utjecaj implantata i kirurške vještine kontroliran činjenicom da su sve endoproteze bile istog tipa i da ih je sve ugradio isti, iskusni kirurg. Dugo, za razliku od opisanih *case-control* studija temeljenih na analizi prevalencije pojedinog alela, genotipa ili haplotipa i određivanja omjera šanse, mi smo analizirali »vrijeme do događaja« (*time-to-event* ili *survival* analiza) gdje je događaj aseptička nestabilnost, rabeći Coxovu regresijsku analizu tipičnu za studije preživljenja endoproteze. Iako oba tipa analize mogu upozoriti na združenosti, konceptijski su ona vrlo različita. U analizi prevalencije koja rezultira omjerom šanse (OR), zavisna je varijabla binarna – događaj se desio ili nije. U analizi »vremena do događaja« zavisna je varijabla vrijeme, kontinuirana varijabla vrlo nepravilne («iskrivljene») distribucije, gdje je dio informacija cenzuriran (za neke ispitanike vrijeme praćenja traje od operacije do aseptičke nestabilnosti, a za druge aseptička nestabilnost ne nastupi tijekom čitavog vremena praćenja, već ono prestaje zbog drugih razloga – tzv. cenzurirano vrijeme). Čak i kad se »vrijeme« (od operacije) uzme u obzir u analizi binarne zavisne varijable (npr. u logističkoj regresiji), zanemaruje se cenzurirana priroda dijela informacija. To može rezultirati iskrivljenim procjenama. Primjerice, u prvoj studiji Wilkinzona i suradnika<sup>40</sup> analiza se temeljila na logističkoj regresiji ishoda »nestabilnost da ili ne«, a OR za aseptičku nestabilnost u nositelja *A*-alela na poziciji -238 u promotorskoj regiji *TNF- $\alpha$*  iznosio je 1,8 (1,0 do 3,2). U dodatnoj analizi autori su proučili vrijeme do događaja, a prikazani omjer hazarda (HR) iznosio je 1,5 (bez granica pouzdanosti). Pretpostavi li se da je 95% CI oko ove procjene jednake širine kao onaj oko OR, onda analiza vremena do događaja ne bi bila statistički značajna (jer bi donja granica CI pala ispod 1). Pitanje je, naravno, koji je od dva zaključka u suglasju sa stvarnošću – združenost postoji ili združenost ne postoji. Naše je mišljenje da činjenica da blokada *TNF- $\alpha$*  nema posebnog utjecaja na prevenciju osteolize govori u prilog zaključku »združenost ne postoji«, no poenta leži u činjenici da je priroda fenomena koji se proučava takva da on mora biti analiziran po principu »vrijeme do događaja«, tj. uporabom analize preživljenja, upravo kako je i praksa u evaluaciji utjecaja implantata, demografskih ili drugih čimbenika. Naime, glavno pitanje nije hoće li ili neće nastupiti aseptička nestabilnost, već KADA će nakon ugradnje ona nastupiti. Statističkim rječnikom rečeno, u slučaju nestabilnosti endoproteze bitna je stopa incidencije, odnosno hazarda (rizika), tj. broj novih događaja/broj ljudi izloženih riziku po jedinici vremena, a ne kumulativna incidencija (proporcija) unutar određenog vremena. Bilo bi upravo suprotno kada bi se pitanje definiralo kao »koliko se slučajeva aseptičke nestabilnosti javlja unutar određenog vremena«. Stoga je omjer hazarda (HR) informativniji od omjera šanse (OR), budući da uzima u obzir i vrijeme. Opazili smo nezavisnu združenost između pojave nestabilnosti i TT-genotipa na poziciji 29 u signalnoj sekvenciji *TGF- $\beta$*  [HR u odnosu prema prisutnosti *C*-alela=5,7 (95% CI 1,4 do 23,4)].<sup>48</sup> Istodobno, kombinacija genotipova GA/CC na pozicijama -597

i -572 u promotorskoj regiji *IL-6* bila je nezavisno združena s većim rizikom od nestabilnosti [HR u odnosu prema svim ostalim kombinacijama=4,9 (95% CI 1,7 do 23,1)]. Unatoč ograničenjima zbog malenog uzorka (na što upućuju i široke granice pouzdanosti), smatramo da ova opažanja upozoravaju na ulogu navedenih SNP-a u nastanku aseptičke nestabilnosti endoproteza kuka.

