

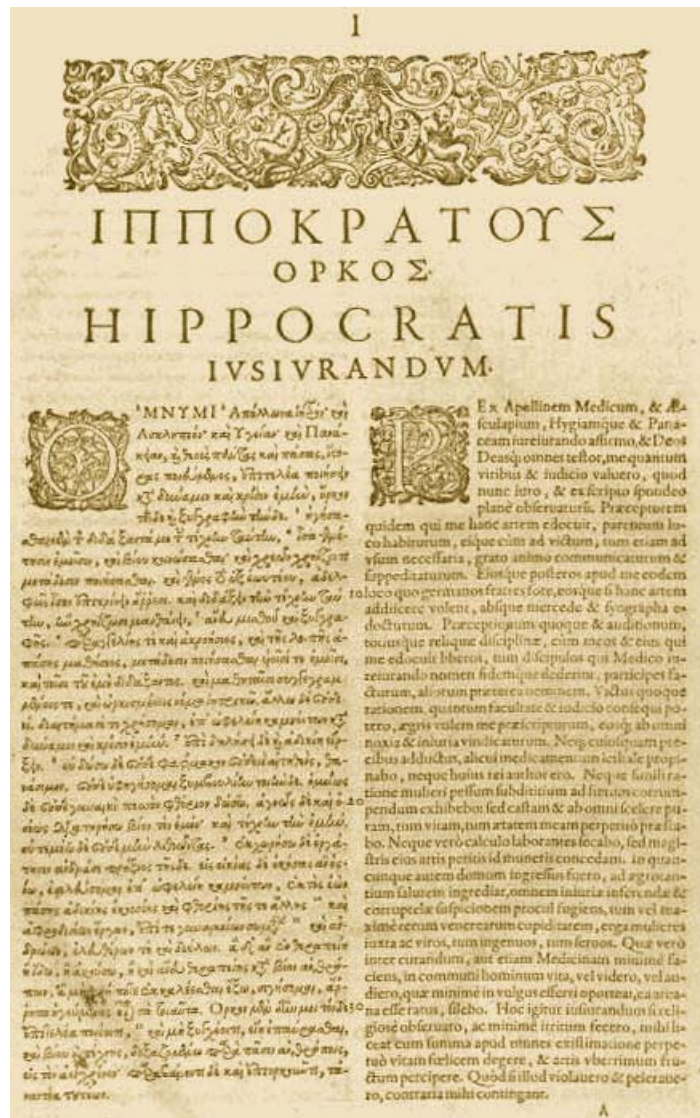
ВОЈНОСАНИТЕТСКИ ПРЕГЛЕД

Часопис лекара и фармацеутика Војске Србије

Military Medical and Pharmaceutical Journal of Serbia

Vojnosanitetski pregled

Vojnosanit Pregl 2010; September vol. 67 (No. 9): pp. 699-794.



ВОЈНОСАНИТЕТСКИ ПРЕГЛЕД

Први број *Војносанинететског прегледа* изашао је септембра месеца 1944. године

Часопис наставља традицију *Војно-санинететског гласника*, који је излазио од 1930. до 1941. године

ИЗДАВАЧ

Управа за Војно здравство МО Србије

ИЗДАВАЧКИ САВЕТ

проф. dr sc. pharm. **Мирјана Антуновић**
проф. dr sc. med. **Бранко Глигић**, пук.
проф. dr sc. med. **Мирјана Животић-Вановић**
проф. dr sc. med. **Миодраг Јевтић**, генерал-мајор
dr **Младен Миливојевић**, пук.
прим. dr **Милорад Рабреновић**, пук.
проф. dr sc. med. **Небојша Станковић**, пук.
доц. dr **Вељко Тодоровић**, бригадни генерал (председник)
проф. dr sc. med. **Мирољуб Тркулић**, пук.
проф. dr sc. med. **Никола Филиповић**, пук.

МЕЂУНАРОДНИ УРЕЂИВАЧКИ ОДБОР

Prof. **Andrej Aleksandrov** (Russia)
Assoc. Prof. **Kiyoshi Ameno** (Japan)
Prof. **Rocco Bellantone** (Italy)
Prof. **Hanoch Hod** (Israel)
Prof. **Abu-Elmagd Kareem** (USA)
Prof. **Hiroshi Kinoshita** (Japan)
Prof. **Celestino Pio Lombardi** (Italy)
Prof. **Philippe Morel** (Switzerland)
Prof. **Kiyotaka Okuno** (Japan)
Prof. **Stane Repše** (Slovenia)
Prof. **Mitchell B. Sheinkop** (USA)
Prof. **Hitoshi Shiozaki** (Japan)
Prof. **H. Ralph Schumacher** (USA)
Prof. **Miodrag Stojković** (UK)
Assist. Prof. **Tibor Tot** (Sweden)

УРЕЂИВАЧКИ ОДБОР

Главни и одговорни уредник
проф. dr sc. pharm. **Силва Добрић**

Уредници:

проф. dr sc. med. **Бела Балит**
проф. dr sc. stom. **Злата Бркић**
проф. dr sc. med. **Милан Вишњић**
проф. dr sc. med. **Славица Вучинић**
проф. dr sc. med. **Александар Ђуровић**, пук.
доц. dr sc. med. **Бранка Ђуровић**
проф. dr sc. med. **Борисав Јанковић**
доц. dr sc. med. **Лидија Кандолф-Секуловић**
академик **Владимир Кањух**
академик **Владимир Костић**
проф. dr sc. med. **Звонко Магић**
проф. dr sc. med. **Ђоко Максић**, пук.
доц. dr sc. med. **Гордана Мандић-Гајић**
проф. dr sc. med. **Драган Микић**, пук.
проф. dr sc. med. **Дарко Мирковић**
доц. dr sc. med. **Слободан Обрадовић**, мајор
академик **Миодраг Остојић**
проф. dr sc. med. **Предраг Пешко**, FACS
академик **Ђорђе Радак**
проф. dr sc. med. **Ранко Ранчевић**, пук.
проф. dr sc. med. **Предраг Ромић**, пук.
проф. dr sc. med. **Војкан Станић**, пук.
доц. dr sc. med. **Дара Стефановић**
проф. dr sc. med. **Душан Стефановић**, пук.
проф. dr sc. stom. **Љубомир Тодоровић**
проф. dr sc. med. **Снежана Церовић**
академик **Миодраг Чолић**, пук.
академик **Радоје Чоловић**
проф. dr sc. med. **Весна Шуљгагић**



Технички секретар уређивачког одбора
dr Маја Марковић

РЕДАКЦИЈА

mg sc. med. dr Соња Андрић-Кривокућа, dr Снежана
Јанковић, dr Маја Марковић, dr sc. Александра Гогић

Технички уредник: Милан Перовановић

Редактор за српски и енглески језик:
Драгана Мучибабић, проф.

Коректор: Љиљана Николић

Компјутерско-графичка обрада:
Светлана Стајић, Весна Тотих, Јелена Васил

Адреса редакције: Војномедицинска академија, Институт за научне информације, Црнотравска 17, поштански фах 33-55, 11040 Београд, Србија. Телефони: главни и одговорни уредник 3609 311, технички секретар 3608 943, редакција 3609 479 и 3609 179, претплата 3608 997. Факс 2669 689. E-mail: vmainil@EUnet.rs (главни и одговорни уредник) и vmavsp@hotmail.com (редакција).

Радове објављене у „Војносанинететском прегледу“ индексирају: Science Citation Index Expanded (SCIE), Journal Citation Reports/Science Edition, Index Medicus (Medline), Excerpta Medica (EMBASE), EBSCO, Biomedicina Serbica. Садржаје објављују *Giornale di Medicina Militare* и *Revista de Medicina Militara*. Приказе оригиналних радова и извода из садржаја објављује *International Review of the Armed Forces Medical Services*.

Часопис излази дванаест пута годишње. Претплате: жиро рачун код Управе за јавна плаћања у Београду бр. 840-941621-02 – ВМА (за Војносанинететски преглед), ПИБ 102116082. За претплату из иностранства обратити се служби претплате на тел. 3608 997. Годишња претплата: 4 000 динара за грађане Србије, 8 000 динара за установе из Србије и 150 € (у динарској противвредности на дан уплате) за претплатнике из иностранства. Копију уплатнице доставити на горњу адресу.

VOJNOSANITETSKI PREGLED

The first issue of *Vojnosanitetski pregled* was published in September 1944
The Journal continues the tradition of *Vojno-sanitetski glasnik* which was published between 1930 and 1941

PUBLISHER

Military Health Department, Ministry of Defence, Serbia

PUBLISHER'S ADVISORY BOARD

Assoc. Prof. **Mirjana Antunović**, BPharm, PhD
Col. Assoc. Prof. **Nikola Filipović**, MD, PhD
Col. Assoc. Prof. **Branko Gligić**, MD, PhD
Major-General, Prof. **Miodrag Jevtić**, MD, PhD
Col. **Mladen Milivojević**, MD
Col. **Milorad Rabrenović**, MD
Col. Prof. **Nebojša Stanković**, MD, PhD
Brigadier General Assist. Prof. **Veljko Todorović**, MD, PhD
(Chairman)
Col. Assoc. Prof. **Miroljub Trkuljić**, MD, PhD
Prof. **Mirjana Životić-Vanović**, MD, PhD

INTERNATIONAL EDITORIAL BOARD

Prof. **Andrej Aleksandrov** (Russia)
Assoc. Prof. **Kiyoshi Ameno** (Japan)
Prof. **Rocco Bellantone** (Italy)
Prof. **Hanoch Hod** (Israel)
Prof. **Abu-Elmagd Kareem** (USA)
Prof. **Hiroshi Kinoshita** (Japan)
Prof. **Celestino Pio Lombardi** (Italy)
Prof. **Philippe Morel** (Switzerland)
Prof. **Kiyotaka Okuno** (Japan)
Prof. **Stane Repše** (Slovenia)
Prof. **Mitchell B. Sheinkop** (USA)
Prof. **Hitoshi Shiozaki** (Japan)
Prof. **H. Ralph Schumacher** (USA)
Prof. **Miodrag Stojković** (UK)
Assist. Prof. **Tibor Tot** (Sweden)

EDITORIAL BOARD

Editor-in-chief

Prof. **Silva Dobrić**, BPharm, PhD

Co-editors:

Prof. **Bela Balint**, MD, PhD
Assoc. Prof. **Zlata Brkić**, DDM, PhD
Assoc. Prof. **Snežana Cerović**, MD, PhD
Col. Prof. **Miodrag Čolić**, MD, PhD, MSAAS
Prof. **Radoje Čolović**, MD, PhD, MSAAS
Col. Assoc. Prof. **Aleksandar Đurović**, MD, PhD
Assist. Prof. **Branka Đurović**, MD, PhD
Prof. **Borisav Janković**, MD, PhD
Assist. Prof. **Lidija Kandolf-Sekulović**, MD, PhD
Prof. **Vladimir Kanjuh**, MD, PhD, MSAAS
Prof. **Vladimir Kostić**, MD, PhD, MSAAS
Prof. **Zvonko Magić**, MD, PhD
Col. Prof. **Đoko Maksić**, MD, PhD
Assist. Prof. **Gordana Mandić-Gajić**, MD, PhD
Col. Assoc. Prof. **Dragan Mikić**, MD, PhD
Assoc. Prof. **Darko Mirković**, MD, PhD
Major, Assist. Prof. **Slobodan Obradović**, MD, PhD
Prof. **Miodrag Ostojić**, MD, PhD, MSAAS
Prof. **Predrag Peško**, MD, PhD, FACS
Prof. **Đorđe Radak**, MD, PhD, MSAAS
Col. Assoc. Prof. **Ranko Raičević**, MD, PhD
Col. Assoc. Prof. **Predrag Romić**, MD, PhD
Col. Prof. **Vojkan Stanić**, MD, PhD
Assist. Prof. **Dara Stefanović**, MD, PhD
Col. Prof. **Dušan Stefanović**, MD, PhD
Prof. **Milan Višnjić**, MD, PhD
Assoc. Prof. **Slavica Vučinić**, MD, PhD
Assoc. Prof. **Vesna Šuljagić**, MD, PhD
Prof. **Ljubomir Todorović**, DDM, PhD

Editorial staff

Sonja Andrić-Krivokuća, MD, MSc; Snežana Janković, MD;
Maja Marković, MD; Dragana Mučibabić, BA,
Aleksandra Gogić, PhD

Technical editor

Milan Perovanović

Proofreading

Ljiljana Nikolić

Technical editing

Svetlana Stajić, Vesna Totić, Jelena Vasilj



Editorial Office: Military Medical Academy, INI; Crnotravska 17, PO Box 33-55, 11040 Belgrade, Serbia. Tel: +381-11-3608-943; +381-11-3609-479, subscription 3608-997; Fax: +381-11-2669-689; E-mail: vmavsp@hotmail.com

Papers published in the *Vojnosanitetski pregled* are indexed in: Science Citation Index Expanded (SCIE), Journal Citation Reports/Science Edition, Index Medicus (Medline), Excerpta Medica (EMBASE), EBSCO, Biomedicina Serbica. Contents are published in *Giornale di Medicina Militare* and *Revista de Medicina Militara*. Reviews of original papers and abstracts of contents are published in *International Review of the Armed Forces Medical Services*.

The Journal is published monthly. Subscription: account in Uprava za javna plaćanja in Belgrade. Giro Account No. 840-941621-02 – VMA (za Vojnosanitetski pregled), PIB 102116082. To subscribe from abroad phone to +381 11 3608 997. Subscription prices per year: individuals 4 000.00 Din, and institutions 8 000,00 Din in Serbia, and foreign subscribers 150 €.



SADRŽAJ / CONTENTS

UVODNIK / EDITORIAL

*Silva Dobrić***Crne mrlje na belom mantilu**

Black spots on a white coat 703

ORIGINALNI ČLANCI / ORIGINAL ARTICLES

*Mirjana Arandjelović, Ivana Ilić, Sladjana Jović***Burnout i kvalitet života kod radnika u prehrambenoj industriji – pilot studija u Srbiji**

Burnout and the quality of life of workers in food industry – a pilot study in Serbia 705

*Nebojša T. Milošević, Dušan Ristanović, Dušica L. Marić, Radmila Gudović, Bojana Krstonošić***Kvantitativna analiza dendritske krošnje velikih neurona zupčastog jedra cerebeluma čoveka**

Quantitative analysis of dendritic branching pattern of large neurons in human cerebellum 712

*Milica Zlatković, Miodrag Jovanović, Dragana Djordjević, Slavica Vučinić***Brzo simultano određivanje organofosfornih pesticida u humanom serumu i urinu metodom tečne hromatografije sa masenom spektrometrijom**

Rapid simultaneous determination of organophosphorus pesticides in human serum and urine by liquid chromatography-mass spectrometry 717

*Ivica Pejčić, Svetislav Vrbić, Sladjana Filipović, Mirjana Ščekić, Ivan Petković,**Ljiljana Pejčić, Nebojša Djenić***Značaj praćenja serumskih tumorskih markera kod metastatskih karcinoma nepoznatog primarnog ishodišta**

Significance of serum tumor markers monitoring in carcinomas of unknown primary site 723

*Nenad Ratković, Radoslav Romanović, Aleksandra Jovelić, Branko Gligić, Sašo Rafajlovski, Danilo Vojvodić, Slobodan Obradović***Urgentna perkutana koronarna intervencija dovodi do pada serumske koncentracije solubilnog CD40 liganda**

Urgent percutaneous coronary intervention leads to a decrease in serum concentrations of soluble CD40 ligand 732

*Sreten Vičentić, Aleksandar Jovanović, Bojana Dunjić, Zorana Pavlović, Milutin Nenadović, Nenad Nenadović***Profesionalni stres kod lekara opšte prakse i psihijatarata – nivo psihičkog distresa i rizika od burnout sindroma**

Professional stress in general practitioners and psychiatrists – the level of psychological distress and burnout risk 741

*Vesna Gajanin, Zdenka Krivokuća, Kristina Kostić, Radoslav Gajanin, Igor Sladojević***Significance of vascular endothelial growth factor expression in skin melanoma**

Značaj ekspresije vaskularnog endotelnog faktora rasta kod melanoma kože 747

*Mirjana Kocić, Milica Lazović, Irena Dimitrijević, Dragan Mančić, Anita Stanković***Procena terapijskog efekta lasera male snage i interferentnih struja kod bolesnika sa kompleksnim regionalnim bolnim sindromom primenom infracrvene termovizijske kamere**

Evaluation of low level laser and interferential current in the therapy of complex regional pain syndrome by infrared thermographic camera 755

Zoran Komazec, Slobodanka Lemajić-Komazec, Rajko Jović, Čongor Nadj, Ljiljana Jovančević, Slobodan Savović

