

# PENGARUH PEMBERIAN KONTRAS MEDIA NON IONIK LOW OSMOLAR INTRA VENA TERHADAP KADAR CYSTATIN-C SERUM

*by* Soetojo Soetojo

---

**Submission date:** 07-Aug-2019 01:56PM (UTC+0800)

**Submission ID:** 1158284167

**File name:** LOW\_OSMOLAR\_INTRA\_VENA\_TERHADAP\_KADAR\_CYSTATIN\_C\_SERUM\_PADA.pdf (111.47K)

**Word count:** 0

**Character count:** 19200

# PENGARUH PEMBERIAN KONTRAS MEDIA NON IONIK *LOW OSMOLAR* INTRA VENA TERHADAP KADAR CYSTATIN-C SERUM PADA *ORYCTALAGUS CUNICULUS*

Ariyo Sakso Bintoro, Soetojo, Doddy M. Soebadi, Endang Retnowati, Widodo JP

## ABSTRACT

**Objective:** To measure effects of low osmolar non ionic contrast media on cystatin-C serum levels on different days after administration. **Material and Method:** Twenty-two *Oryctolagus cuniculus* were divided into two groups of 11 subjects, each subject receiving intravenous injection of low osmolar non ionic contrast or a placebo solution (NaCl 0,9%). Cystatin-C serum levels of each subject were measured before injection, on days 1, 3, 7, and 10. Cystatin-C serum levels were determined with a sandwich ELISA method. Statistical analysis was performed with t-test. **Results:** Mean cystatin-C serum levels before injection was  $0,00337 \pm 0,00101$  mg/L. Means from days 1, 3, 7, and 10 after injections were  $0,00498 \pm 0,00153$  mg/L;  $0,00565 \pm 0,00247$  mg/L;  $0,00468 \pm 0,00157$ , and  $0,00339 \pm 0,00188$  mg/L respectively. **Conclusion:** Increase in serum cystatin-C levels on days 1, 3, and 7 was significant. On the 10<sup>th</sup> day no significant escalation was observed. Compared to the control group, there were significant differences in serum cystatin-C increase on days 1 and 3 in the intervention group, but no significant differences 7 and 10 days after injection.

**Keywords:** Cystatin-C serum, low osmolar non ionic contrast media, *Oryctolagus cuniculus*.

Correspondence: Ariyo Sakso Bintoro, c/o: Departemen/SMF Urologi, FK Universitas Airlangga/RSU Dr. Soetomo. Jl. Prof. Dr. Moestopo 6 – 8 Surabaya 60286.

## PENDAHULUAN

Hampir 70 tahun yang lalu, Osborne dkk yang pertama kali melaporkan pencitraan traktus urinarius dengan menggunakan bahan kontras iodinasi. Dalam 30 tahun terakhir, telah terjadi peningkatan prosedur intervensi diagnostik dengan kontras iodinasi. Pada struktur bahan radiokontras telah dilakukan modifikasi lebih dari beberapa dekade terakhir, menghasilkan persenyawaan yang secara signifikan mempunyai kemosistisitas yang rendah. Struktur tubulus ginjal, ureter, dan kandung kemih, dapat digambarkan secara radiologis dengan pemakaian kontras media. Bahan kontras intravenus sering digunakan secara rutin untuk diagnosis kelainan traktus urinarius. Namun demikian, pemberian kontras dengan bahan kontras terbarupun dapat menyebabkan nefrotoksistas. Nefropati akibat kontras (NAK) dilaporkan sebagai penyebab terbesar ke tiga terjadinya gagal ginjal akut pada pasien rawat inap, 1 – 6% pada populasi pasien yang tidak terseleksi, dan lebih dari 40 – 50% pada populasi pasien berisiko tinggi.<sup>1-4</sup>

Definisi NAK adalah terjadinya penurunan fungsi ginjal yang terjadi dalam 24 – 48 jam, setelah pemberian kontras media tanpa didapatkan penyebab lain dari penurunan fungsi ginjal tersebut. Penurunan fungsi ginjal ditunjukkan dengan peningkatan absolut tingkat kreatinin serum > 0,5 mg/dl, atau peningkatan relatif > 25% diatas normal. Level kreatinin serum umumnya mencapai puncak pada hari ke 3 – 5, setelah pemberian kontras media. Definisi terakhir menyebutkan dengan sedikit peningkatan level kreatinin serum, hal ini lebih sensitif untuk mendiagnosis NAK yang dihubungkan dengan manifestasi klinis, dari reaksi jangka pendek dan jangka panjang.<sup>1,3,5</sup>