Očito je da su nastojanja da se identificiraju genski markeri »individualne sklonosti« periprostetskoj osteolizi/aseptičkoj nestabilnosti nakon ugradnje endoproteze zgloba kuka u vrlo ranoj fazi. Teško je predvidjeti hoće li ona ili neće rezultirati klinički važnim nalazima koji bi pak za posljedicu imali rutinski probir bolesnika s ciljem smanjenja rizika od nestabilnosti endoproteze. Teorijski, potencijalna je korist takve strategije velika i najbolje se može ocrtati usporedbom s farmakogenetičkim probirom – fenotipizacijom (npr. identifikacija »brzih« i »sporih« acetilatora) i genotipizacijom (npr. identifikacija SNP-a u genima koji kodiraju za citokrom enzime P-450) bolesnika postale su rutinski postupci u nastojanjima da se optimizira uporaba nekih lijekova. Međutim imajući na umu razlike u materijalima i dizajnu između raznih implantata (i druge moguće važne utjecaje), situacija s endoprotezama vrlo je vjerojatno složenija nego s lijekovima. Buduća nastojanja trebala bi imati i »mehanicističke« i epidemiološke ciljeve kako bi se identificirali najbolji genski markeri ili najbolje skupine markera, koje pak mogu biti različite za različite kombinacije implantata, bolesti i drugih čimbenika. Suvremene metode u proteomici omogućuju visokokapacitetne i osjetljive analize molekula u periprostetskoj osteolitičkoj zoni i trebale bi pridonijeti boljem razumijevanju njihove strukture i funkcije, ali i uputiti nas u moguće funkcionalne veze između proteina i njihovih gena. Epidemiološke bi studije, s druge strane, trebale podastrijeti dokaze o konzistentnim i čvrstim združenostima.

#### LITERATURA

1. Montin L, Leino-Kilpi H, Suominen T, Lepisto J. A systematic review of empirical studies between 1966 and 2005 of patient outcomes of total hip arthroplasty and related factors. *J Clin Nurs* 2008;17:40–5.
2. Ethgen O, Bruyere O, Richy F, Dardennes C, Reginster JY. Health-related quality of life in total hip and total knee arthroplasty. *J Bone Joint Surg Am* 2004;86-A:963–74.
3. Callaghan JJ, Albright JC, Goetz DD, Olejniczak JP, Johnston RC. Charnley total hip arthroplasty with cement. Minimum twenty-five year follow-up. *J Bone Joint Surg Am* 2000;82-A:487–97.
4. Berry DJ, Harmsen SW, Cabanela ME, Morrey BF. Twenty-five-year survivorship of two thousand consecutive primary Charnley total hip replacements. *J Bone Joint Surg Am* 2002;84-A:171–7.
5. Older J. Charnley low-friction arthroplasty. A worldwide retrospective review at 15 to 20 years. *J Arthroplasty* 2002;17:675–80.
6. Keener JD, Callaghan JJ, Goetz DD, Pederson DR, Sullivan PM, Johnston RC. Twenty-five-year results after Charnley total hip arthroplasty in patients less than fifty years old: a concise follow-up of a previous report. *J Bone Joint Surg* 2003;85-A:1066–72.
7. Harris WH. Conquest of a worldwide human disease. Particle-induced periprosthetic osteolysis. *Clin Orthop Relat Res* 2004;429:39–42.
8. Learmonth ID, Young C, Rorabeck C. The operation of the century: total hip replacement. *Lancet* 2007;370:1508–19.
9. Jacobs JJ, Roebuck KA, Archibeck M, Hallab NJ, Glant TT. Osteolysis: basic science. *Clin Orthop Relat Res* 2001;393:71–7.
10. Purdue EP, Koulouvaris P, Potter HG, Nestor BJ, Sulco TP. The cellular and molecular biology of periprosthetic osteolysis. *Clin Orthop Relat Res* 2007;454:251–61.
11. Abu-Amer Y, Darwch I, Chohisy JC. Aseptic loosening of total joint replacements: mechanisms underlying osteolysis and potential therapies. *Arthritis Res Ther* 2007;9(suppl1):S6 doi:10.1186/ar2170.
12. Drees P, Eckardt A, Gay RE, Gay S, Huber LC. Mechanisms of disease: molecular insights into aseptic loosening of orthopedic implants. *Nat Clin Pract Rheumatol* 2007;3:165–71.
13. Holt G, Murnaghan C, Reilly J, Meek RM. The biology of aseptic osteolysis. *Clin Orthop Relat Res* 2007;460:240–52.