Comparison between auditory steady-state responses and pure-tone audiometry
Poređenje metode određivanja steady-state auditivnih evociranih potencijala i tonalne liminarne audiometrije 761

Miloš Čanković, Marija Bokor-Bratić

Infekcija kandidom albicans kod bolesnika sa oralnim planocelularnim karcinomom
Candida albicans infection in patients with oral squamous cell carcinoma 766

AKTUELNE TEME / CURRENT TOPIC

Svetozar Čiplić, Milutin Djuričić, Ivan Bulatović, Dušan Spasojević

Ljudska prava i medicina
Human rights and medicine 771

Suzana Matejić, Vujadin Otašević

Ethics and deontology in forensic medicine
Etika i deontologija u sudskoj medicini 774

KAZUISTIKA / CASE REPORTS

Dragana Puzović, Snježana Čolić

Sudskomedicinsko tumačenje preloma tubera gornje vilice nastalog prilikom vađenja zuba
Forensic interpretation of the maxillary tuberosity fracture caused by tooth extraction 777

Irena Djunić, Dragica Tomić, Maja Peruničić, Ana Vidović, Vesna Čemerikić, Vladislava Djurašinović, Ljubomir Jaković, Gradimir Janković

Dijagnostika i lečenje primarne amiloidoze
Diagnosis and the treatment of primary amyloidosis 781

PISMA UREDNIKU / LETTERS TO THE EDITOR

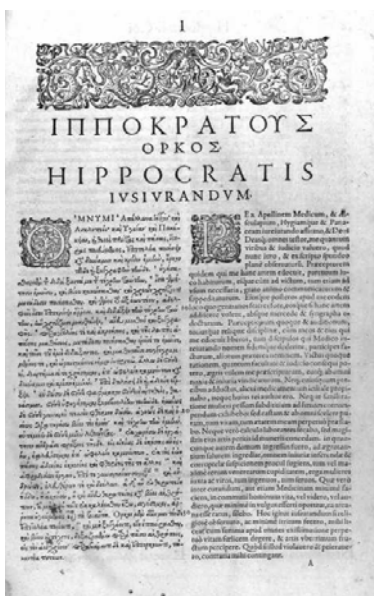
Aleksandar S. Nedok

Jedna zlehuda lekarska sudbina: sanitetski kapetan 2. klase dr Periša Šljivić (1851-1877)
A bad luck of a physician: II class Army Medical Corps Captain Periša Šljivić (1851-1877)..... 786

IN MEMORIAM 787

ERRATUM 789

UPUTSTVO AUTORIMA / INSTRUCTIONS TO THE AUTHORS 791



Tekst originalne Hipokratove zakletve štampan 1959. godine na grčkom i latinskom jeziku.

Original Hippocratic Oath printed in 1959 (left Greek, and right Latin version).



Crne mrlje na belom mantilu

Black spots on a white coat

Silva Dobrić

Vojnomedicinska akademija, Institut za naučne informacije, Beograd, Srbija

Legenda kaže da je Hipokrat (oko 460–377. p.n.e), otac moderne medicine i tvorac zakletve čijim se polaganjem lekari uvode u svoju profesiju i obavezuju da će svoj život staviti u službu humanosti, stalno imajući u vidu dobrobit bolesnika i ljudski život kao nešto najvrednije, s gnušanjem odbio skupocene darove persijskog kralja Artakserksesa I, neprijatelja Grčke, kojom ga je ovaj želeo potkupiti sa ciljem da pruži pomoć njegovim vojnicima ne znajući da bi Hipokrat to učinio i bez nagrade, u skladu sa svojim ubedenjem da je lekar u obavezi da pomogne bolesnom čoveku bez obzira na moguće razlike između njih (verske, nacionalne, klasne,...) (slika 1).

rijalne dobiti, nepoštenje u naučnom radu i publicistici (plagijarizam, falsifikovanje i izmišljanje rezultata istraživanja), stavljanje interesa farmaceutskih firmi iznad interesa struke itd. Iako su slučajevi mita i korupcije i drugih nečasnih radnji radi ostvarivanja sopstvene koristi, zloupotreba položaja i sl. prisutni, praktički, u svakoj profesiji, zašto je javnost posebno senzibilisana, upravo, na takve slučajeve u medicinskoj praksi? Odgovor na ovo pitanje verovatno leži u tome što se, generalno, lekarska profesija doživljava kao nešto najčasnije i najčistije, poput belog mantila, svojevrsnog simbola zdravstvenih radnika, čije belilo ne bi smelo ni u jednom trenutku da bude umrljano crnilom nepoštenja.



Sl. 1 – Anne-Louis Girodet de Roucy-Trioson: Hipokrat odbija darove persijskog kralja Artakserksesa I (Muzej istorije medicine „Rene Dekart“, Pariz, Francuska)

Uzimajući u obzir ove najsvetije principe lekarske profesije, čime se ona izdvaja od drugih i dobija poseban, a može se reći i privilegovan položaj u društvu, ne čudi što svako odstupanje od ovih principa izaziva ogorčenje i gnušanje javnosti u mnogo većoj meri, nego kada se slične pojave dese kod pripadnika drugih profesija. To se, u prvom redu, odnosi na slučajeve traženja i primanja mita, mahinacije sa nabavkom medicinske opreme i lekova u cilju ostvarivanja mate-

Situacija u kojoj često život pojedinca zavisi od lekarskog činjenja ili nečinjenja, daju privilegovan položaj ovoj profesiji u društvu, ali, s druge strane, i ogromnu odgovornost i obavezu prema društvenoj zajednici koja im je poverila jedan od, za svaki narod, sigurno, najvažnijih zadataka, a to je očuvanje i unapređenje zdravlja stanovništva. Stoga je i razumljiva briga društvene zajednice da učini sve da sačuva izvorne vrednosti i integritet lekarske profesije. Ovo je, slo-

bodno se može reći, zadatak svih, počevši od Svetske zdravstvene organizacije, preko najviših državnih organa svake zemlje, strukovnih udruženja i, konačno, svakog pojedinca. Jer, ne treba zaboraviti, slučajevi nepoštenja u lekarskoj praksi podjednako su zastupljeni i u najrazvijenijim, kao i najnerazvijenijim zemljama, u bogatim, kao i u siromašnim društvima, a istorija nas uči da od njega nisu pošteđeni, nažalost, ni mnogi priznati medicinski autoriteti. Poslednjih godina, nažalost, ove pojave postale su i deo naše svakodnevnice, puneći senzacionalističkim tekstovima novinske stupce i izazivajući, s pravom, nepoverenje javnosti u zdravstveni sistem, odnosno, drugim rečima, u svog lekara.

Pa, kako onda zaštititi beli mantil od crnih mrlja? Da li kao struka imamo snage za to? Verujem da imamo i da možemo jer oduvek je među zdravstvenim radnicima bilo više onih koji su svoj posao obavljali časno, u skladu sa Hipokratovom zakletvom (tabela 1), nego onih koji to nisu činili, bez obzira na sva iskušenja i probleme sa kojima se suoča-

vaju na radnom mestu, ali i u svakodnevnom životu. Ne sme se zaboraviti da, iako medicina ima povlašćeno mesto u društvu, njena društvena odgovornost je ogromna i zaoštravaće se sve više. Postupanje po principima struke, poštovanje njenih osnovnih principa ustanovljenih pre više od dva milenijuma, jesu i biće jedini i pravi oslonac i putokaz sadašnjim i budućim generacijama lekara u vremenima koja dolaze.

U tom smislu, preporučujem vašoj pažnji dva rada iz ovog broja Vojnosanitetskog pregleda posvećena medicinskoj etici i njenom značenju ne samo za struku, već i mnogo šire, za svakog pojedinca i društvo u celini: Čiplić S i sar. „Ljudska prava i medicina“ i Matijević S. i Otašević U. „*Ethics and deontology in forensic medicine*“, kao i Pismo uredniku Aleksandra Nedoka, naslovljeno kao „Jedna zlehuda lekarska sudbina: sanitetski kapetan II klase dr Periša Šljivić (1851–1877)“, u kome je, na primeru mladog siromašnog srpskog lekara iz 19. veka, na dirljiv način prikazana ljubav prema lekarskom pozivu.

Tabela 1

Originalni i modifikovani tekst Hipokratove zakletve*

Tekst originalne Hipokratove zakletve	Moderna verzija Hipokratove zakletve, prema Ženevskoj deklaraciji iz 1948. godine
<p>Kunem se Apolonom lekarom, Asklepijem, Higejom i Panakejom, i za svedoke uzimam sve bogove i sve boginje, da ću se u skladu sa svojim sposobnostima i svojim rasuđivanjem držati ove Zakletve.</p> <p>Da ću smatrati dragim kao roditelja onog koji me je naučio ovoj umetnosti; da ću živeti u slozi sa njim i, ukoliko je to potrebno, deliti svoja dobra sa njim; da ću njegovu decu gledati kao svoju braću, da ću ih, ukoliko to zažele, podučiti ovoj umetnosti bez naplate ili pisane obaveze, da ću podeliti sa svojim sinovima, sinovima učitelja i učenicima koji su se upisali i prihvatili pravila profesije, ali samo sa njima, pravila i instrukcije.</p> <p>Prepisivaću lečenje na dobrobit svojih pacijenata u skladu sa mojim sposobnostima i mojim rasuđivanjem i nikada nikome neću naneti zlo. Nikome neću, čak i ako me zamoli, prepisati smrtonosan otrov niti ću mu dati savet koji može prouzrokovati njegovu smrt. Niti ću dati ženi sredstvo za pobačaj. Održaću čistotu mog života i mog umeća.</p> <p>Neću operisati kod kamena, čak i ako je bolest očigledna kod pacijenta; ostaviću ovu operaciju specijalistima tog umeća.</p> <p>U koju god kuću da uđem, ući ću samo za dobrobit mojih pacijenata, držeći se podalje od bilo kakvog namernog nedela i od zavodjenja žena i muškaraca zarad ljubavnih zadovoljstava, bilo da su slobodni ili robovi.</p> <p>Sve što saznam prilikom vršenja moje profesije ili svakodnevnog poslovanja sa ljudima, a što ne treba širiti dalje, čuvaću kao tajnu i nikada neću otkriti.</p> <p>Ukoliko se verno držim ove zakletve, neka uživam u mom životu i praksi moje umetnosti, poštovan od strane svih ljudi za sva vremena; ali ukoliko zastranim sa nje ili je prekršim, neka me sve suprotno zadesi.</p>	<p>U času kada stupam među članove lekarske profesije svečano obećavam da ću svoj život staviti u službu humanosti.</p> <p>Prema svojim učiteljima sačuvaću dužnu zahvalnost i poštovanje. Svoj poziv ću obavljati savesno i dostojanstveno.</p> <p>Najveća briga će mi biti zdravlje mog bolesnika.</p> <p>Poštovaću tajne onoga ko mi se poveri.</p> <p>Održaću svim svojim silama čast i plemenite tradicije lekarskog zvanja.</p> <p>Moje kolege će biti braća.</p> <p>U vršenju dužnosti prema bolesniku neće na mene uticati nikakvi obziri, vera, nacionalnost, rasa, politička ili klasna pripadnost. Apsolutno ću poštovati ljudski život od samog početka. I pod pretnjom neću popustiti da se iskoriste moja medicinska znanja, suprotna zakonima humanosti.</p> <p>Ovo obećavam svečano, slobodno pozivajući se na svoju čast.</p>

* <http://medicor.wordpress.com/hipokratova-zakletva/>



Burnout i kvalitet života kod radnika u prehrambenoj industriji – pilot studija u Srbiji

Burnout and the quality of life of workers in food industry – a pilot study in Serbia

Mirjana Arandjelović*, Ivana Ilić*, Sladjana Jović†

*Univerzitet u Nišu, Medicinski fakultet, Zavod za zdravstvenu zaštitu radnika, Niš Srbija;

†Institut za javno zdravlje, Niš, Srbija

Apstrakt

Uvod/Cilj. *Burnout* (sindrom izgaranja) kao posledica dugotrajnog stresa na radnom mestu može ozbiljno da naruši zdravlje i kvalitet života eksponiranih radnika. U svetu se posvećuje mnogo pažnje prevenciji *burnout*-a, a metode za njegovo ispitivanje stalno se usavršavaju. U Srbiji još uvek ne postoje istraživanja te vrste. Cilj ove studije bio je da se ispitivanjem uticaja *burnout*-a na kvalitet života radnika prehrambene industrije u Nišu skrene pažnja istraživača u Srbiji na ovaj fenomen i da se utvrdi mogućnost primene inostranih standardizovanih upitnika na populaciju radnika na ovom podneblju. **Metode.** Ispitivanje je sprovedeno u Zavodu za zdravstvenu zaštitu radnika Niš u periodu od 2008. do 2009. godine, na uzorku od 489 radnika uz primenu standardizovanih upitnika za *burnout* (CBI) i kvalitet života (ComQoL-A5). Analiza pouzdanosti skala za merenje izgaranja i kvaliteta života vršena je izračunavanjem Cronbach α koeficijenta. Za procenu uticaja izgaranja na poslu na pokazatelje kvaliteta života korišćena je linearna regresiona analiza. **Rezultati.** Vrednosti Cronbach α koeficijenta ukazuju na visoku pouzdanost skala za merenje ličnog izgaranja (0,87), profesionalnog izgaranja (0,86) i subjektivnog kvaliteta života (0,83). Utvrđene su povećane vrednosti skorova kako za pojavu ličnog izgaranja (60,0), tako i za profesional-

no izgaranje (67,9). Kao najvažnije odrednice za svoj kvalitetan život ispitanici su naveli odnose sa porodicom i prijateljima (10,8), zdravlje (9,1) i osećaj sigurnosti (8,0). Produktivnost (6,8), emocionalno blagostanje (6,6) i materijalna dobra (4,5) imali su manji uticaj na njihov kvalitet života. Međutim, porast skora izgaranja na poslu za 1 statistički je značajno povezan sa opadanjem interskorova za subjektivni kvalitet života u domenima zdravlja ($B = -0,097$), odnosa sa porodicom i prijateljima ($B = -0,048$), sigurnosti ($B = -0,061$) i osećanja pripadanja zajednici ($B = -0,105$). Nije dokazana statistički značajna povezanost između izgaranja na poslu i subjektivnog kvaliteta života u domenima produktivnosti, materijalnog i emocionalnog blagostanja. **Zaključak.** Kod proizvodnih radnika u prehrambenoj industriji postoji visoko prisustvo *burnout*-a kako ličnog, tako i na radnom mestu. Dokazana je negativna korelacija između *burnout*-a i subjektivne procene kvaliteta života što može imati ozbiljne posledice po zdravlje radnika, ali i produktivnost njihovih kompanija. Upitnici koje smo koristili (CBI i Com QoLA5) mogu se smatrati validnim instrumentima za ovu vrstu ispitivanja u Srbiji.

Ključne reči:
sagorevanje na radu, sindrom; kvalitet života; radno mesto; srbija, upitnici.

Abstract

Background/Aim. Burnout syndrome as a consequence of a long stress at workplace can seriously disturb health and quality of life in exposed workers. It is necessary to have adequate burnout prevention and its detection. Worldwide much attention is paid to protect burnout and methods for its determination constantly improve. In Serbia there has not been a study of that kind yet. The aim of the study was to investigate burnout syndrome impact on the quality of life of workers in food industry in Niš, and to call attention of researchers in Serbia on this phenomenon, as well as to test probability of applying the original, standardized questionnaires (CBI, ComQoLA5) to working

population in Serbia. **Methods.** This study was performed in Niš within a period from 2008 to 2009 in the Institute for Workers Health Protection. A total of 489 workers were included in this study by the use of the standard questionnaire for burnout (CBI) and quality of life (ComQoL-A5). Scale confidence for measuring burnout and quality of life was determined by Cronbach α coefficient. ANOVA analysis was used for rating influence of burnout on the quality of life. **Results.** The values of Cronbach α coefficient showed a high confidence of the scale for measurement personal burnout (0.87), work-related burnout (0.86) and subjective quality of life (0.83). We detected increased scores as a result of personal burnout (60.0), as well as of work-related burnout (67.9). The workers sug-

gested relationship with the family and friends as a very important part for their quality of life (10.8), health (9.8) and safety (8.0). Productivity (6.8), emotional well-being (6.6) and material property (4.5) had smaller influence on their quality of life. An increase in score of work-related burnout by 1 was statistically significantly related to decreasing inter scores for subjective quality of life in health ($B = -0.097$), relationship with family and friends ($B = -0.048$), safety ($B = -0.061$) and place in community ($B = -0.105$). A statistically significant relation between work-related burnout and subjective quality of life in productivity, material and emotional well-being was not determined.