Media kontras menyebabkan vasokonstriksi intrarenal yang dimediasi endothelin, vasopresin, kalsium, dan adenosin yang berlanjut dengan menurunnya *renal blood flow* (RBF) sampai terjadi iskemia ginjal. Hipoksia medula ginjal dan toksistas langsung pada sel epitel tubulus ginjal menyebabkan NAK.<sup>5,6</sup>

Indeks global yang terbaik untuk mengetahui fungsi ginjal adalah *glomerular filtration rate* (GFR). Beberapa

metode telah ditemukan oleh para ahli untuk mengukur GFR. Klirens inulin merupakan *gold standard* untuk mengukur fungsi ginjal. Dalam perkembangan lanjut, klirens dari beberapa bahan radioisotop seperti Chromium 51-EDTA atau Technetium 99-DTPA, iohalamate atau iohexol mempunyai akurasi yang mendekati sama dengan klirens inulin, sehingga dapat digunakan sebagai pengganti klirens inulin. Namun demikian, berbagai pemeriksaan tersebut memerlukan waktu dan biaya yang lebih besar serta tidak praktis, sehingga hal ini kurang ideal untuk aplikasi klinis rutin atau penggunaan klinik dalam jumlah yang banyak.<sup>7</sup>

Saat ini *marker* endogen yang paling sering digunakan dalam praktek klinis adalah kreatinin serum, baik sendiri maupun dikombinasikan dengan urine tampung 24 jam untuk menentukan klirens kreatinin. Ada beberapa faktor yang membatasi atau dapat mempengaruhi ketepatan *marker* ini dalam pengukuran GFR, antara lain ketelitian dalam mengukur jumlah urine 24 jam, pengaruh masa tubuh terhadap produksi kreatinin endogen, sekresi dan reabsorpsi kreatinin di tubulus, jenis makanan, umur dan metode pemeriksaan kreatinin. Berdasarkan beberapa kendala tersebut, para ahli terus mengembangkan penelitian untuk mencari *marker* endogen yang lebih akurat dalam mengukur GFR.<sup>7</sup>

Cystatin-C adalah suatu protein non-glikosilasi dengan berat molekul rendah (13,36 kD), yang merupakan derivat dari cystatin superfamili dari cysteine protease inhibitor. Zat ini diproduksi secara stabil oleh semua sel berinti. Tingkat produksi endogen dari cystatin-C adalah konstan dan tidak dipengaruhi oleh proses inflamasi, massa tubuh, reaksi demam, umur, atau jenis kelamin. Cystatin-C difiltrasi secara bebas oleh glomerulus dan secara cepat dimetabolisir (tidak disekresi atau direabsorpsi) di tubulus proksimal. Pemeriksaan cystatin-C tidak memerlukan sampel urine, kadarnya tidak dipengaruhi oleh obat-obatan, atau beberapa metabolit seperti bilirubin dan keton. Hasil pemeriksaan cystatin-C dapat diperoleh dalam waktu yang singkat. Secara keseluruhan, cystatin-C memenuhi banyak kriteria sebagai *marker* endogen GFR yang ideal. Berdasarkan kelebihan inilah para ahli melakukan penelitian, dan sejumlah penelitian terkini menunjukkan bahwa cystatin-C mempunyai kemampuan yang lebih unggul daripada klirens kreatinin dalam mengukur GFR.<sup>8,9</sup>

Berdasarkan beberapa kelebihan di atas, penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh kontras media terhadap kadar cystatin-C serum *Oryctolagus cuniculus*, pada hari ke 1, 3, 7, dan 10, dengan demikian dalam praktek klinis sehari-hari dapat digunakan untuk memprediksi fungsi ginjal dan prognosisnya secara lebih praktis, cepat, dan akurat.

## TUJUAN PENELITIAN

Membuktikan dan membandingkan peningkatan kadar cystatin-C serum pada *Oryctolagus cuniculus*, yang diberikan kontras media non ionik *low osmolar*.