14. Harris WH, Muratoglu OK. A review of current cross-linked polyethylenes used in total joint arthroplasty. *Clin Orthop Relat Res* 2005;430:46–52.
15. Lappalainen R, Santavirta SS. Potential of coatings in total hip replacement. *Clin Orthop Relat Res* 2005;430:72–9.
16. Della Valle AG, Zoppi A, Peterson MGE, Salvati EA. A rough surface finish adversely affects the survivorship of a cemented femoral stem. *Clin Orthop Relat Res* 2005;436:158–63.
17. Taimo CT, Shanbhag AS, Rubash HE. Nonsurgical management of osteolysis. *Clin Orthop Relat Res* 2006;452:254–64.
18. Voulteenahto K, Moilanen T, Moilanen E. Non-steroidal anti-inflammatory drugs, cyclooxygenase-2 and bone healing process. *Basic Clin Pharmacol Toxicol* 2007;102:10–14.
19. Utting MR, Lankester BJA, Spencer RF. Total hip replacement and NICE. *Br Med J* 2005;330:318–19.
20. Bordini B, Stea S, De Clerico M, Strazzari S, Sasdelli A, Toni A. Factors affecting aseptic loosening of 4750 total hip arthroplasties: multivariate survival analysis. *BMC Musculoskel Dis* 2007;8:69.
21. Vervest TMJS, Anderson PG, van Hout F, Wapstra FH, Louwse RT, Koetsier WA. Ten to twelve-year results with the Zweymuller cementless total hip prosthesis. *J Arthroplasty* 2005;20:362–8.
22. Eskelinen A, Remes V, Helenius I, Pulkkinen P, Nevalainen J, Paavolainen P. Total hip arthroplasty for primary osteoarthritis in younger patients in the Finnish arthroplasty register. 4661 primary replacements followed for 0–22 years. *Acta Orthop* 2005;76:28–41.
23. Eskelinen A, Remes V, Helenius I, Pulkkinen P, Nevalainen J, Paavolainen P. Uncemented total hip arthroplasty for primary osteoarthritis in young patients: a mid- to longterm follow-up study from the Finnish Arthroplasty Register. *Acta Orthop* 2006;77:1:57–70.
24. Havelin LI, Engesaeter LB, Espehaug B, Furnes O, Lie SA, Vollset SE. The Norwegian arthroplasty register. 11 years and 73000 arthroplasties. *Acta Orthop Scand* 2000;71:337–53.
25. Morshed S, Bozic KJ, Ries MD, Malchau H, Colford JM Jr. Comparison of cemented and uncemented fixation in total hip replacement. *Acta Orthop* 2007;78:315–26.
26. Havelin LI, Spehaug B, Engesaeter LB. The performance of two hydroxyapatite-coated acetabular cups compared with Charnley cups. *J Bone Joint Surg Br* 2002;84-B:839–45.
27. Yamada H, Yoshihara Y, Henmi O i sur. Cementless total hip replacement: past, present and future. *J Orthop Sci* 2009;14:228–41.
28. Furnes O, Lie SA, Espehaug B, Vollset SE, Engesaeter LB, Havelin LI. Hip disease and the prognosis of total hip replacements: a review of 53698 primary total hip replacements reported to the Norwegian Arthroplasty Register 1987–1999. *J Bone Joint Surg Br* 2001;83:579–86.
29. Engesaeter LB, Furnes O, Havelin LI. Developmental dysplasia of the hip – good results of later total hip arthroplasty. *J Arthroplasty* 2008;23:235–240.
30. Havelin LI, Vollset SE, Engesaeter LB. Revision for aseptic loosening of uncemented cups in 4,352 primary total hip prostheses: a report from the Norwegian Arthroplasty Register. *Acta Orthop Scand* 1995;66:494–500.
31. Malchau H, Herberts P, Ahnfelt L. Prognosis of total hip replacements in Sweden: follow-up of 92675 operations performed 1978–1990. *Acta Orthop Scand* 1993;64:497–506.
32. Mabry TM, Prpa B, Haidukewych GJ, Harmsen WS, Berry DJ. Long-term results of total hip arthroplasty for femoral neck fracture non-union. *J Bone Joint Surg Am* 2004;86-A:2263–67.