Uvod

U poslednjih 20 godina intenzivne društvene promene i transformacija radnih uslova u svetu nametnule su veliko interesovanje istraživača različitih naučnih disciplina za problem *burnout*-a. Pojavile su se mnoge polemike o definiciji *burnout*-a, a došlo je i do izrade validnih instrumenata za njegovo merenje¹. Zagovornik pojma *burnout* je Herbert Freudenberger² koji je 1974. godine definisao ovaj fenomen kao „gašenje motivacije i inicijative“, opisujući ga kao psihijatrijski i fizički poremećaj kod radnika uslužnih delatnosti. Sedam godina kasnije Maslach i Jackson³ proširuju pojam *burnout* navodeći da ovaj sindrom čine emocionalna iscrpljenost (mentalni i emocionalni zamor), cinizam, odnosno depersonalizacija (negativan stav prema poslu) i smanjenje profesionalne efikasnosti. U isto vreme Maslach objavljuje i upitnik za ispitivanje sindroma *burnout*, nazvan *Maslach Burnout Inventory* (MBI), koji je i danas u upotrebi. Veliki broj istraživanja koja su usledila pojavom validnih upitnika za istraživanje sindroma *burnout*, ali i ozbiljne promene u svetu rada, nametnule su potrebu sagledavanja ove pojave i kod radnika drugih profila, a ne samo onih iz tzv. pomagačkih – uslužnih delatnosti, kako je to bio slučaj u početku. Brojni međunarodni, multidisciplinarni projekti bavili su se više godina ispitivanjem sindroma *burnout*-a kod radnika različitih industrijskih grana po proceduri utvrđenoj za proveru validnosti upitnika^{1,4}. Kao rezultat, nastao je novi upitnik za izgaranje na radnom mestu kao specifični instrument Nacionalnog instituta za profesionalno zdravlje u Kopenhagenu 2005. godine (CBI)⁵⁻⁶. Studije koje su usledile pokazale su da pojava ovog sindroma nije „privilegija“ pojedinih profesija, već da on može da zahvati radnike svake profesije, kako zaposlene na administrativnim polovima, tako i radnike u proizvodnim delatnostima⁷⁻⁸. Osim toga, *burnout* može da se prepozna i pre zaposlenja, kod studenata kao „studijski *burnout*“ sindrom, koji nosi rizik od nastanka depresije, psihosocijalnog distresa, neuspeha u prilagodavanju, pa čak i ideje o suicidu⁸⁻⁹.

Etiopatogeneza *burnout* sindroma svakako je kompleksna, ali se generalno smatra da je produžen „negativni stres“ ključni faktor u njegovom nastajanju, pri čemu individualne karakteristike pojedinaca i nemogućnost uspešnog savladavanja, takođe, imaju važnu ulogu. Ostali važni patogenetski faktori mogu da se označe kao „robovanje svakodnevnoj rutini“ ili „razočarenje zbog prevelikih očekivanja“^{1,8}.

Conclusion. There is a high score of both personal and work related burnout among manufacturing workers in food industry. A negative correlation between burnout and subjective quality of life was also proved impacting health and well-being of workers, but also their productivity. The questionnaires we used (CBI, ComQolA5) could be considered as reliable and valid instruments for testing burnout and quality of life in Serbia.

Key words:
burnout, professional; quality of life; workplace; serbia; questionnaires.

Iako se *burnout* dugo već definiše kao stanje progresivnog gubitka idealizma, energije i smisla vlastitog rada koji radnici doživljavaju kao reakciju na hronične izvore stresa na poslu, sa već definisanim fazama u njegovom pojavljivanju (entuzijazam, stagnacija, frustracija, apatija), kao medicinsko stanje *burnout* još uvek nije jasno definisan. Ipak, sindrom sagorevanja na radu veoma je važna oblast medicinskog naučnog istraživanja zbog njegovog značajnog finansijskog i socijalnog efekta koji proizilazi iz (ne)zadovoljstva radnim mestom i njegovih posledica na fizičko i psihičko zdravlje zaposlenih^{1,4,10}.

Istraživanja sindroma *burnout* svakako nisu moda, to je, može se reći, društvena potreba sa ciljem unapređenja zdravlja i kvaliteta života zaposlenih kroz promociju zdravlja na radnom mestu primenom preventivnih mera. Prepoznavanje ovakve potrebe u društvu ogleda se u Uredbi Evropske unije o zdravlju i sigurnosti na radu čije se odredbe mogu primeniti i na psihosocijalne karakteristike posla (89/391/EEC). Isto tako, postoje definisane odredbe o potrebi usklađenosti između karakteristika posla, sposobnosti i potreba zaposlenih, kao i potrebi prevencije nesklada između zahteva posla i mogućnosti zaposlenih (Resolution A4-0050/99) u cilju sprečavanja rizika na radnom mestu i unapređenja zdravlja¹¹.

Burnout u našoj zemlji, koliko je nama poznato, još uvek nije bio tema ozbiljnijih istraživanja. *Burnout* kao važan problem u savremenom radnom i socijalnom okruženju treba da proučava, između ostalog, i medicina rada, kako bi se utvrdilo da li je *burnout* oboljenje u vezi sa radom¹. Naravno da i istraživanja ove pojave sa psihološkog aspekta mogu da doprinesu interdisciplinarnom približavanju u razumevanju sindroma *burnout* na planu profesionalnog zdravlja i pronalaženju efektivnih preventivnih mera za njegovu prevenciju ili ublažavanje.

Cilj ove studije bio je da se ispitivanjem uticaja sindroma *burnout* na kvalitet života radnika prehrambene industrije u Nišu skrene pažnja istraživača u Srbiji na ovaj fenomen i da se utvrdi mogućnost primene inostranih standardizovanih upitnika na populaciju radnika ovog podneblja.

Metode

Ispitivanje pojave izgaranja na radnom mestu i njegov uticaj na kvalitet života sprovedeno je u Zavodu za zdravstvenu zaštitu radnika kod 514 radnika prehrambene industrije niškog regiona u periodu od januara 2008. do februara 2009.

godine. Od ukupnog broja ispitivanih radnika njih 489 (95%) uredno je odgovorilo na sva postavljena pitanja, dok je 25 (5%) dobijenih upitnika bilo neupotrebljivo za validnu analizu. Prosečno vreme potrebno za odgovore na pitanja iz anketne bilo je 40 minuta. Učešće u ispitivanju bilo je dobrovoljno i anonimno, a obavljeno je uz pomoć odgovornog lica za humane resurse i odobrenje uprave radnih organizacija u kojim su ispitanici zaposleni.

Za sve ispitanike uključene u istraživanje formirani su posebni anketni upitnici: upitnik o izgaranju (*Copenhagen Burnout Inventory* – CBI) i skala za procenu kvaliteta života (*Comprehensive Quality of Life Scale – adult: Fifth edition* – ComQoL-A5).

Upitnik o izgaranju na radnom mestu (CBI) je specifični instrument Nacionalnog instituta za profesionalno zdravlje u Kopenhagenu razvijen 2005. godine⁶. Ovaj upitnik je opšti – generički instrument (primena nije ograničena na pojedine profesije ili tipove zanimanja), koncipiran za procenu ličnog burnout-a u vezi sa poslom, kao i burnout-a zbog rada sa klijentima, potrošačima ili bolesnicima. Sastoji se od 19 pitanja sa pet ponuđenih mogućnosti za odgovor, raspoređenih u tri dela koja se odnose na lično izgaranje (6 pitanja), izgaranje u vezi sa poslom (7 pitanja) i izgaranje zbog rada sa potrošačima (6 pitanja). Pojedine skale iz CBI mogu se koristiti nezavisno, u skladu sa ispitivanom populacijom. Ponuđeni odgovori gradirani su po Likert skali. Sve skale imaju vrednost od 0 do 100 poena. Visoka vrednost skora označava veliko prisustvo izgaranja. Srednja vrednost svih skala označava prisustvo izgaranja kao malo, ako je manje od 50 poena (< 50) i kao visoko, ako je preko 50 poena^{6, 12-14}. U ovom istraživanju koristili smo delove upitnika za lično izgaranje i izgaranje u vezi sa radom, a treća supskala upitnika za izgaranje zbog rada sa potrošačima nije primenjena jer su anketirani radnici pripadali sektoru proizvodnje, a ne uslužne delatnosti.

Skala za procenu kvaliteta života – *Comprehensive Quality of Life Scale* (ComQoL) je standardizovan merni instrument za procenu globalnog kvaliteta života australijskog autora, Robert A. Cummins-a, profesora sa Fakulteta za psihologiju Deakin Univerziteta u Melburnu. Skala je napravljena 1991. godine u tri paralelne forme namenjene za istraživanje kvaliteta života u opštoj populaciji odraslih (ComQoL – A), u populaciji osoba sa intelektualnim i drugim kognitivnim poremećajima (ComQoL – I) i populaciji adolescenata (ComQoL – S). U ovom istraživanju korišćena je peta edicija skale za procenu kvaliteta života iz 1997. godine (ComQoL-A5). Ovaj instrument bazira se na sledećim tvrdnjama: kvalitet života sastoji se iz objektivne i subjektivne komponente,

a obe komponente sastoje se iz 7 domena: materijalno blagostanje, zdravlje, produktivnost, odnosi sa porodicom i prijateljima, sigurnost, osećaj pripadanja zajednici i emocionalno blagostanje. Tako se i u upitniku svaki od ovih sedam domena tretira jednim pitanjem kroz tri sekcije: sadašnje stanje, važnost i zadovoljstvo svakim od domena. U upitniku su ponuđeni odgovori gradirani po Likert skali sa mogućim rasponom poena od 0 do 100. Prema datim obrascima dobijene vrednosti prevode se u skorove za objektivni i subjektivni kvalitet života kao procenat maksimalne vrednosti skale (% SM). Zbir vrednosti iz prve sekcije označava skor za objektivnu komponentu kvaliteta života. Suma proizvoda skora iz sekcija važnosti i zadovoljstva svakim od domena predstavlja subjektivnu komponentu kvaliteta života. Na osnovu do sada obavljenih istraživanja povoljnim standardom se smatraju vrednosti 70–80% SM¹⁵⁻¹⁷.

Analiza pouzdanosti skala za merenje izgaranja i kvaliteta života vršena je izračunavanjem Cronbach α koeficijenta unutrašnje konzistentnosti činilaca skala. Kao donja granica prihvatljive pouzdanosti skala određena je vrednost koeficijenta od 0,60, a kao gornja granica visoke pouzdanosti, vrednost koeficijenta od 0,70¹⁵. Izračunavanje skorova za važnost i zadovoljstvo pojedinim aspektima života i skora subjektivnog kvaliteta života kao proizvoda ova dva skora vršeno je prema preporukama Univerziteta Deakin¹⁶. Za procenu uticaja izgaranja na poslu na pokazatelje kvaliteta života korišćena je linearna regresiona analiza. Izračunati su i prikazani koeficijenti linearne regresije (B) i njihovi 95% intervali poverenja (95% IP). Statistička značajnost koeficijenata regresije proveravana je Studentovim *t* testom. Vrednosti koeficijenata predstavljaju promene u skorovima zavisno promenljivih uzrokovane promenama vrednosti skora izgaranja na poslu za 1. U svim analizama kao granica statističke značajnosti podrazumevana je greška procene od 0,05 ili 5%. Proračuni su vršeni primenom S-PLUS računarskog programa, verzija 2000.

Rezultati

Vrednosti Cronbach α koeficijenata ukazuju na visoku pouzdanost skala za merenje ličnog izgaranja (0,87), izgaranja na poslu (0,86) i subjektivnog kvaliteta života (0,83).

Glavne epidemiološke karakteristike ispitanika i ukupne vrednosti skorova za pojavu izgaranja prikazane su u tabeli 1. Ispitivanje je obavljeno na 489 radnika prehrambene industrije prosečne starosti 45 (25–57) godina, 262 (53,6%) muškarca i 227 (46,4%) žena. Analiza podataka dobijenih upitnikom za lično izgaranje i izgaranje u vezi sa radom ukazuje na poveća-

Tabela 1

Karakteristike ispitanika i pojava izgaranja (<i>burnout</i>)			
Karakteristike ispitanika	n	%	Srednja vrednost (min–max)
Starost (god)	489	100	45,0 (25,0–57,0)
Pol			
muški	262	53,6	
ženski	227	46,4	
Izgaranje			
lično izgaranje	489	100	60,0 (8,3–100,0)
izgaranje na radnom mestu	489	100	67,9 (10,7–85,7)

ne vrednosti skorova kako za pojavu ličnog izgaranja (60,0) tako i za izgaranje na radnom mestu (67,9). Kao najvažnije odrednice za kvalitetan život u odnosu na to koliko im je šta važno i koliko su time zadovoljni u životu ispitanici su naveli odnose sa porodicom i prijateljima (10,8), zdravlje (9,1) i osećaj sigurnosti (8,0). Produktivnost (6,8), emocionalno blagostanje (6,6) i materijalna dobra (4,5) imaju manji uticaj na kvalitet života ispitanika u ovoj studiji (tabela 2).

Regresiona analiza pokazala je da je povećano izgaranje na poslu statistički značajno povezano sa umanjnjem važnosti zdravlja, bliskih odnosa sa porodicom i prijateljima, kao i važnosti pripadanja zajednici. Nasuprot ovome, povećano izgaranje na poslu značajno je povezano sa porastom važnosti materijalnih dobara i emocionalnog blagostanja. Svako povećanje skora za izgaranje na poslu za 1 statistički je značajno povezano sa padom vrednosti skorova važnosti: zdravlja za 0,006, bliskih odnosa sa porodicom i prijateljima za 0,011 i pripadanja zajednici za 0,008, dok je svako povećanje skora za izgaranje na poslu za 1 statistički značajno povezano sa porastom vrednosti skorova važnosti emocionalnog i materijalnog blagostanja za 0,005. Statistički zna-

čajna povezanost izgaranja na poslu i važnosti produktivnosti i sigurnosti nije potvrđena. Povećano izgaranje na poslu povezano je i sa opadanjem zadovoljstva zdravljem, produktivnošću, odnosima sa porodicom i prijateljima, sigurnošću, osećanjem pripadanja zajednici i emocionalnim blagostanjem. Svako povećanje skora za izgaranje na poslu za 1 statistički je značajno povezano sa padom vrednosti skorova indikatora zadovoljstva zdravljem za 0,016, produktivnošću za 0,005, odnosima sa porodicom i prijateljima za 0,006, sigurnošću za 0,008, osećanjem pripadanja zajednici za 0,016 i emocionalnim blagostanjem za 0,007.

Značajna povezanost između zadovoljstva materijalnim dobrima i profesionalnog izgaranja nije potvrđena. Porast skora za izgaranje na poslu za 1 statistički je značajno povezan sa opadanjem interskorova za subjektivni kvalitet života u domenu zdravlja ($B = -0,097$), odnosom sa porodicom i prijateljima ($B = -0,048$), sigurnosti ($B = -0,061$) i osećanjem pripadanja zajednici ($B = -0,105$). Nije dokazana statistički značajna povezanost između skora za izgaranje na poslu i interskorova za subjektivni kvalitet života u domenima produktivnosti, materijalnog i emocionalnog blagostanja (tabela 3).