## BAHAN DAN CARA

Penelitian ini adalah penelitian eksperimental laboratoris menggunakan 22 ekor kelinci (*Oryctolagus cuniculus*) berjenis kelamin jantan, berumur 3 bulan, yang dibagi dalam 2 kelompok secara random, dan masing-masing kelompok terdiri dari 11 ekor. Penelitian dilakukan terhadap 2 kelompok penelitian yang dialokasikan secara random, yaitu kelompok perlakuan yang diberi kontras media non ionik *low osmolar* dan kelompok kontrol yang diberi plasebo (NaCl 0,9%).

Kadar cystatin-C diukur pada hari ke 1, 3, 7, dan 10 sebelum dan sesudah perlakuan. Metode yang digunakan untuk mengukur kadar cystatin-C serum adalah sandwich-ELISA/double antibody sandwich-ELISA/direct-sandwich ELISA.

Data hasil penelitian diolah menggunakan aplikasi SPSS, serta dianalisis secara deskriptif maupun analitik. Sebelum dilakukan uji statistik, terlebih dahulu dilakukan uji terhadap normalitas distribusi data, serta homogenitas data untuk menentukan jenis uji parametrik atau non parametrik yang akan digunakan. Uji perbedaan dilakukan untuk mencapai tujuan penelitian. Tingkat kemaknaan yang digunakan adalah 0,05 dengan *power of the test* 80%.

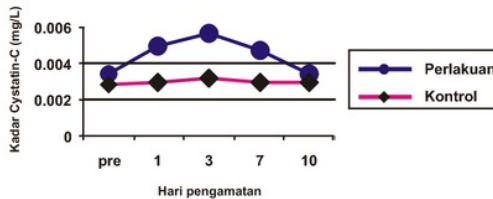
## HASIL PENELITIAN

Selama penelitian, didapatkan kematian kelinci sebanyak 2 ekor (kelompok kontrol 1 ekor pada hari pertama, sedangkan kelompok perlakuan 1 ekor pada hari ke 7 setelah perlakuan), jadi besar sampel yang tersisa sebanyak 20 untuk kedua kelompok.

Data berat badan dan kadar cystatin-C serum *Oryctolagus cuniculus* kelinci coba pre penyuntikan hari ke 1, 3, 7, dan hari ke 10 dalam penelitian ini berdistribusi normal ( $p > 0,05$ ). Oleh karena itu, jenis uji hipotesis yang akan digunakan untuk keperluan analisis adalah uji statistik parametrik, kecuali pada perlakuan hari ke 7 yang tidak berdistribusi normal, analisa statistik untuk perlakuan hari ke 7 menggunakan uji statistik non parametrik.

Berat badan dan kadar cystatin-C serum kelinci sebelum penyuntikan kontras maupun plasebo pada penelitian ini tidak berbeda bermakna ( $p > 0,05$ ), sehingga jika terjadi perubahan pada variabel tergantung (kadar cystatin-C serum), hal ini berarti sebagai akibat dari pemberian kontras media non ionik *low osmolar*.

Kadar cystatin-C pada *Oryctolagus cuniculus* kelompok perlakuan meningkat pada pengukuran hari ke 1, 3, dan ke 7, menurun kembali pada hari ke 10, sedangkan pada kontrol relatif tidak terjadi peningkatan.



**Gambar 1.** Rerata kadar cystatin-C pre suntik hari ke 1, 3, 7, dan hari ke 10 pada *Oryctolagus cuniculus*.

Tabel 1 menunjukkan bahwa pada kelompok perlakuan menunjukkan peningkatan yang bermakna kadar cystatin-C serum, pada pengamatan pre pemberian kontras

media dan hari ke 1 ( $p = 0,011$ ), 3 ( $p = 0,004$ ), dan 7 ( $p = 0,028$ ), namun tidak didapatkan peningkatan yang bermakna kadar cystatin-C serum pada pengamatan pre pemberian kontras media dan hari ke 10 ( $p = 0,905$ ).

Tabel 2 menunjukkan bahwa pada kelompok kontrol tidak didapatkan peningkatan yang bermakna kadar cystatin-C serum, pada pengamatan hari ke 1 ( $p = 0,464$ ), 3 ( $p = 0,399$ ), 7 ( $p = 0,480$ ), dan 10 ( $p = 0,736$ ).