33. Haverkamp D, de Man HR, de Jong PT, van Stralen RA, Marti RK. Is long-term outcome of cemented THA jeopardized by patients being overweight? *Clin Orthop Relat Res* 2008;466:1162–68.
34. Losina E, Barrett J, Mahomed NN, Baron JA, Katz JN. Early failure of total hip replacement: effect of surgeon volume. *Arthritis Rheum* 2004;50:1338–43.
35. Smabrekke A, Espehaug B, Havelin LI, Furnes O. Operating time and survival of primary total hip replacements: an analysis of 34745 primary cemented and uncemented total hip replacements from local hospitals reported to the Norwegian Arthroplasty Register 1987–2001. *Acta Orthop Scand* 2004;75:524–32.
36. Arthursson AJ, Furnes O, Espehaug B, Havelin LI, Soreide JA. Prosthesis survival after total hip arthroplasty – does surgical approach matter? *Acta Orthop* 2007;78:719–29.
37. Kolundžić R, Sulentić M, Smerdelj M, Orlić D, Trkulja V. Stability of Endler cementless polyethylene acetabular cup: long-term follow-up. *Croat Med J* 2005;46:261–7.
38. Koulouvaris P, Ly K, Ivashkiv LB i sur. Expression profiling reveals alternative macrophage activation and impaired osteogenesis in periprosthetic osteolysis. *J Orthop Res* 2008;26:106–16.
39. Purdue PE. Alternative macrophage activation in periprosthetic osteolysis. *Autoimmunity* 2008;41:212–7.
40. Wilkinson JM, Wilson AG, Stockley I i sur. Variation in the TNF gene promoter and risk of osteolysis after total hip arthroplasty. *J Bone Min Res* 2003;18:1995–2001.
41. Malik MHA, Bayat A, Jury F, Ollier WER, Kay PR. Genetic susceptibility to hip arthroplasty failure – association with the RANK/OPG pathway. *Int Orthop* 2006;30:177–81.
42. Malik MH, Bayat A, Jury F, Kay PR, Ollier WE. Genetic susceptibility to total hip arthroplasty failure – positive association with mannose-binding lectin. *J Arthroplasty* 2007;22:265–70.
43. Malik MH, Jury F, Bayat A, Ollier WE, Kay PR. Genetic susceptibility to total hip arthroplasty failure: a preliminary study on the influence of matrix metalloproteinase 1, interleukin 6 polymorphisms and vitamin D receptor. *Ann Rheum Dis* 2007;66:1116–20.
44. Pearce E, Tregouet DA, Samnegard A i sur. Haplotype effect of the matrix metalloproteinase-1 gene on risk of myocardial infarction. *Circ Res* 2005;97:1070–76.
45. Terry CF, Loukaci V, Green FR. Cooperative influence of genetic polymorphisms on interleukin 6 transcriptional regulation. *J Biol Chem* 2000;275:18138–44.
46. Gordon A, Southam L, Loughlin J i sur. Variation in the secreted frizzled-related protein-3 gene and risk of osteolysis and heterotopic ossification after total hip arthroplasty. *J Orthop Res* 2007;25:1665–770.
47. Loughlin J, Dowling B, Chapman K i sur. Functional variants within the secreted frizzled-related protein 3 gene are associated with hip osteoarthritis in females. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004;101:9757–62.
48. Kolundžić R, Orlić D, Trkulja V, Pavelić K, Gall-Trošelj K. Single nucleotide polymorphisms in the interleukin-6 gene promoter, tumor necrosis factor- $\alpha$  promoter, and transforming growth factor  $\beta$ 1 gene signal sequence as predictors of time to onset of aseptic loosening after total hip arthroplasty: preliminary study. *J Orthop Sci* 2006;11:592–600.

## OBAVIJEST

**SNIŽENJE CIJENE KNJIGE »LIJEČNICI U TREĆOJ DOBI«**

Obavještavamo sve zainteresirane kolegice i kolege, koji još nisu nabavili knjigu »Liječnici u trećoj dobi« da preostale primjerke te knjige mogu dobiti kod gospođe Draženke Kontek u HLZ-u (tel. 469-3300) uz cijenu od 50,00 kuna!