Tabela 2

Vrednosti interskorova pokazatelja važnosti, zadovoljstva i subjektivnog kvaliteta života

Indikator	Srednja vrednost (min-max)		
	Važnost (V)	Zadovoljstvo (Z)	Subjektivni kvalitet života (V × Z)
Materijalna dobra	3,6 (2,0 do 5,0)	4,6 (3,0 do 6,0)	4,5 (-10,0 do 15,0)
Zdravlje	4,5 (2,0 do 5,0)	5,1 (3,0 do 7,0)	9,1 (-10,0 do 20,0)
Produktivnost	4,0 (3,0 do 5,0)	4,8 (1,0 do 7,0)	6,8 (-16,0 do 16,0)
Odnosi sa porodicom i prijateljima	4,5 (3,0 do 5,0)	5,4 (3,0 do 7,0)	10,8 (-6,0 do 20,0)
Sigurnost	4,2 (3,0 do 5,0)	5,0 (1,0 do 6,0)	8,0 (-20,0 do 15,0)
Osećaj pripadanja zajednici	3,8 (2,0 do 5,0)	4,9 (1,0 do 7,0)	7,2 (-16,0 do 20,0)
Emocionalno blagostanje	3,9 (2,0 do 5,0)	4,8 (1,0 do 7,0)	6,6 (-16,0 do 20,0)

Tabela 3

Uticaj izgaranja na poslu na interskorove za važnost, zadovoljstvo i subjektivni kvalitet života

Skor indikatora	B	Granice 95% IP za B*		t	p
		donja	gornja		
Važnost					
materijalna dobra	0,005	0,002	0,009	2,990	0,003
zdravlje	-0,006	-0,010	-0,002	3,032	0,003
produktivnost	0,001	-0,002	0,004	0,589	n.s.
odnosi sa porodicom i prijateljima	-0,011	-0,014	-0,008	7,469	< 0,001
sigurnost	-0,001	-0,006	0,000	1,684	n.s.
osećaj pripadanja zajednici	-0,008	-0,012	-0,004	3,698	< 0,001
emocionalno blagostanje	0,005	0,001	0,009	2,376	0,018
Zadovoljstvo					
materijalna dobra	-0,002	-0,007	0,002	0,972	n.s.
zdravlje	-0,016	-0,020	-0,012	7,954	< 0,001
produktivnost	-0,005	-0,010	-0,001	2,305	0,022
odnosi sa porodicom i prijateljima	-0,006	-0,010	-0,002	2,915	0,004
sigurnost	-0,008	-0,013	-0,003	2,972	0,003
osećaj pripadanja zajednici	-0,016	-0,022	-0,010	5,600	< 0,001
emocionalno blagostanje	-0,007	-0,012	-0,001	2,477	0,014
Subjektivni kvalitet života (V × Z)					
materijalna dobra	-0,022	-0,052	0,007	1,483	n.s.
zdravlje	-0,097	-0,123	-0,071	7,404	< 0,001
produktivnost	-0,017	-0,043	0,009	1,287	n.s.
odnosi sa porodicom i prijateljima	-0,048	-0,069	-0,026	4,355	< 0,001
sigurnost	-0,061	-0,095	-0,028	3,648	< 0,001
osećaj pripadanja zajednici	-0,105	-0,137	-0,072	6,333	< 0,001
emocionalno blagostanje	-0,028	-0,063	0,007	1,566	n.s.

*Studentov t-test

Diskusija

Iako je zdravlje prihvaćeno kao kompletno fizičko, mentalno i socijalno blagostanje, tradicionalni medicinski model o „bolesnom zdravlju“ primenjivan je u većini dosadašnjih istraživanja u medicini rada¹⁸. Tako je, uprkos velikom broju istraživanja o uticaju plaćenog rada na zdravlje zaposlenih, ostalo malo poznato kako transformacija odnosa i promena prirode na današnjem tržištu radne snage utiče na lično blagostanje zaposlenih. Ipak, „moderne“ profesionalne bolesti, psihološki stres, nespecifični poremećaji muskuloskeletnog sistema, suptilne psihosocijalne interakcije između motivacije i percepcije radne (ne)spособnosti, kao i izrada validnih instrumenata za detekciju ovih pojava, sve više postaju predmet interesovanja istraživača u ovoj oblasti¹⁹. Savremena istraživanja u oblasti medicine rada i profesionalne zdravstvene psihologije fokusiraju se na psihološki posredovane interakcije između psihosocijalnih uslova radne sredine i zdravlja. Negativna društvena događanja izražena kroz tranziciju, privatizaciju, globalizaciju i kompeticiju na globalizovanom svetskom tržištu privrede, nesumnjivo utiču na heterogenost mentalnog i psihosocijalnog stresa. Profesionalni mentalni i psihosocijalni stres izražen je kroz vremensko ograničenje, prekovremeni rad i smenski rad, mobing, ekonomske pritiske, višestruke uloge na poslu, u porodici i drugim aktivnostima. Rad u novoj ekonomiji podrazumeva identifikaciju sa poslom, doživotno sticanje novih veština čime generiše stres i *burnout*, iscrpljuje zaposlene i umanjuje kvalitet njihovog života¹. Tako *burnout* sve više postaje duhovni problem – kriza značenja i svrhe života i promena dotadašnjih sistema vrednosti²⁰. Na to ukazuju rezultati brojnih multidisciplinarnih studija u svetu^{21–25}. U Švedskoj se izgaranje na radnom mestu nalazi na zvaničnoj listi bolesti^{18,26}.

Izgaranje na radnom mestu ima za posledicu odsustvovanje sa posla. Istraživanja ove pojave u Holandiji dokazuju da je fenomen *burnout* izražen kod 4–7% zaposlenih, a kod specifičnih profesija i do 10%. Pravu sliku o takvoj rasprostranjenosti stičemo ako procenite izrazimo brojem, a to je između 250 000 i 440 000 zaposlenih. Ispitivanja radnih uslova u Španiji ukazuju na visok nivo profesionalnog stresa (48%) i sugerišu značaj *burnout*-a s obzirom na etiološku korelaciju⁸.

Naše istraživanje kod proizvodnih radnika u prehrambenoj industriji ukazuje na visoko prisustvo *burnout*-a kako ličnog, tako i profesionalnog. O povezanosti pojave ličnog i izgaranja na radnom mestu sa pogoršanjem zdravlja izveštavaju mnogi autori širom sveta^{27–29}. Lično ili opšte izgaranje odnosi se na stepen fizičke i psihološke iscrpljenosti bez obzira na profesionalni status, a u ovom istraživanju navedeno je zbog uvida i značajnosti ovog fenomena imajući u vidu reperkusije psihosocijalnih uslova radne sredine na način života zaposlenih³⁰. Prilikom istraživanja psihosocijalnih uslova na radu u grupi od 32 različite profesije kod 1 858 danskih radnika, Kristensen⁵ nalazi manji nivo profesionalnog stresa (22) u kategoriji uticaja na poslu za zaposlene u prehrambenoj industriji. U nacionalnom istraživanju na 3 276 finskih radnika, starosti između 30 i 64 godine prisustvo *burnout*-a, definisanog kao

iscrpljenost, osećaj nenadležnosti i smanjenje korisnosti svog rada, nađeno je kod 25% zaposlenih od čega je 2,3% imalo veoma visok stepen *burnout*-a^{8,19}.

U etiologiji *burnout*-a važnu ulogu imaju i osobine samog zaposlenog. Studija sprovedena u Holandiji, u grupi od 527 zaposlenih, od kojih 338 menadžera u Telekomu i 111 proizvodnih radnika u prehrambenoj industriji, dokazuje da izgaranje na poslu može zavisiti od karakteristika ličnosti i njihovog temperamenta. Izgleda da je neurotizam glavni uzrok *burnout*-a, polazeći od činjenice da je nivo ekstrovertnosti, fleksibilnost i sposobnost adaptacije na promene u radnoj sredini, bitan preduslov uspešnog obavljanja radnih obaveza³¹. Takođe, utvrđeno je da je iscrpljenost koja je u korelaciji sa anksiozno-depresivnim poremećajima predisponirana genetičkim i individualnim faktorima³². Dokazana je i negativna korelacija između stepena samopoštovanja i *burnout*-a, kao i da osobe sa eksternim lokusom kontrole imaju viši stepen izgaranja. Iz tog razloga mnogi istraživači ističu važnost samefikasnosti u teoriji *burnout*-a. Pod samefikasnošću se podrazumeva lično uverenje zaposlenog da poseduje kapacitet kojim može da utiče na performanse posla, što se izražava kroz produktivnost³³.

Cilj brojnih studija sprovedenih zadnjih godina u skandinavskim zemljama bio je da se ispita uticaj *burnout*-a na zdravlje radnika, odnosno mentalne poremećaje, bolesti mišićnokoštanog i kardiovaskularnog sistema kao grupe koje su najčešći uzroci radne nesposobnosti^{34–39}. Pronađena je pozitivna korelacija između nivoa *burnout*-a i prevalencije anksiozno-depresivnog poremećaja, i povećane upotrebe alkohola i kod muškaraca i kod žena^{32,42}. *Burnout* je, takođe, povezan i sa pojavom muskuloskeletnih oboljenja kod žena⁴⁰ i kardiovaskularnih bolesti kod muškaraca bez obzira na sociodemografske karakteristike, fizičke zahteve posla, zdravstveno ponašanje i simptome depresije¹⁹. Kod radnika starosti iznad 30 godina zastupljenost *burnout*-a u pozitivnoj je korelaciji sa godinama života. Postoji tendencija višeg skora *burnout*-a kod žena nižeg edukacionog i profesionalnog statusa⁴¹ i neoženjenih muškaraca³⁹. U studijama sprovedenim u Finskoj i Švedskoj kod radno aktivnog stanovništva *burnout* je više izražen kod žena starijih od 50 godina i to u neproizvodnim delatnostima^{40–42}. Interesantno je, takođe, da je kod radnika sa visokim stepenom *burnout*-a, izraženog kao fizička i mentalna iscrpljenost, utvrđena povišena koncentracija biomarkera zapaljenja u krvi (C-reaktivni protein i fibrinogen)⁴³. U populaciji norveških radnika starosti između 39–45 i 54–65 godina *burnout* je u vezi sa povećanim rizikom od obolevanja od infarkta miokarda⁴⁴.

Uticaj *burnout*-a na kvalitet života radnika bio je predmet interesovanja manjeg broja istraživača za razliku od onih koji su pokazali interesovanje za uticaj profesionalnog stresa na kvalitet života. Naša interesovanja bila su usmerena u prvom navedenom pravcu. U tom smislu korišćene su sekcije upitnika za procenu subjektivnog kvaliteta života. Većina istraživanja na polju kvaliteta života fokusiraju se na dve bazične metodologije merenja, izdvajanjem objektivnog i subjektivnog kvaliteta života. Prvi metod koristi kvantitativne pokazatelje za procenu onoga što ljudi pose-

duju (zdravlje, obrazovanje, prihodi, bračno stanje), dok subjektivni pokazatelji služe za procenu onoga što ljudi doživljavaju (zadovoljstvo, uspeh, značenje). Tako objektivni kvalitet života čini ispunjenje društvenih i kulturalnih normi za materijalnim dobrima, društvenim statusom i fizičkim blagostanjem. Subjektivni kvalitet ili subjektivno blagostanje tiče se dobrog osećanja i zadovoljstva stanjem stvari, uopšte, i ima veliku važnost za merenje kvaliteta života. Bitni aspekti života ne odražavaju se direktno, već se najpre prelamaju kroz prizmu subjektivnosti, pa je jasno da se važnost svake dimenzije i zadovoljstvo njome razlikuje od ličnosti do ličnosti. To znači da, ako je osoba nezadovoljna nekim životnim područjem kome pridaje manji značaj, još uvek može imati globalno kvalitetan život. Nezadovoljstvo aspektom od velike važnosti za individuu, međutim, bitno doprinosi sniženju kvaliteta života u celini. Zato je prepoznavanje subjektivnosti kvaliteta života ključno za razumevanje ovakvog pristupa^{16, 45-47}. Savremeni istraživači kvaliteta života ističu da se objektivni pokazatelji kvaliteta života, baziraju na iskustvu i subjektivnim asocijacijama ispitanika, čime je razlikovanje subjektivnih i objektivnih indikatora donekle iluzorno⁴⁸.

Našim ispitanicima za kvalitetan život bilo je najznačajnije zdravlje, odnosi u porodici i sa prijateljima i osećaj sigurnosti, dok su materijalna dobra i produktivnost označili manje značajnim. Međutim, rezultati ovog istraživanja dokazali su da *burnout* značajno menja važnost označenih obeležja, materijalna dobra dobijaju na važnosti, porodica i zdravlje postaju manje važni, te se ishod može naslutiti. Detaljnijim istraživanjima ove pojave u svetu dokazano je da *burnout* ne ugrožava samo zdravlje radnika već ozbiljno utiče i na produktivnost i ugled radnih organizacija u kojima oni rade, tim pre što ono ima karakteristike epidemije, brzo se prenosi od jednog na druge radnike^{49, 50}.

U istraživanju sprovedenom radi validnosti CBI na Novom Zelandu i uticaju *burnout*-a na subjektivno blagostanje, utvrđena je negativna korelacija između *burnout*-a i ličnog blagostanja. U istoj studiji autori ističu neophodnost daljeg istraživanja radi identifikacije drugih institucionalnih ili ličnih faktora koji nisu prepoznati, a mogu biti u osnovi ovakve korelacije^{51, 52}. U tom smislu, visok nivo lič-

nog izgaranja u našem istraživanju koji se u krajnjoj liniji odnosi i na izgaranje zbog opšteg životnog stresa može imati značajan uticaj na percepciju kvaliteta života kod naših ispitanika.

Kada je u pitanju pojava izgaranja i kvalitet života radnika u literaturi se nalaze vrlo sadržajni kritički osvrti autora na sve do sada izrađene upitnike u svetu sa konkretnim preporukama za buduća istraživanja^{8, 46, 53}. To je uticalo na naš izbor upitnika^{6, 15} za ovu pilot studiju koje smo preveli na srpski jezik i kao takve koristili. Dokazana visoka pouzdanost skala za merenje ličnog izgaranja, izgaranja na poslu (CBI) i subjektivnog kvaliteta života (ComQoL-A5) mogu biti od značaja za istraživanja koja slede jer posedujemo gotove, validne instrumente za merenje ovih pojava, a verujemo i za istraživanja drugih autora u Srbiji koje želimo ovim putem da iniciramo.

Zaključak

Kod proizvodnih radnika u prehrambenoj industriji postoji visoko prisustvo *burnout*-a kako ličnog, tako i na radnom mestu. Dokazana je negativna korelacija između *burnout*-a i subjektivne procene kvaliteta života što može imati ozbiljne posledice po zdravlje ovih radnika, ali i produktivnost njihovih kompanija. Ovo smatramo dobrim izazovom za buduća, sveobuhvatnija, multidisciplinarna istraživanja u Srbiji pri čemu se upitnici koje smo koristili (CBI i Com QoLA5) mogu smatrati validnim instrumentima za ispitivanje ove pojave. U svemu tome, naravno, ne bi trebalo da izostane ni interesovanje šire zajednice zbog značajnog finansijskog i socijalnog efekta *burnout*-a koji proizilazi iz (ne)zadovoljstva zaposlenih radnim mestom i njegovih posledica na fizičko i psihičko zdravlje zaposlenih.

Zahvalnica

Rad je objavljen zahvaljujući Ministarstvu za nauku i tehnološki razvoj Srbije (projekat br. 21016: Uvođenje i razvoj koherentnog angažmana svih privrednih grana i njihovih radnika u promociju zdravlja na radnom mestu, etiku i kvalitet života kao uslov za njihov razvoj).