Tabel 3 menunjukkan terdapat perbedaan peningkatan yang bermakna kadar cystatin-C serum, pada pengamatan pre pemberian kontras media sampai hari ke 1 ( $p = 0,036$ ) dan 3 ( $p = 0,021$ ), antara kelompok perlakuan dan kelompok kontrol. Tidak didapatkan perbedaan peningkatan yang bermakna kadar cystatin-C serum, pada pengamatan pre pemberian kontras media sampai hari ke 7 ( $p = 0,167$ ) dan 10 ( $p = 0,763$ ), antara kelompok perlakuan dan kelompok kontrol.

**Tabel 1.** Perubahan kadar cystatin-C serum pre suntik hari ke 1, 3, 7, dan hari ke 10, pada kelompok perlakuan *Oryctolagus cuniculus*.

Waktu pengamatan (hari ke)	$\Delta$ (mg/L)	% $\Delta$	Uji t berpasangan		Ket
			Harga t	Harga p	
Pre s/d H1	0,00149 ± 0,00148	42,7	3,181	0,011	S
Pre s/d H 3	0,00216 ± 0,00176	61,9	3,879	0,004	S
Pre s/d H 7	0,00468 ± 0,00157	34,1	Z=-2,194	0,028	S
Pre s/d H 10	0,000096 ± 0,00248	-2,8	-0,122	0,9 05	NS

Keterangan: Bermakna bila  $p < 0,05$ , S= Signifikan NS= Non Signifikan

**Tabel 2.** Perubahan kadar cystatin-C serum pre suntik hari ke 1, 3, 7, dan hari ke 10, pada kelompok kontrol *Oryctolagus cuniculus*.

Waktu pengamatan (hari ke)	$\Delta$ (mg/L)	% $\Delta$	Uji t berpasangan		Ket
			Harga t	Harga p	
Pre s/d H1	0,000240 ± 0,00105	8,6	0,761	0,464	NS
Pre s/d H 3	0,000390 ± 0,00147	14,0	0,882	0,399	NS
Pre s/d H 7	0,000266 ± 0,00114	10,0	0,736	0,480	NS
Pre s/d H 10	0,000203 ± 0,00184	7,6	0,348	0,736	NS

Keterangan: Bermakna bila  $p < 0,05$ , S= Signifikan NS= Non Signifikan.

**Tabel 3.** Perbedaan perubahan kadar cystatin-C serum antara kelompok perlakuan dan kontrol *Oryctolagus cuniculus*.

Waktu pengamatan (hari ke)	Kelompok		Uji t 2 sampel		Ket
	Perlakuan (rerata ± SD, Mg/L)	Kontrol (rerata ± SD,mg/L)	Harga t	Harga p	
Pre s/d H1	0,00149 ± 0,00148	0,000240 ± 0,00105	2,253	0,036	S
Pre s/d H 3	0,00216 ± 0,00176	0,000390 ± 0,00147	2,511	0,021	S
Pre s/d H 7	0,00468 ± 0,00157	0,000266 ± 0,00114	1,439	0,167	NS
Pre s/d H 10	0,000096 ± 0,00248	0,000203 ± 0,00184	0,306	0,763	NS

Keterangan: Bermakna bila  $p < 0,05$ , S= Signifikan NS= Non Signifikan

## PEMBAHASAN

Kadar cystatin-C pada *Oryctolagus cuniculus* kelompok perlakuan, menunjukkan peningkatan yang bermakna kadar cystatin-C serum, pada pengamatan pre pemberian kontras media dan hari ke 1 ( $p = 0,011$ ), 3 ( $p = 0,004$ ), dan 7 ( $p = 0,028$ ), namun tidak didapatkan peningkatan yang bermakna kadar cystatin-C serum pada pengamatan pre pemberian kontras media dan hari ke 10 ( $p = 0,905$ ).

Didapatkan perbedaan peningkatan yang bermakna kadar cystatin-C serum pada pengamatan pre pemberian kontras media sampai hari ke 1 ( $p = 0,036$ ) dan 3 ( $p = 0,021$ ), antara kelompok perlakuan dan kelompok kontrol. Tidak didapatkan perbedaan peningkatan yang bermakna kadar cystatin-C serum, pada pengamatan pre pemberian kontras media sampai hari ke 7 ( $p = 0,167$ ) dan 10 ( $p = 0,763$ ), antara kelompok perlakuan dan kelompok kontrol.