L I T E R A T U R A

1. Weber A, Jaekel-Reinhard A. Burnout syndrome: a disease of modern societies? *Occup Med* 2000; 50(7): 512-7.
2. Freudenberger HJ. Staff burnout. *J Soc Issues* 1974; 30(1): 159-65.
3. Maslach C, Jackson SE. The measurement of experienced burnout. *J Occup Behav* 1981; 2(2): 99-113.
4. Sonnentag S. Burnout research: adding an off-work and day-level perspective. *Work & Stress* 2005; 19(3): 271-5.
5. Kristensen TS. A new tool for assessing psychosocial factors at work: the Copenhagen psychosocial questionnaire. *TUTB Newsletter* 2002; 19-20: 45-7.
6. Kristensen TS, Borritz M, Villadsen E, Christensen KB. The Copenhagen burnout inventory: a new tool for the assessment of burnout. *Work & Stress* 2005; 19: 192-207.
7. Barrick KR. Burnout and job satisfaction of vocational supervisors. *JAE* 1989; 30(4): 35-41.
8. Salanova M, Llorens S. Current state of research on burnout and future challenges. *Papeles del Psicólogo* 2008; 29(1): 59-67.
9. Dyrbye LN, Thomas MR, Massie FS, Power DV, Eacker A, Harper W, et al. Burnout and suicidal ideation among U.S. medical students. *Ann Intern Med* 2008; 149(5): 334-41.
10. Dedić G. Professional burnout. *Vojnosanit Pregl* 2005; 62(11): 851-5. (Serbian)
11. Kompier M. The psychosocial work environment and health-what do we know and where should we go? *Scand J Work Environ Health* 2002; 28(1): 1-4.
12. Hutchinson JR, White SG, McBrook D. The intersection between caregiver responsibilities and work demands among public sector employees. Virginia: Commonwealth University Richmond; 2007.
13. Kristensen TS. The soft guidelines of NIOH, Copenhagen. How to go from survey to action. Eighth International Congress of Behavioral Medicine. Integrating Social and Behavioral Sciences with Medicine and Public Health; 2004 Aug 25-28; Germany,

- Mainz [cited 2005 November 18]. Available from: www.ami.dk/presentations
14. *Borritz M, Rugulies R, Christensen KB, Villadsen E, Kristensen TS.* Burnout as a predictor of self-reported sickness absence among human service workers: prospective findings from three year follow up of the PUMA study. *Occup Environ Med* 2006; 63(2): 98–106.
 15. *Cummins RA.* Comprehensive quality of life scale for adults. 5th ed. Melbourne: School of Psychology Deakin University; 1997.
 16. *Cummins RA.* Beyond Rural Health to Well-Being: An Appraisal of the Comprehensive Quality of Life Scale. 5th ed. 5th National Rural Health Conference; 1999 March 14-17. South Australia: Adelaide; 1999.
 17. *Chia-Huei W, Grace Y.* Do we need to weight satisfaction scores with importance ratings in measuring Quality of life? *Soc Indic Res* 2006; 78: 305–26.
 18. *Shirom A.* Reflections on the study of burnout. *Work & Stress* 2005; 19(3): 263–70.
 19. *Abola K, Honkonen T, Virtanen M, Kivimäki M, Isometsä E, Aromaa A,* et al. Interventions in relation to occupational burnout: the population-based health 2000 study. *J Occup Environ Med* 2007; 49(9): 943–52.
 20. *Wright SG.* Burnout: a spiritual crisis. A nursing standard essential guide. Harrow: RCN Publishing; 2005.
 21. *Ilmarinen J, Tuomi K, Eskelinen L, Nygård CH, Huuhtanen P, Klockars M.* Background and objectives of the Finnish research project on aging workers in municipal occupations. *Scand J Work Environ Health* 1991; 17(suppl 1): 7–11.
 22. *Van Den Bossche S, Houtman I.* Impact of Changing Social Structures on Stress and Quality of Life: Individual and Social perspectives. Longitudinal quantitative study on long term absent employees: Netherlands. TNO Work and Employment. HPSE-CT 2002-00110 [cited 2006 august]. Available from: <http://surrey.ac.uk/Psychology/stress-impact/>.
 23. *Tsutsumi A, Kawakami N.* A review of empirical studies on the model of effort-reward imbalance at work: reducing occupational stress by implementing a new theory. *Soc Sci Med* 2004; 59(11): 2335–59.
 24. *Godin I, Kittel F.* Differential economic stability and psychosocial stress at work: associations with psychosomatic complaints and absenteeism. *Soc Sci Med* 2004; 58(8): 1543–53.
 25. *Zapf D, Seifert C, Schmutte B, Mertini H, Holz M.* Emotion work and job stressors and their effects on burnout. *Psychology & Health* 2001; 16(6): 527–45.
 26. *Bakker B, Demerouti E, Schaufeli WB.* The socially induced burnout model. In: *Shohov SP*, editor. *Advances in psychology research* New York: Nova Science Publishers 2003; 25: 13–30.
 27. *Tuomi K, Huuhtanen P, Nykyri E, Ilmarinen J.* Promotion of work ability, the quality of work and retirement. *Occup Med* 2001; 51(5): 318–24.
 28. *Soren VG, Trine FM, Niels JA, Michael N, Morad M, Joav M.* Global Quality of life (QOL), health and ability are primarily determined by our consciousness. Research findings from Denmark 1991-2004. *Soc Indicator Res* 2005; 71: 87–122.
 29. *Korhonen T, Ketola R, Toivonen R, Luukkainen R, Hakkanen M, Viikari-Juntura E.* Work related and individual predictors for incident neck pain among office employees working with video display units. *Occup Environ Med* 2003; 60: 475–82.
 30. *Yeh WY, Cheng Y, Chen CW, Chen CJ.* Effects of pay systems on employees' burnout and physical health complaints by gender and employment grade. Oral presentation in the 134th annual meeting of the American Public Health Association (APHA). Boston, MA. 2006 November 4-8 [accessed 2009 February 12]. Available from: apha.confex.com/apha/134am/techprogram/paper
 31. *Langelaan S, Bakker AB, Lorenz J.P, Van Doornen LJP, Schaufeli WB.* Burnout and work engagement: Do individual differences make a difference? *Pers Individ Dif* 2006; 40(3): 521–32.
 32. *Middeldorp CM, Cath DC, Boosma DI.* A twin-family study of the association between employment, burnout and anxious depression. *J Affect Disord* 2006; 90(1): 163–9.
 33. *Ioannou I, Kyriakides L.* Structuring a Model for the Determinants of Vocational Teacher Burnout. CCEAM Conference 2006 "Recreating Linkages between Theory and Praxis in Educational Leadership"; 2006 October 12-17. Nicosia, Cyprus; 2006.
 34. *Abola K, Honkonen T, Isometsä E, Kalimo R, Nykyri E, Koskinen S,* et al. Burnout in the general population. Results from the Finnish Health 2000 Study. *Soc Psychiatry Psychiatr Epidemiol* 2006; 41(1): 11–7.
 35. *Abola K, Honkonen T, Kivimäki M, Virtanen M, Isometsä E, Aromaa A,* et al. Contribution of burnout to the association between job strain and depression: the health 2000 study. *J Occup Environ Med* 2006; 48(10): 1023–30.
 36. *Abola K, Honkonen T, Isometsä E, Kalimo R, Nykyri E, Aromaa A,* et al. The relationship between job-related burnout and depressive disorders—results from the Finnish Health 2000 Study. *J Affect Disord* 2005; 88(1): 55–62.
 37. *Abola K, Honkonen T, Pirkola S, Isometsä E, Kalimo R, Nykyri E,* et al. Alcohol dependence in relation to burnout among the Finnish working population. *Addiction* 2006; 101(10): 1438–43.
 38. *Honkonen T, Abola K, Pertovaara M, Isometsä E, Kalimo R, Nykyri E,* et al. The association between burnout and physical illness in the general population – results from the Finnish Health 2000 Study. *J Psychosom Res* 2006; 61: 59–66.
 39. *Hallsten L, Josephson M, Torgén M.* Performance-based self-esteem. A driving force in burnout processes and its assessment. In *Arbete och hälsa [Work and Health]* 2005. Stockholm, Sweden: National Institute for Working Life; 2005: 4.
 40. *Miranda H, Viikari-Juntura E, Heistaro S, Heliovaara M, Riihimäki H.* A population study on differences in the determinants of a specific shoulder disorder versus nonspecific shoulder pain without clinical findings. *Am J Epidemiol* 2005; 161(9): 847–55.
 41. *Kalimo R, Pakkin K, Mutanen P, Toppinen-Tanner S.* Staying well or burning out at work: work characteristics and personal resources as long-term predictors. *Work Stress* 2003; 17(2): 109–22.
 42. *Lindblom KM, Linton SJ, Fedeli C, Bryngelsson IL.* Burnout in the working population: relations to psychosocial work factors. *Int J Behav Med* 2006; 13(1): 51–9.
 43. *Toker S, Shirom A, Shapira I, Berliner S, Melamed S.* The association between burnout, depression, anxiety, and inflammation biomarkers: C-reactive protein and fibrinogen in men and women. *J Occup Health Psychol* 2005; 10(4): 344–62.
 44. *Appels A, Schouten E.* Burnout as a risk factor for coronary heart disease. *Behav Med* 1991; 17(2): 53–9.
 45. *Lent W, Singley D, Sheu B, Gainor A, Brenner R, Treisman D,* et al. Social cognitive predictors of domain and life satisfaction: exploring the theoretical precursors of subjective well-being. *J Couns Psychol* 2005; 52(3): 429–42.
 46. *Netweli G, Blane D.* Quality of life in older ages. *Br Med Bull* 2008; 85(1): 113–26.
 47. *Patient perspectives and quality of life: early PT/ClinResNet outcomes. Oral presentation in the Combined section meeting; 2006 February 1-5; California; San Diego. Available from: www.slideworld.org/.../Family-Quality-of-Life-as-an-Outcome-Measure-of-Early-Intervention-ppt-84539*
 48. *Costanza R, Fisher B, Ali S, Beer C, Bond L, Boumans R,* et al. An integrative approach to quality of life measurement, research, and policy. *Surv Perspect Integr Environ Soc* 2008; 1(1): 11–5.
 49. *Cardano M, Costa G, Demaria M.* Social mobility and health in the Turin longitudinal study. *Soc Sci Med* 2004; 58(8): 563–74.
 50. *Bakker bB, Schaufeli WB, Sixma HJ, Bosveld W, van Dierendonck, D.* Patients demands, lack of reciprocity, and burnout: a five year longitudinal study among general practitioners. *J Organiz Behav* 2000; 21: 425–41.
 51. *Van Horn JE, Schaufeli WB, Taris TW.* Lack of reciprocity among teachers: validation of reciprocity indices and their relation to stress and well-being. *Work Stress* 2001; 15: 13–24.
 52. *Milfont TL, Denny ES, Ameratunga ES, Robinson E, Merry S.* Burnout and wellbeing: testing the Copenhagen burnout inventory in New Zealand teachers. *Soc Indic Res* 2008; 89: 169–177.
 53. *Daniels K.* Perceived risk from occupational stress: a survey of 15 European countries. *Occup Environ Med* 2004; 61(5): 467–70.

Primljen 18. VI 2009.
Revidiran 30. XI 2009
Prihvaćen 11. XII 2009.



Kvantitativna analiza dendritske krošnje velikih neurona zupčastog jedra cerebeluma čoveka

Quantitative analysis of dendritic branching pattern of large neurons in human cerebellum

Nebojša T. Milošević*, Dušan Ristanović*, Dušica L. Marić†,
Radmila Gudović†, Bojana Krstonošić†

*Univerzitet u Beogradu, Medicinski fakultet, Institut za biofiziku, Beograd, Srbija;
†Univerzitet u Novom Sadu, Medicinski fakultet, Zavod za anatomiju, Novi Sad, Srbija

Apstrakt

Uvod/Cilj. Zupčasto jedro (*nucleus dentatus*) predstavlja najudaljenije jedro cerebeluma i glavni je sistem za prenos informacija u malom mozgu. Do sada su dendritske krošnje četiri različite vrste velikih neurona zupčastog jedra proučavane uglavnom kvalitativno, bez kvantifikacije njihovih morfoloških svojstava. Cilj ove studije bio je da se testira kvalitativno uspostavljena hipoteza o postojanju različitih vrsta velikih neurona zupčastog jedra cerebeluma čoveka, na osnovu rezultata kvantitativne analize njihove dendritske krošnje. **Metode.** Serije horizontalnih preseka zupčastog jedra uzimane su sa mozgova leševa 15 odraslih muškaraca, bez dijagnostikovanih neuroloških oboljenja. Slike 189 Golgđi impregnisanih velikih neurona snimane su digitalnom kamerom povezanom sa optičkim mikroskopom. Dendritske krošnje digitalizovanih slika neurona analizirane su modifikovanim Šolovom i fraktalnom analizom. **Rezultati.** Izračunate vrednosti maksimalnog broja preseka (N_m), kritičnog radijusa (r_c) i fraktalne dimenzije (D) dendritske krošnje četiri vrste velikih neurona statistički su ocenjene i analizirane. Rezultati su pokazali da između četiri vrste velikih neurona postoji statistički značajna razlika ($p < 0,01$) bar u jednom parametru dendritske krošnje. **Zaključak.** Ova studija predstavlja prvu kvantitativnu analizu dendritske krošnje neurona zupčastog jedra cerebeluma čoveka. Hipoteza o postojanju četiri vrste neurona u ovom delu malog mozga čoveka uspešno je potvrđena.

Ključne reči:

mozak, mali; mozak, mali, jedra; anatomija; dendriti; neuroni.

Abstract

Background/Aim. Dentate nucleus (*nucleus dentatus*) is the most distant of the cerebellar nuclei and the major system for information transfer in the cerebellum. So far, dendritic branches of four different kinds of large neurons of dentate nucleus, have been considered mainly qualitatively with no quantification of their morphological features. The aim of the study was to test the qualitative hypothesis that the human dentate nucleus is composed of various types of the large neurons by quantitative analysis of their dendritic branching patterns. **Methods.** Series of horizontal sections of the dentate nuclei were taken from 15 adult human brains, free of diagnosed neurological disorders. The 189 Golgi-impregnated images of large neurons were recorded by a digital camera connected to a light microscope. Dendritic branching patterns of digitized neuronal images were analyzed by modified Sholl and fractal analyses. **Results.** The number of intersections (N_m), critical radius (r_c) and fractal dimension (D) of dendritic branching pattern for four types of the large neurons were calculated, statistically evaluated and analyzed. The results show that there is a significant difference between four neuronal types in one morphometric parameter at least. **Conclusion.** The present study is the first attempt to analyze quantitatively the dendritic branching pattern of neurons from the dentate nucleus in the human. The hypothesis that the four types of the large neurons exist in this part of human cerebellum is successfully supported.

Key words:

cerebellum; cerebellar nuclei; anatomy, cross-sectional; dendrites; neurons.

Uvod

Zupčasto jedro (*nucleus dentatus*) predstavlja najudaljenije lateralno jedro cerebeluma u obliku višestruko izvijane trake sive mase. Usklađujući informacije iz donjeg oli-

varnog kompleksa različitih delova moždanog stabla i kičmene moždine, sa izlaznim informacijama koje se iz kore malog mozga prenose isključivo preko Purkinjeovih ćelija, zupčasto jedro predstavlja glavni sistem za prenos informacija u malom mozgu¹.

Morfologija neurona zupčastog jedra detaljno je proučena u proteklih sto i više godina. Ispitivanje morfologije ovog dela malog mozga počelo je u XIX veku, kada su Sakoci² (1887) i Lugaro³ (1895) analizirali neurone zupčastog jedra čoveka. Ovi istraživači prvi su opisali dve morfološki različite vrste neurona u zupčastom jedru. Prva vrsta nazvana je malim neuronima, zbog njihovog malog tela, male dendritske krošnje i kratkih aksona. Suprotno prvoj vrsti, druga vrsta neurona odlikovala se velikim telom, velikom dendritskom krošnjom i dugim aksonima, te su logično nazvani velikim neuronima^{2,3}. U narednim godinama veliki broj studija neurona zupčastog jedra na raznim životinjskim vrstama i čoveku, potvrdile su postojanje dve opisane vrste nervnih ćelija⁴⁻¹⁰. Međutim, postoje morfološke studije neurona zupčastog jedra majmuna¹¹ i čoveka^{12,13} u kojima su opisane više od dve vrste neurona. Zajedničko za te studije je da su veliki neuroni klasifikovani u četiri različite vrste na osnovu geometrije i složenosti dendritske krošnje, kao i položaja neurona i njihovih aksona u zupčastom jedru.

U prethodnim studijama zupčastog jedra, neuroni su proučavani uglavnom kvalitativno, opisom oblika i veličine tela, oblika i veličine dendritskog polja, kao i složenosti dendritske krošnje. Nažalost, većina proučavanih morfoloških svojstava nije adekvatno kvantifikovana, a u nekim studijama u kojima je merena veličina tela i dendritskog polja različitih vrsta neurona zupčastog jedra^{5,6,8,11-13}, odgovarajuća statistička analiza dobijenih vrednosti nije izvedena. Štaviše, složenost dendritske krošnje korišćena je kao dopunski kriterijum u klasifikaciji velikih neurona¹¹⁻¹³, bez prikaza bilo kakvog parametra koji kvantifikuje ovo svojstvo neurona.

Cilj ove studije bio je da se izvrši kvantitativna analiza dendritske krošnje velikih neurona zupčastog jedra cerebeluma čoveka radi provere hipoteze o postojanju četiri vrste velikih neurona u ovom delu malog mozga čoveka. Kvantitativna analiza ovih neurona izvedena je korišćenjem dve moderne tehnike – modifikovanom Šolovom i fraktalnom analizom, budući da je dobro poznato da one najkvalitetnije ocenjuju dendritsku krošnju neurona¹⁴⁻¹⁶. Na kraju, statističkom analizom izračunatih vrednosti tri parametra dendritske krošnje neurona, potvrđena je hipoteza o postojanju četiri vrste velikih neurona u zupčastom jedru čoveka.

Metode

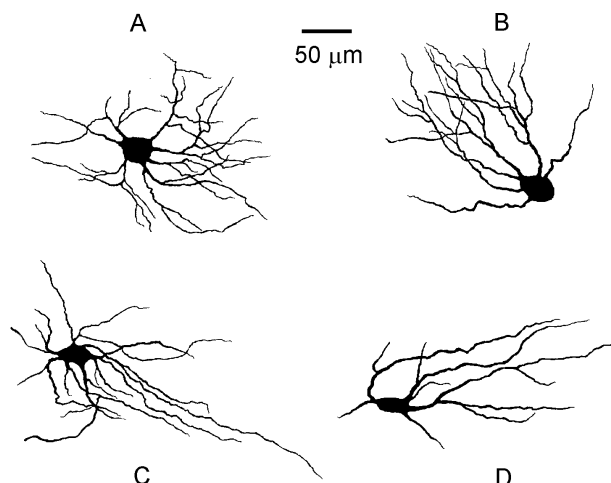
Materijal u ovoj studiji uzet je tokom autopsije mozga va leševa 15 osoba muškog pola, starosti od 40 do 60 godina, kod kojih nisu dijagnostikovana bilo kakva neurološka oboljenja. Interval starosti korišćenih mozgova izabran je zbog očuvanja karakteristične pigmentacione šeme mozga i eliminisanja mogućeg uticaja razvoja neurona na rezultate studije¹⁰. Materijal je prikupljan približno godinu dana i pripada zbirci Zavoda za anatomiju Medicinskog fakulteta u Novom Sadu.

Nakon uklanjanja mozga iz lobanje, cerebelum je seciran tako da su izdvajani rezovi zupčastog jedra debljine 2,5 cm. Ovi uzorci fiksirani su u 10% alkoholno-formalinskom rastvoru, impregnisani prema Kopš-Bubenajtovoj metodi, dehidratirani u alkoholu i kalupljeni u parafinu. Svaki uzorak

serijski je sečen na horizontalne rezove debljine 90 μm , postavljan na staklenu pločicu, očišćen ksilenom i prekriven odgovarajućim sredstvom.

Horizontalni rezovi analizirani su optičkim mikroskopom korišćenjem objektivu uvećanja 400x. Slike impregnisanih neurona snimane su pomoću digitalne kamere Leica DC 100 (Leica Mycosystem Wetzlar, GmbH, Wetzlar, Germany) uz upotrebu pratećeg kompjuterskog programa (Leica Mycosystem Wetzlar Ltd., Heereburg, Switzerland). Svaki neuron snimljen je u 4–7 optičkih slojeva u zavisnosti od njegovih dimenzija. Digitalizovane slike slojeva neurona učitane su u specijalizovani i javno dostupan program za obradu slike Image J (www.rs.b.nih.gov/ij). Pomoću potprograma „Z Project“ slike slojeva su rekonstruisane u finalnu sliku neurona, na kojoj su akson, *spine* i okolni artefakti uklonjeni korišćenjem alata istog programa.

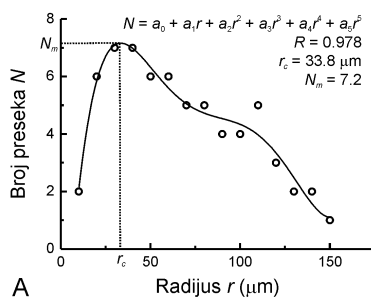
Na opisani način izdvojene su binarne slike 189 multipolarnih velikih neurona koji su klasifikovani u četiri grupe saglasno kriterijumima opisanim u literaturi^{12,13}. Reprezentativni primeri binarnih slika ovih neurona prikazani su na slici 1.



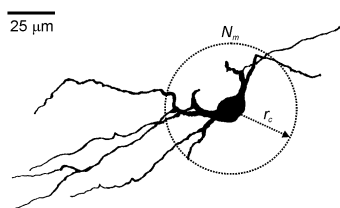
Sl. 1 – Primeri četiri vrste velikih neurona zupčastog jedra čoveka: A – centralni neuron, B – granični neuron, C – intermedijalni asimetrični neuron i D – intermedijalni vretenasti neuron.

Klasična Šolova analiza zasnovana je na konstruisanju sistema ekvidistantnih koncentričnih krugova, čiji se centri nalaze u geometrijskom centru tela neurona. Nakon toga izračunava se broj preseka dendrita sa svakim krugom u sistemu. Grafik zavisnosti logaritma broja preseka (N) od logaritma radijusa kruga (r) naleže na pravu liniju, čiji se koeficijent pravca koristi kao parametar kojim se upoređuju neuroni različitog oblika dendritske krošnje¹⁷.

Modifikovana Šolova analiza sastoji se u podešavanju zavisnosti N od r polinomom izabranog stepena. Na osnovu polinomne funkcije moguće je određivanje dva morfometrijska parametra: maksimalnog broja preseka (N_m) dendrita i kritičnog radijusa (r_c) od centra tela, na kome se nalazi maksimalan broj preseka. Ilustracija primene modifikovane Šolove analize prikazana je na slici 2, dok se detaljnije objašnjenje ove tehnike kvantitativne analize slike neurona nalazi u našoj



A



B

Sl. 2 – Ilustracija primene modifikovane Šolove analize na dvodimenzionalnu sliku neurona: A) Grafik zavisnosti broja preseka od radijusa kruga, usklađen sa polinomom petog stepena (gornji desni ugao). Simbolom R označen je koeficijent korelacije podešene funkcije, r_c je kritična vrednost funkcije $N(r)$ i N_m je maksimalna vrednost funkcije $N(r)$. B) Krug koji preseca binarnu sliku neurona iz zadnjih rogova kičmene moždine mačke¹⁶ ukazuje na mesto na kome se nalazi maksimalan broj preseka i udaljenost (r_c) od geometrijskog centra tela neurona

prethodnoj publikaciji¹⁶. Dva opisana parametra, koja se dobijaju modifikovanim Šolovom analizom, korišćena su u ovoj studiji za kvantifikaciju dendritske krošnje neurona.

Dok je modifikovana Šolova analiza dendritske krošnje izvršena na binarnim slikama neurona, fraktalna analiza neurona izvršena je na njihovim skeletonizovanim slikama „metodom brojanja kvadrata“. Skeletonizovana slika neurona dobijena je kada se sa binarne slike ukloni telo, a dendriti sažmu u linije širine jednog piksela. „Metod brojanja kvadrata“ zasniva se na prekrivanju slike neurona mrežom kvadrata, definisane dužine stranice (r), nakon čega se prebrojavaju kvadrati koji dodiruju ili seku dendrit (N). Promenom dužine stranice, tj. dimenzije mreže kvadrata, broj kvadrata menja se po inverznom stepenom zakonu. Logaritmovanjem inverznog stepenog zakona dobija se jednačina prave linije u kojoj vrednost koeficijenta pravca uzeta s pozitivnim znakom definiše fraktalnu dimenziju (D) analizirane slike neurona¹⁵.

Fraktalna analiza izvedena je korišćenjem programa Image J, pomoću potprograma „Fractal Box Count“. U analizi svake od slika neurona, dimenzije mreže kvadrata birane su, saglasno postojećem protokolu za izvođenje ove tehnike fraktalne analize¹⁸, prema geometrijskoj progresiji $2^1, 2^2, 2^3, \dots, 2^k$ piksela, gde je k vrednost za koju je broj kvadrata koji prekriva sliku jednak jedinici.

Statistička ocena izmerenih vrednosti maksimalnog broja preseka (N_m), kritičnog radijusa (r_c) i fraktalne dimenzije (D) dendritske krošnje zasnivala se na oceni karaktera populacije, tj. da li određen uzorak podleže normalnoj raspodeli ili ne. U slučaju normalno distribuisane populacije aritmetička sredina predstavlja meru centralne tendencije, dok standardna greška definiše meru disperzije podataka. U suprotnom slučaju, meru centralne tendencije određuje medijan, a meru disperzije, opseg varijabli.

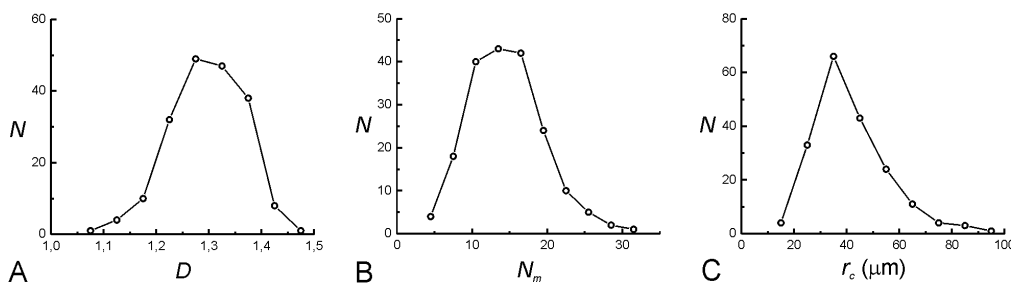
Ispitivanje statističke značajnosti razlike u merama centralne tendencije tri parametra u slučaju četiri različita uzorka (tj. vrste velikih neurona), takođe, zavisi od karaktera njihove distribucije. U slučaju normalno distribuisanih populacija, korišćene su tehnike i testovi parametrijske statistike, a u drugom slučaju, odgovarajuće tehnike neparametrijske statistike.

Rezultati

Da bismo prikazali i statistički analizirali rezultate kvantitativne analize dendritske krošnje neurona zupčastog jedra cerebeluma čoveka, ispitali smo karaktere distribucija tri morfolometrijska parametra dendritske krošnje: fraktalne dimenzije (D), maksimalnog broja preseka (N_m) i kritičnog radijusa (r_c). Na slici 3. prikazani su poligoni frekvencija ovih parametara u slučaju analiziranog uzorka neurona zupčastog jedra. Sa slike se jasno vidi da se raspodele sva tri parametra pokoravaju zakonima normalne distribucije, uz određen stepen iskošenosti (slike 3 A – C).

Saglasno prethodnoj oceni distribucija morfolometrijskih parametara dendritske krošnje, centralna tendencija i mera disperzije vrednosti ovih parametara, za svaku od četiri vrste neurona, opisana je srednjom vrednošću i standardnom greškom kao što je prikazano u tabeli 1. Da bi se ispitalo da li u skupu koji čine četiri uzorka podataka postoje parovi srednjih vrednosti koje se međusobno statistički značajno razlikuju, izvršena je jednodimenzionalna analiza varijanse.

Ovom statističkom procedurom dobijene su sledeće vrednosti (Fišerov test): $F = 15,01$ u slučaju parametra D , $F = 29,12$ za N_m i $F = 4,63$ za r_c . Iz tabele F raspodele za brojeve stepena slobode $n_1 = 3$ i $n_2 = 185$ pročitane su tablične vrednosti $F_{0,05} = 2,60$ i $F_{0,01} = 3,78$. Pošto su izračunate



Sl. 3 – Distribucije frekvencija fraktalne dimenzije D (A), maksimalnog broja preseka N_m (B) i kritičnog radijusa r_c (C) na uzorku od 189 velikih neurona zupčastog jedra čoveka

Tabela 1
Izračunate vrednosti fraktalne dimenzije (D), maksimalnog broja preseka (N_m) i kritičnog radijusa (r_c) velikih neurona zupčastog jedra čoveka

Vrsta velikih neurona zupčastog jedra čoveka	Broj neurona	D	N_m	r_c (μm)
Centralni (A)	45	$1,31 \pm 0,01$	$16,9 \pm 0,7$	36 ± 2
Granični (B)	53	$1,305 \pm 0,008$	$13,0 \pm 0,5$	46 ± 3
Intermedijalni asimetrični (C)	57	$1,319 \pm 0,006$	$16,8 \pm 0,6$	44 ± 1
Intermedijalni vretenasti (D)	34	$1,23 \pm 0,01$	$10,1 \pm 0,5$	39 ± 3

vrednosti za sva tri parametra bile veće od tabličnih vrednosti $F_{0,05}$ i $F_{0,01}$, zaključeno je da se oni statistički značajno razlikuju na nivou poverenja $p < 0,01$. To znači da se bar dve srednje vrednosti u slučaju tri parametra iz tabele 1 međusobno značajno statistički razlikuju.

Kako je broj uzoraka za svaku od četiri vrste neurona bio nejednak i analiza varijanse pokazuje da postoji statistička značajnost između njih, ne postoji jednostavan način da se utvrdi koji se parovi srednjih vrednosti značajno razlikuju. Jedan od načina koji se za ovakve prilike preporučuje jeste da se svi parovi srednjih vrednosti analiziraju pomoću Studentovog t -testa¹⁹. Rezultati primene t -testa na parove srednjih vrednosti tri morfometrijska parametra prikazani su u tabeli 2.

Tabela 2
Primena t -testa na parove srednjih vrednosti tri parametara iz tabele 1

Parovi	D	N_m	r_c (μm)
A – B	/	**	**
A – C	/	/	**
A – D	**	**	/
B – C	/	**	/
B – D	**	**	/
C – D	**	**	/

** - $p < 0,01$, / - ne postoji značajna razlika

A – centralni neuron, B – granični neuron, C – intermedijalni asimetrični neuron i D – intermedijalni vretenasti neuron

Primena t -testa na parove srednjih vrednosti fraktalne dimenzije (D) pokazala je da su intermedijalni vretenasti neuroni (vrsta D u tabeli 2) statistički značajno različiti od ostale tri vrste neurona. U slučaju maksimalnog broja preseka (N_m) jedino između srednjih vrednosti centralnih i intermedijalnih asimetričnih neurona nije pronađena značajna razlika (par A – C u tabeli 2). Na kraju, u slučaju parova srednjih vrednosti kritičnog radijusa (r_c) značajna razlika postojala je između centralnih i graničnih, kao i centralnih i intermedijalnih asimetričnih neurona (parovi A – B i A – C u tabeli 2).

Diskusija

Ova studija prikazuje kvantitativnu analizu dendritske krošnje velikih neurona zupčastog jedra čoveka. Od nekoliko postojećih tehnika kojima se definiše ovo svojstvo neurona^{17,20-22}, izabrali smo dve najpoznatije i najčešće korišćene: modifikovanu Šolovu i fraktalnu analizu. Modifikovana Šolova analiza donosi dva nova parametra dendritske krošnje neurona: maksimalni broj preseka dendrita sa sistemom koncentričnih krugova i kritični radijus koji odgovara ovom broju preseka. Dok prvi parametar predstavlja indirektnu meru gustine dendritske krošnje neurona, drugi parametar prikazuje rastojanje od centra tela na kome je maksimalna gustina dendritske krošnje. Da ova tehnika kvantitativne analize pruža kvalitetne rezultate, ukazuje naša ranija studija u kojoj je uspešno podržana hipoteza o različitoj strukturi neurona iz prvih šest lamina kičmene moždine mačke¹⁶. Osnovni parametar fraktalne analize predstavlja fraktalna dimenzija, koja se izračunava primenom različitih tehnika¹⁴. Vrednost fraktalne dimenzije direktno je proporcionalna stepenu složenosti dendritske krošnje neurona, odnosno njena vrednost zavisi od broja dendrita u krošnji, a najviše od izuvijanosti njihovih grana^{14,15,21}.

Aktuelne studije neurona zupčastog jedra čoveka ukazuju da postoje četiri morfološki različite vrste velikih neurona: centralni (poznati i pod imenom stelatni), granični, intermedijalni asimetrični (poznati kao anizodendritični) i intermedijalni vretenasti^{12,13}. Da između ovih vrsta postoji razlika u obliku tela i dendritskog polja, jasno ilustruje slika 1. Što se tiče njihovog položaja u zupčastom jedru, centralni i granični neuroni nalaze se, kao što im ime sugeriše, u centralnim i graničnim oblastima zupčastog jedra. Nasuprot njima, intermedijalni asimetrični i intermedijalni vretenasti neuroni raspoređeni su po svim oblastima jedra. Kada se kvalitativno analizira složenost dendritske krošnje, može se očekivati da intermedijalni vretenasti neuroni imaju najjednostavniju

vniju krošnju, dok je složenost krošnje ostalih vrsta neurona naizgled slična.

Međutim, naši rezultati kvantitativne i statističke analize jasno ukazuju na postojanje razlike između sve četiri vrste neurona. Kao što kvalitativna analiza sugeriše, intermedijalni vretenasti neuroni imaju najmanju gustinu krošnje i najmanji stepen izuvijanosti grana dendrita u odnosu na ostale tri vrste. Između graničnih i intermedijalnih asimetričnih neurona postoji jasna razlika u gustini krošnje, dok su im ostala dva merena svojstva slična. Sličan zaključak dobijen je analizom centralnih i intermedijalnih asimetričnih neurona: stepen izuvijanosti dendritskih grana i gustina krošnje ove dve vrste statistički su iste. Jasna razlika između njih postoji u rastojanju maksimalne vrednosti gustine krošnje od centra tela: maksimalna vrednost grananja dendrita centralnih neurona nalazi se bliže telu nego u slučaju intermedijalnih asimetričnih neurona. Na kraju, dendritske krošnje centralnih i graničnih neurona razlikuju se po gustini i rastojanju od tela, dok su im stepeni izuvijanosti grana dendrita slične.