Bahan radio kontras mempengaruhi fungsi ginjal secara primer, berupa perubahan hemodinamik renal dan secara langsung bersifat toksik terhadap tubular ginjal. Secara langsung toksisitas kimia tergantung pada fisikokimia kontras media. Istilah nefropati akibat kontras (NAK) digunakan secara luas sehubungan dengan terjadinya penurunan fungsi ginjal, karena pemakaian bahan kontras media. Secara tidak langsung, terjadi penurunan fungsi ginjal ditandai dengan peningkatan serum kreatinin lebih dari 25%, mulai meningkat dalam 24 jam dan mencapai puncak pada hari ke 3 sampai hari ke 5, setelah mendapat injeksi kontras media dan kembali ke *baseline* dalam waktu 10 - 14 hari.<sup>1,3-5,10</sup>

Cystatin-C mempunyai korelasi yang lebih kuat dan tingkat kemaknaan yang lebih tinggi terhadap renogram DTPA, dibanding klirens kreatinin terhadap renogram DTPA pada pasien dengan fungsi ginjal menurun, didapatkan korelasi yang bermakna antara cystatin-C dengan renogram DTPA ( $r = 0,839$  dengan  $p = 0,01$ ) dan klirens kreatinin dengan renogram DTPA ( $r = 0,605$  dengan  $p = 0,037$ ).<sup>11</sup>

Klirens kreatinin tidak mempunyai korelasi yang bermakna dengan renogram DTPA, pada pasien dengan fungsi ginjal menurun ringan, dan didapatkan korelasi yang bermakna dan lebih kuat antara cystatin-C dengan renogram DTPA ( $r = 0,724$  dengan  $p = 0,027$ ).<sup>11</sup>

Korelasi yang paling kuat antara cystatin-C dengan renogram DTPA, didapatkan pada pasien dengan fungsi ginjal yang menurun. Cystatin-C mempunyai korelasi yang

lebih kuat dengan tingkat kemaknaan yang lebih tinggi, dibanding klirens kreatinin pada berbagai kondisi, baik pada fungsi ginjal normal, menurun, dan menurun ringan.<sup>11</sup>

Pada penelitian Hariyono (2007) yang mengukur kadar cystatin-C serum pada kelinci coba dengan obstruksi ureter total unilateral buatan, tidak didapatkan perbedaan peningkatan bermakna kadar cystatin-C serum pengamatan pre operasi sampai hari ke 7 perlakuan dan kontrol, dan didapatkan perbedaan peningkatan bermakna cystatin-C serum pengamatan pre operasi sampai hari ke 14 dan hari ke 7, sampai hari ke 14 perlakuan dan kontrol.<sup>12</sup>

Cystatin-C dapat digunakan untuk deteksi dini penurunan fungsi ginjal derajat ringan. Beberapa penelitian membuktikan keunggulan cystatin-C terhadap kreatinin serum dalam mendeteksi penurunan fungsi ginjal. Meta analisis dari 46 artikel penelitian yang membandingkan korelasi antara cystatin-C dan kreatinin serum, terhadap standar pengukuran GFR seperti klirens inulin, 51 Cr-EDTA, 99 Tm-DTPA, iothalamate atau iohexol menunjukkan hasil bahwa cystatin-C mempunyai korelasi yang lebih kuat ( $r = 0,816$ ,  $p < 0,001$ ), dibanding dengan kreatinin serum ( $r = 0,742$ ,  $p < 0,001$ ).<sup>13</sup>

Coll (2000) dalam penelitiannya dengan menggunakan 125 I-ICI sebagai standar pengukuran GFR, mendapatkan bahwa cystatin-C mempunyai korelasi yang lebih kuat ( $r = 0,77$ ,  $p < 0,0001$ ), dibandingkan dengan kreatinin serum ( $r = 0,73$ ,  $p < 0,0001$ ) maupun dengan klirens kreatinin ( $r = 0,74$ ,  $p < 0,0001$ ).<sup>14</sup>

Coll (2000) dalam penelitiannya juga mendapatkan bahwa cystatin-C serum mulai meningkat di atas harga normal pada GFR 88 ml/menit, sedangkan kreatinin serum baru mulai meningkat di atas normal bila GFR sudah turun sampai 75 ml/menit. Pada penurunan ringan fungsi ginjal (GFR antara 50 sampai 83 ml/menit) didapatkan cystatin-C serum meningkat pada 100% pasien, sedangkan kreatinin serum hanya meningkat pada 75% pasien. Pada penurunan ringan fungsi ginjal didapatkan cystatin-C meningkat pada 71,4% pasien, sedangkan kreatinin serum hanya meningkat pada 52,4% pasien.<sup>14</sup>

## SIMPULAN

Terdapat peningkatan kadar cystatin-C serum yang bermakna pada kelompok kontrol dan kelompok perlakuan pada hari ke 1 dan 3, tetapi tidak didapatkan peningkatan kadar cystatin-C serum yang bermakna pada kelompok perlakuan dan kelompok kontrol pada hari ke 7 dan 10.