Prema našim saznanjima ne postoji kvantitativna studija neurona zupčastog jedra čoveka, potpomognuta statističkom

ocenom izračunatih parametara. Ovo se posebno odnosi na dendritsku krošnju neurona. U našoj prethodnoj studiji ispitali smo pomoću fraktalne analize dendritsku krošnju šest vrsta neurona zupčastog jedra majmuna²³ i pronašli da od četiri vrste velikih neurona samo jedna ima značajno različitu krošnju od ostalih. S tim u vezi, ova kompleksna studija predstavlja napredak u poređenju sa prethodnim rezultatima, jer pokazuje da uvođenje još jedne tehnike kvantitativne analize veoma značajno utiče na dobijene rezultate i zaključke koji se iz njih formulišu.

Zaključak

Rezultati ove studije pokazuju da se tri parametra dendritske krošnje četiri vrste velikih neurona zupčastog jedra cerebeluma čoveka jasno međusobno razlikuju. To znači da je ovom studijom morfološka hipoteza o postojanju više vrsta neurona zupčastog jedra kvantitativno podržana. Na kraju, ova studija predstavlja dobar uvod u kompletnu kvantitativnu analizu neurona zupčastog jedra čoveka u kojoj mogu, osim dendritske krošnje, da se analiziraju i ostali delovi neurona koji su do sada samo kvalitativno izučavani.

L I T E R A T U R A

1. *Unisaari M, Obata K, Knöpfel T.* Morphological and electrophysiological properties of GABAergic and non-GABAergic cells in the deep cerebellar nuclei. *J Neurophysiol* 2007; 97: 901–11.
2. *Savcozzi A.* Sui nucleo dentato del cervelletto. *Riv Sper Fren Med Leg* 1887; 13: 9399.
3. *Lugaro E.* Sulla struttura del nucleo dentato del cervelletto nell'uomo. *Monit Zool It* 1895; 6: 5–12.
4. *Ramon y Cajal S.* Histologie du système nerveux de l'homme et des vertèbres. Paris: Maloine; 1911.
5. *Courville J, Cooper CW.* The cerebellar nuclei of macaca mulatta: a morphological study. *J Comp Neurol* 1970; 140(2): 241–54.
6. *Matsushita M, Iwahori N.* Structural organization of the interpositus and the dentate nuclei. *Brain Res* 1971; 35(1): 17–36.
7. *Larsell O, Jansen J.* The comparative anatomy and histology of the cerebellum. The human cerebellum, cerebellar connections, and the cerebellar cortex. Minneapolis: University of Minnesota Press; 1972.
8. *Chan-Palay V.* A light microscope study of the cytology and organization of neurons in the simple mammalian nucleus lateralis: columns and swirls. *Z Anat Entw Gesch* 1973; 141(2): 125–50.
9. *Sotelo C, Angaut P.* The fine structure of the cerebellar central nuclei in the cat. I. Neurons and neuroglial cells. *Exp Brain Res* 1973; 16(4): 410–30.
10. *Braak H, Braak E.* Morphological studies of local circuit neurons in the cerebellar dentate nucleus of man. *Hum Neurobiol* 1983; 2(2): 49–57.
11. *Chan-Palay V.* Cerebellar dentate nucleus: organization, cytology and transmitters. Berlin-Heidelberg-New York: Springer; 1977. pp. 548.
12. *Mihajlović P, Zečević N.* Development of the human dentate nucleus. *Human Neurobiol* 1986; 5(3): 189–97.
13. *Hayaran A, Wadhwa S, Bijlani V.* Cytoarchitectural development of the human dentate nucleus: a Golgi study. *Dev Neurosci* 1992; 14(3): 181–94.
14. *Fernandez E, Jelinek HF.* Use of fractal theory in neuroscience: methods, advantages, and potential problems. *Methods* 2001; 24(4): 309–21.
15. *Milošević NT, Ristanović D, Stanković JB, Nedeljkov V.* Morphometric analysis of neurons from the marginal and substantia gelatinosa layers of human spinal cord: classification according to laminar organization. *Vojnosanit Pregl* 2005; 62(2): 125–31. (Serbian)
16. *Ristanović D, Milošević NT, Stulić V.* Application of modified Sholl analysis to neuronal dendritic arborization of the cat spinal cord. *J Neurosci Methods* 2006; 158(2): 212–8.
17. *Sholl DA.* Dendritic organization in the neurons of the visual cortex and motor cortices of the cat. *J Anat* 1953; 87: 387–406.
18. *Jelinek HF, Milošević NT, Ristanović D.* Fractal dimension as a tool for classification of rat retinal ganglion cells. *Riv Biol* 2008; 101: 146–50.
19. *Alder HL, Roesler EB.* Introduction to probability and statistics. San Francisco: WH Freeman and Co; 1972.
20. *Schoenen J.* The dendritic organization of the human spinal cord: the dorsal horn. *Neurosci* 1982; 7: 2057–87.
21. *Smith TG, Lange GD, Marks WB.* Fractal methods and results in cellular morphology – dimensions, lacunarity and multifractals. *J Neurosci Methods* 1996; 69: 123–36.
22. *Jelinek HF, Cesar RM, Leandro JGG, Spence I.* Automated morphometric analysis of the cat retinal alpha/Y, beta/X and delta ganglion cells using wavelet statistical moment and clustering algorithms. *J Integr Neurosci* 2004; 3: 415–32.
23. *Milošević NT, Ristanović D, Gudović R, Rajković K, Marić D.* Application of fractal analysis to neuronal dendritic arborisation patterns of the monkey dentate nucleus. *Neurosci Lett* 2007; 427: 23–7.

Primljen 19. VI 2009.
Revidiran 25. IX 2009.
Prihvaćen 13. X 2009.



Brzo simultano određivanje organofosfornih pesticida u humanom serumu i urinu metodom tečne hromatografije sa masenom spektrometrijom

Rapid simultaneous determination of organophosphorus pesticides in human serum and urine by liquid chromatography-mass spectrometry

Milica Zlatković, Miodrag Jovanović, Dragana Djordjević, Slavica Vučinić

Vojnomedicinska akademija, Centar za kontrolu trovanja, Beograd, Srbija

Apstrakt

Uvod/Cilj. Analiza organofosfornih jedinjenja i njihovih metabolita u biološkom materijalu, obuhvata primenu velikog broja metoda kako u pripremi uzoraka za analizu, tako i za njihovo određivanje. Njihova identifikacija veoma je složena, a praćenje niskih koncentracija nalaže primenu veoma osetljivih analitičkih tehnika. Cilj rada bio je da se razvije i validira originalna i osetljiva metoda za detekciju i kvantifikaciju organofosfornih pesticida (dimetoat, diazinon, malation i malaokson) u biološkom materijalu (serum i urin). **Metode.** Ova metoda zasniva se na SP (čvrsto-tečnoj) pripremi uzorka, hromatografskom razdvajanju na ACQUITY UPLC ® HSST3 koloni i masenospektrometrijskoj detekciji u pozitivnom jonskom modu. Kao mobilna faza korišteni su 5 mM amonijum-formijat pH 3,0 (A) i metanol sa 0,1% HCOOH (B) u linearnom gradijentu. Protok mobilne faze bio je konstantan i iznosio je 0,3 mL/min. **Rezultati.** Standardna kriva bila je linearna u opsegu od 0,05 do 5,00 mg/L za malation i malaokson, 0,10 do 5,00 mg/L za dimetoat i od 0,05 do 2,50 mg/L za diazinon. Korelacioni koeficijent bio je $r \geq 0,99$. Dobijeni rezultati prinosa ekstrakcije kretali su se od 90 do 99%. Donje granice detekcije (LOD) metode kretale su se od 0,007 do 0,07 mg/L, a donje granice kvantifikacije (LOQ) od 0,022 do 0,085 mg/L. Preciznost i tačnost zadovoljavali su zahteve za sve analizirane pesticide. **Zaključak.** Metoda tečne hromatografije sa masenom spektrometrijom je jednostavna, precizna i može se koristiti za određivanje organofosfornih pesticida u kliničkoj i forenzičkoj toksikologiji.

Ključne reči:

organofosforna jedinjenja; krv; mokraća; ljudi; hromatografija, tečna; spektrometrija mase.

Abstract

Background/Aim. Analysis of organophosphorus compounds and their metabolites in a biological material includes the use of numerous methods, covering both preparation of samples for analysis and their identification that is considered to be very complex. Low concentrations monitoring requires implementation of highly sensitive analytical techniques. The aim of this study was to develop and validate an original and sensitive method for the detection and quantitation of organophosphorus pesticides (dimethoate, diazinon, malathion and malaoxon) in human biological matrices (serum, urine). **Methods.** This method was based on a solid-phase extraction procedure, a chromatographic separation using an ACQUITY UPLC ® HSST3 column and mass spectrometric detection in the positive ion mode. Mobile phase: was consisted of Solvent A (5 mM ammonium formate pH 3.0) and Solvent B (0.1% acetic formate in methanol), in a linear gradient (constant flow-rate 0.3 mL/min). **Results.** The standard curve was linear in the range of 0.05–5.00 mg/L for malathion and malaoxon, 0.10–5.00 mg/L for dimethoate and 0.05–2.50 mg/L for diazinon. The correlation coefficient was $r \geq 0.99$. Extraction recoveries were satisfactory and ranged between 90–99%. The limits of detection (LOD) was between 0.007–0.07 mg/L and the limits of quantitation (LOQ) ranged between 0.022–0.085 mg/L. Intra- and interassay precision and accuracy were satisfactory for all of the pesticides analyzed. **Conclusion.** The method of liquid chromatography – mass spectrometry is simple, accurate, and useful for the determination of organophosphorus pesticides in both clinical and forensic toxicology.

Key words:

organophosphorus compounds; blood; urine; humans; chromatography, liquid; mass spectrometry.

Uvod

Organofosforni insekticidi imaju široku primenu u celom svetu, prvenstveno zato što ih karakteriše brza degradacija bez mogućnosti akumulacije u lancu ishrane. Dok je broj žrtava slučajnog trovanja ovim jedinjenjima relativno mali, namerna samotrovanja dostigla su velike razmere, čak i u nekim tehnološki razvijenim zemljama^{1,2}.

Upotreba hemijskih bojnih otrova, koji su u osnovi organofosfati, u toku vojnih sukoba i terorističkih akcija, pospešila je istraživanja i razvoj efikasnih medicinskih protivmera, kako u okviru nacionalnih, tako i internacionalnih programa. Sve dok postoji opasnost od ekspozicije ovim agensima, potrebne su nove metodologije za njeno praćenje³.

Postavljanje dijagnoze akutnog trovanja organofosforim jedinjenjima (OFJ) i praćenje toka njihovog metabolizma veoma je značajno u terapiji. Dijagnoza trovanja može se potvrditi određivanjem aktivnosti (acetilholinesteraze) AChE u eritrocitima i (butirilholinesteraze) BuChE u serumu, a veoma je značajno i određivanje koncentracije organofosforim jedinjenja u serumu, i praćenje daljeg metabolizma preko njihovih urinarnih metabolita-alkilfosfata.

Analiza organofosforim jedinjenja i njihovih metabolita u biološkom materijalu, obuhvata primenu velikog broja metoda, kako pripreme uzoraka za analizu, tako i njihovo određivanje. Njihova identifikacija veoma je složena, a praćenje niskih koncentracija nalaže primenu veoma osetljivih analitičkih tehnika. Postoji veliki broj hromatografskih metoda za određivanje organofosforim jedinjenja⁴. Sve metode sastoje se iz tri osnovna koraka: ekstrakcije, prečišćavanja i analize dobijenog ekstrakta. Ekstrakcija organskim rastvaračima (tečno-tečna ekstrakcija) često se primenjuje za izdvajanje organofosforim jedinjenja iz biološkog materijala. U novije vreme, sve češće je u upotrebi primena čvrsto-tečne (SP) ekstrakcije. U analizi ekstrakata koriste se različite tehnike^{5,6}. Primenjuju se gasna hromatografija (GC) sa azot/fosfor selektivnim detektorom (NP), tečna hromatografija pod visokim pritiskom (HPLC) sa ultravioletnim (UV) detektorom i detektorom sa nizom dioda (DAD)⁷. U savremenoj toksikološko-hemijskoj analizi biološkog materijala (krv, urin, tkiva organa) primenjuju se osetljivije, specifičnije i pouzdanije tehnike. Najčešće se primenjuje gasna hromatografija (GC) sa masenom spektrometrijom (MS)^{7,8}, a u novije vreme i tečna hromatografija sa masenom (LC-MS) i spregnutom masenom detekcijom (LC-MS/MS)⁹⁻¹². Maseni spektar, kao analitički prikaz rezultata masenospektrometrijskog merenja, pouzdan je za identifikaciju ispitivanog jedinjenja.

Savremena toksikološko-hemijska analiza zahteva pronalaženje i uvođenje novih metoda i tehnika za specifičniju, osetljiviju, precizniju i bržu analizu. Tečna hromatografija ultravisokih performansi (UPLC) sa masenom spektrometrijom (MS), kao nova tehnika u tečnoj hromatografiji, sa bržom i pouzdanijom hromatografskom analizom, do sada nije korišćena u analitici ovih jedinjenja.

Cilj rada bio je da se razvije i validira originalna i osetljiva metoda za detekciju i kvantifikaciju organofosforim pesticida (dimetoat, diazinon, malation i malaokson) u biološkom materijalu (serum i urin).

Metode

U radu su korišćene sledeće hemikalije: metanol, HPLC čistoće (J.T. Baker, Mallincrodt, Holandija;) mravlja kiselina i anonijum-hidroksid p.a. (MERCK, Darmstadt, Nemačka) i analitički standardi: malation, izo-malation, malaokson, dimetoat i diazinon (Dr. Ehrenstorfer, Augsburg, Nemačka).

Rastvori analitičkih standarda

Osnovni standardni rastvori su pripremani u koncentraciji od 1 mg/mL. Odmerene količine od 0,01 g (\pm 0,0001 g) svakog jedinjenja, rastvorene su u metanolu (dimetoat, diazinon, malation, malaokson i izo-malation) u normalnim sudovima od 10 mL.

Od osnovnih rastvora napravljena je serija razblaženja za kalibracione krive. Za malation i malaokson u opsegu od 0,05 – 5,00 mg/L, za dimetoat u opsegu od 0,1 – 5,00 mg/L i diazinon u opsegu od 0,05 – 2,50 mg/L. Izo-malation je korišćen kao interni standard (IS) i to u koncentraciji od 0,50 mg/L.

Kalibraciona kriva opterećenih seruma i urina pravljen je u istim koncentracijama.

Svi standardni rastvori čuvani su na 4 °C.

Ekstrakciona procedura: korišćen je Oasis HLB Extraction Cartridge, 3cc/60 mg.

1) kondicioniranje kolone: 2 mL metanola i 2 mL demineralizovane vode; 2) nanošenje na kolonu: 1 mL uzorka (opterećenje pool seruma i urina sa odgovarajućim standardom i internim standardom); 3) pranje kolone: 2 mL demineralizovane vode; 4) eluiranje uzorka: 1 mL metanola.

Eluent je filtriran kroz 0,33 μ m membranski filter i prebačen u vialu za injektovanje.

UPLC-MS sistem: Korišćen je Waters-Acquity UPLC-SQ-Sistem sa softveskim programom MassLynx 4.1.

ACQUITY UPLC: Kolona, ACQUITY UPLC[®] HSST3 1,8 μ m 2,1 \times 100 mm; temperatura kolone 30 °C. Mobilna faza: 5 mM amonijum formijat pH 3,0 (A) i metanol sa 0,1% HCOOH (B) u sledećem gradijentu: 0–1 min. 60% A : 40% B; 1–5,5 min. 40% A : 60% B; 5,5–8,5 min. 10 % A : 90% B; 8,5–9,0 min. 10% A : 90% B i 9–11 min 60% A : 40% B. Protok mobilne faze bio je konstantan i iznosio je 0,3 mL/min. Zapremina injekcije petlje bila je 5 μ L. Temperatura autosempera iznosila je 10 °C.