#### DAFTAR PUSTAKA

1. Waybill MM, Waybill PN. Contrast media – induced nephrotoxicity: Identification of patients at risk and algorithms for prevention. 2001;12:3–9. (diakses 28 September 2006) (<http://www.jvir.org/cgi/reprint/12/1/3>).
2. Detrenis S, Meschi M, Musini S, Savazzi G. Lights and shadows on the pathogenesis of contrast - induced nephropathy: State of the art. 2005. p. 1542 – 50. (<http://ndt.oxfordjournals.org/cgi/reprint/20/8/1542>) (diakses 28 September 2006).
3. Goldenberg I, Matetzky S. Nephropathy induced by contrast media: Pathogenesis, risk factors, and preventive strategies. May 2005: 172(11)(diakses 28 September 2006). (<http://www.cmaj.ca/cgi/reprint/172/11/1461>)
4. Tepel M, Aspelin P, Lameire N. Contrast – induced nephropathy: A clinical and evidence – based approach. 2006; 113: 1799 – 806. (diakses 28 September 2006). (<http://circ.ahajournals.org/cgi/reprint/113/14/1799>)
5. Thomsen HS, Morcos SK. Contrast media and the kidney: European Society of Urogenital Radiology (ESUR) Guidelines. 2003; 76: 513 – 8. (diakses 28 September 2006). (<http://bjr.birjournals.org/cgi/reprint/76/908/513>)
6. Lameire NH. Contrast – induced nephropathy – prevention and risk reduction. Oxford University Press. *Nephrol Dial Transplant* 2006; 21 [Suppl 1]: i11 – i23.
7. Orlando R, Mussap M, Plebani M, Piccoli P, Martin SD, Floreani M, et al. Diagnostic value of plasma cystatin-C as a glomerular filtration marker in decompensated liver cirrhosis. *Clinical Chemistry* 2002; 48: 850–8.
8. Reed CH. Diagnostic application of cystatin-C. *British Journal of Biomedical Science* 2000; 57: 323–9.
9. Herget-Rosenthal S, Trabold S, Pietruck F, Heemann U, Philipp T, Kribben A. Cystatin-C: Efficacy as screening test for reduced glomerular filtration rate. *American Journal of Nephrology* 2000; 20: 97–102.
10. Katzberg RW. Urography into the 21st century: New contrast media, renal handling, imaging characteristics, and nephrotoxicity. *Radiology* 1997; 204: 297–312.
11. Halilintar I. Perbandingan antara cystatin-C serum dengan klirens kreatinin sebagai marker endogen untuk mengukur fungsi ginjal pada pasien batu saluran kemih obstruktif. *Jurnal Urologi Indonesia* 2006; 13 (2): 39–43.
12. Hariyono. Pengaruh obstruksi ureter total unilateral buatan terhadap kadar cystatin-C serum oryctalagus cuniculus. *Jurnal Urologi Indonesia*; 2007: 14 (2).
13. Dharnidharka VR. Serum cystatin-C is superior to serum creatinin as a marker of kidney function: A meta-analysis. *American Journal of Kidney Diseases*; August 2002: 40 (2).
14. Coll E, Botey A, Alvares L, Poch E, Quinto L, Saurina A. Serum cystatin-C as a new marker for noninvasive estimation of glomerular filtration rate and as a marker for early renal impairment. *American Journal of Kidney Diseases*; Juli 2000: 36 (1).

# PENGARUH PEMBERIAN KONTRAS MEDIA NON IONIK LOW OSMOLAR INTRA VENA TERHADAP KADAR CYSTATIN-C SERUM

---

## GRADEMARK REPORT

---

FINAL GRADE

**/100**

GENERAL COMMENTS

**Instructor**

---

PAGE 1

---

PAGE 2

---

PAGE 3

---

PAGE 4

---

PAGE 5

---