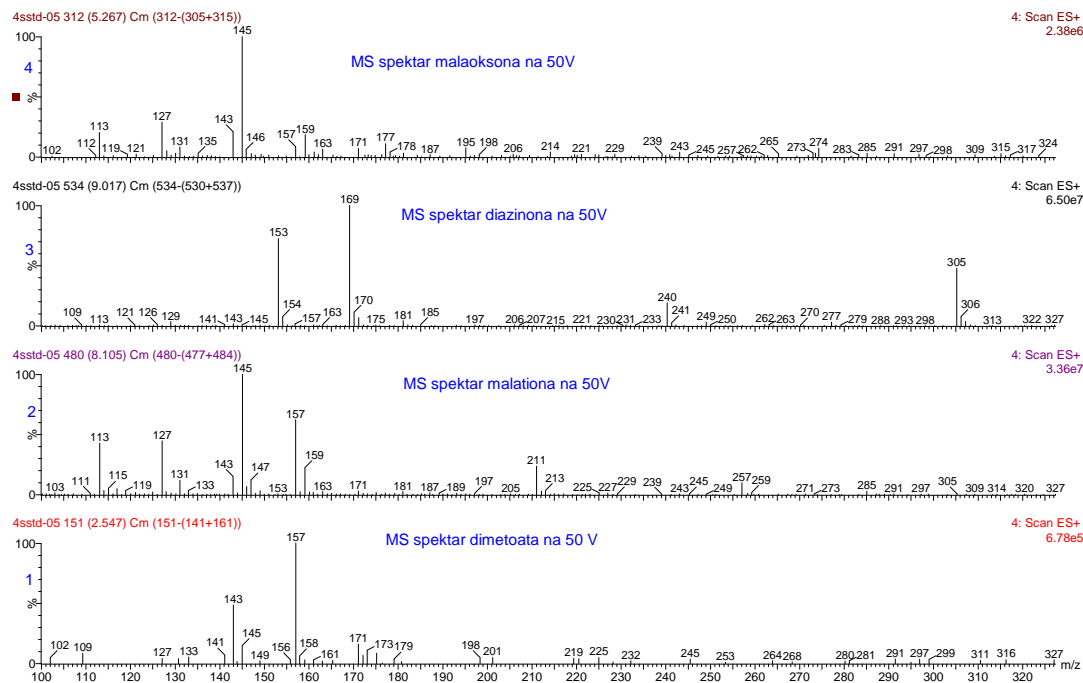
Uslovi masenog detektora Waters-SQD: maseni spektar sniman je u MS *scan*-u (*full-scan*) u rasponu masa od 100–350 m/z; naponi na konusu (Cone Voltage) 25, 35, 40, 50 i 70 V i SIM-u (m/z 230, 305, 315 i 331); napon na konusu 25 V; ukupno vreme bilo je 11 min.; vreme skeniranja (Scan Time) 0,10 s; a jedinjenja su analizirana u pozitivnom jonskom modu (ES+). Ostali parametri masenog detektora iznosili su: kapilara 4,30 kV; ekstraktor 3 V; temperatura izvora (Source Temperature) 150 °C; desolvaciona temperatura (*desolvation temperature*) 350 °C; protok gasa azota: 1-desolvacioni 400 L/h; 2-na konusu 50 L/h. Napon elektronskog multiplikatora iznosio je 670 V.

Statistička obrada dobijenih rezultata (srednja vrednost, standardna devijacija i koeficijent varijacije) dobijena je korišćenjem računarskog programa Microsoft Excel 2003. Ka-

libracione krive su konstruisane metodom najmanjeg kvadrata, sa srednjim vrednostima površina pikova za svaku koncentraciju ($n = 4$). Istim programom izračunati su koeficijenti korelacije i jednačina prave $y = ax \pm b$.

Prilikom izrade kalibracionih kriva, ujedno, određena je i donja granica detekcije (LOD) i donja granica kvantifikacije (LOQ) metode za svako pojedinačno jedinjenje. To je najmanja količina analita u uzorku koja može biti detektovana

no visok standard kvantitativne analize. Analiza ekstrakata vršena je u *full scan*-u i SIM modu, a kvantifikacija je rađena na jonskim masama i to: m/z 230 za dimetoat; 305 za diazinon; 331 za malation i izo-malation i 315 za malaokson, pri naponu kona od 25 V. Maseni spektri analiziranih jedinjenja snimani su pri različitim kon voltazama. Najbolja fragmentacija pod ovim uslovima postignuta je na 50 V (slika 1).



Sl. 1 – Maseni spektri dimetoata, diazinona, malationa i malaoksona na 50V

na ($LOD = 3 \times S$). Donja granica kvantifikacije bila je onaj sadržaj koji se može pouzdano odrediti ($LOQ = 10 \times S$).

Granica detekcije i donja granica kvantifikacije određene su višestrukim injektiranjem radnih rastvora ($n = 20$) za najnižu tačku sa kalibracione krive svih analiziranih jedinjenja. Za malation, malaokson i diazinon u koncentraciji od 0,05 $\mu\text{g/L}$, a za dimetoat u koncentraciji od 0,10 $\mu\text{g/L}$.

Prinosi ekstrakcija dobijeni su iz jednačina pravih *recovery* testa.

Rezultati

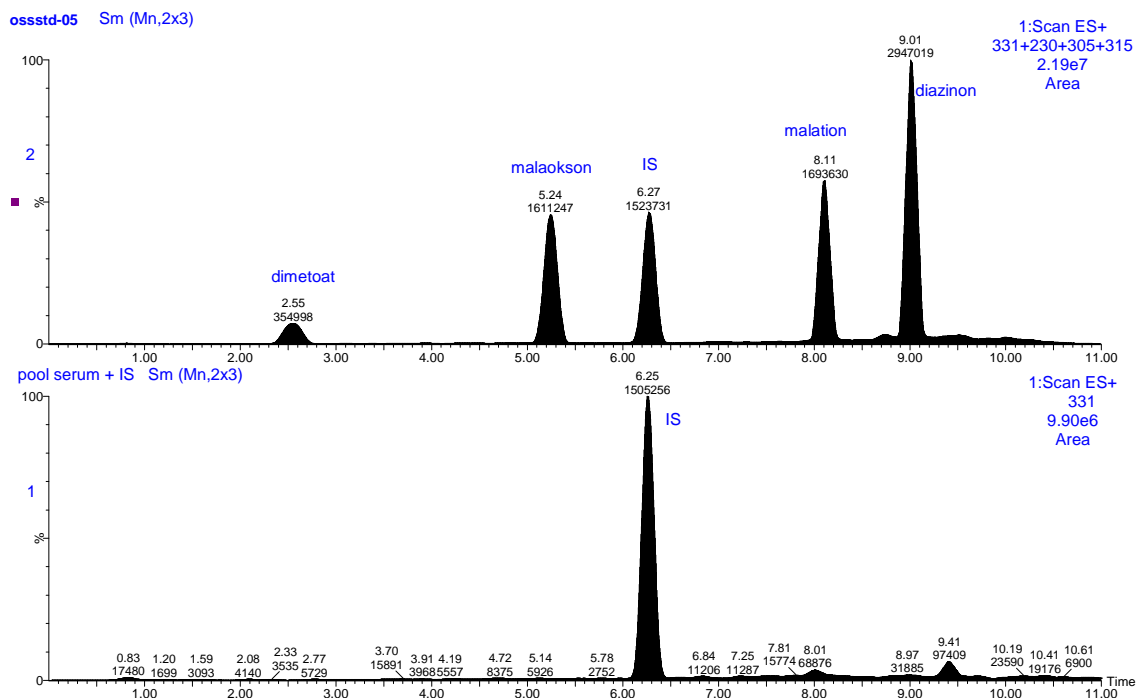
Za određivanje četiri organofosforna jedinjenja (dime-toat, diazinon, malation i njegov aktivni metabolit malaokson) u biološkom materijalu (serum i urin) razvijen je i primenjen metod na UPLC-MS analitičkom sistemu.

Snimanje pojedinačnih hromatograma analitičkih standarda analiziranih jedinjenja pod odabranim uslovima sastava mobilne faze, protoka, analitičke kolone i uslova masenog detektora, omogućilo je retenciono definisanje svakog od analiziranih jedinjenja. Retenciona vremena bila su: za dimetoat 2,5 min; diazinon 9,0 min; malation 8,1 min, malaokson 5,2 min i IS 6,3 min. Ukupno trajanje analize svedeno je na 11 minuta. Smeša analitičkih standarda pokazala je dobru rezoluciju pikova, što je omogućilo relativ-

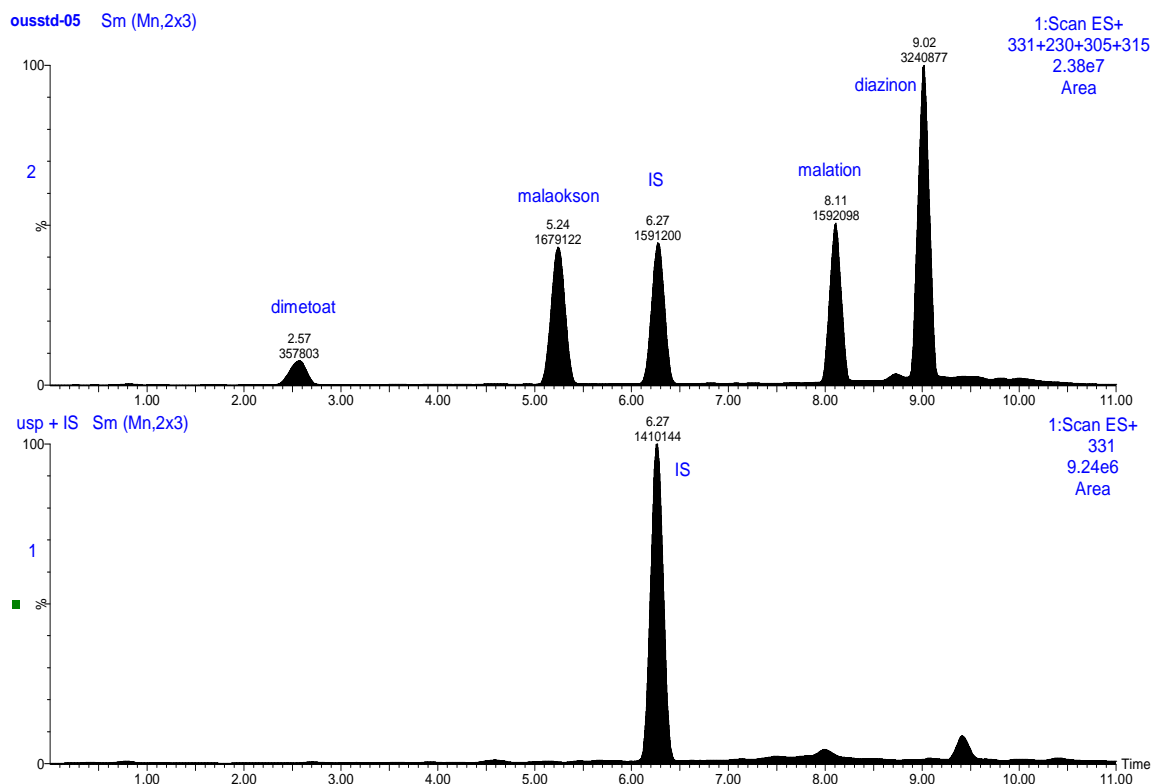
Komponente iz matriksa biološkog materijala nisu ometale određivanje. Na slici 2 prikazan je hromatogram seruma opterećen standardima u koncentraciji od 0,5 mg/L i hromatogram *pool* seruma sa IS. Na slici 3 prikazan je hromatogram urina opterećen standardima u koncentraciji od 0,5 mg/L i hromatogram *pool* urina sa IS.

Linearnost odgovora detektora ispitana je izradom kalibracionih kriva u koncentracijama: 0,10; 0,25; 0,50; 1,00; 2,50 i 5,00 mg/L za dimetoat; 0,05 0,10; 0,25; 0,50; 1,00 i 2,50 mg/L za diazinon i 0,05 0,10; 0,25; 0,50; 1,00; 2,50 i 5,00 mg/L za malation i malaokson. Svaka koncentracija bila je srednja vrednost četiri merenja, a odgovor detektora registrovan je preko površine pika. Korišćena je metoda internog standarda, sa izomalationom kao internim standardom u koncentraciji od 0,50 mg/L. Ispitivanje validnosti metoda ekstrakcije izvršeno je na Oasis HLB kertridžima u istim koncentracijama, kao i koncentracije standardnih rastvora sa po četiri ponavljanja. Kako nije bilo statistički značajne razlike u prinosima ekstrakcije opterećenih seruma i opterećenih urina, u radu su prikazane samo kalbracione krive opterećenih seruma i njihovi statistički parametri. Za proveru statističke značajnosti razlike korišćen je *t* test za verovatnoću od 95% ($p = 0,05$).

Prikazane su krive prinosa sa jednačinama prave. Analizom dobijenih rezultata može se zaključiti da je osetljivost



Sl. 2 – Jonski hromatogram *pool* seruma sa internim standardom (IS) (1) i jonski hromatogram seruma opterećenog smešom standarda u koncentraciji 0,5 mg/L (2)



Sl. 3 – Jonski hromatogram *pool* urina sa internim standardom (IS) (1) i jonski hromatogram urina opterećenog smešom standarda u koncentraciji 0,5 mg/L (2)

ispitivanja bila najveća za diazinon, jer je nagib u jednačini koja opisuje ovu zavisnost bio najveći, a zatim slede malaokson, malation i dimetoat. U tabeli 1 date su jednačine kalibracionih pravaca i koeficijenti korelacije (r).

Drugi parametar za proučavanje statističkih kriterijuma bila je preciznost koja se odnosi na slaganje rezultata dobijenih iz više određivanja. Za proveru preciznosti izračunate su

standardne devijacije (SD) i koeficijenti varijacije (CV) za koncentraciju 0,50 mg/L ($n = 10$) za svako analizirano jedinjenje u toku dana, ponovljivost, i iz dana u dan, reproduktivnost (tabela 2).

Iz dobijenih rezultata može se videti da je postignuta visoka preciznost sa koeficijentima varijacije od 2,93% do 5,91% za ponovljivost i 3,65% do 5,45% za reproduktivnost.

Tabela 1
Regresione jednačine i koeficijenti korelacije seruma opterećenih standardnim rastvorima dimetoata, diazinona, malationa i malaoksona dobijene metodom internog standarda

Jedinjenje	Jednačina prave	Koeficijent korelacije
Dimetoat	$y = 1,0643x - 0,0949$	0,9819
Diazinon	$y = 1,8315x + 0,2675$	0,9908
Malation	$y = 1,2576x + 0,4201$	0,9909
Malaokson	$y = 1,8249x + 0,1301$	0,9973

Tabela 2
Koeficijent varijacije (CV) za ponovljivost i reproduktivnost, donja granica detekcije (LOD) i donja granica kvantifikacije metode (LOQ)

Jedinjenje	Ponovljivost CV (%)	Reproduktivnost CV (%)	LOD (mg/L)	LOQ (mg/L)
Dimetoat	5,91	5,45	0,07	0,024
Diazinin	4,99	5,23	0,025	0,085
Malation	4,53	4,62	0,012	0,039
Malaokson	2,93	3,65	0,007	0,022

Preciznost IS, takođe, bila je visoka (CV = 3,49%) za ponovljivost i 3,87 % za reproduktivnost.

Određene su i donja granica detekcije (LOD) i donja granica kvantifikacije (LOQ) metode za svako pojedinačno jedinjenje (tabela 2). Određivanje jedinjenja prilikom snimanja u SIM modu (kod ciljanih analiza) omogućilo je povećanje osetljivosti za čitav red veličine.

Prinosi ekstrakcija dobijeni su iz jednačina pravih *recovery* testa. U tabeli 3 date su jednačine pravih za svako jedinjenje sa odgovarajućim prinosima ekstrakcija.

Prinos IS iznosio je 91%.

Tabela 3

Rezultati *recovery* testa

Jedinjenje	Jednačina prave	<i>Recovery</i> (%)
Dimetoat	$y = 0,93696x + 0,0892$	94
Diazinin	$y = 0,9707x + 0,0382$	97
Malation	$y = 0,90x + 0,0711$	90
Malaokson	$y = 0,9940x + 0,0201$	99

Diskusija

Prilikom razvoja analitičke metode za toksikološko-hemijsku analizu OFJ nametali su se različiti problemi, kako u vezi sa kvalitativnom i kvantitativnom analizom, tako i u vezi sa dovoljnom osetljivošću metode za realne uzorke. Kako se u realnim uzorcima očekuje prisustvo atropina, diazepamata i oksima, lekova koji se koriste u tretmanu akutnih trovanja OFJ, bilo je potrebno pripremom i hromatografijom izbeći njihov uticaj na analizu određivanih samih OFJ. Izolacija oksima iz uzorka postignuta je u procesu pranja kolone, gde je on eluiran u vodenoj fazi. Adekvatnim hromatografskim uslovima izbegnuta je interferencija atropina i diazepamata. Retencionna vremena bila su: za atropin 1,4 min, a za diazepam 7,8 min.

Dobijeni hromatografski uslovi, sastav i gradijent mobilne faze i izbor kolone, koji su navedeni u metodama, pružaju dobru rezoluciju što omogućava relativno visok standard kvantitativne analize. Najveći broj autora koristi reverznofazne RP-18 i RP-8 kolone različitih dimenzija i karakteristika. Kao

mobilna faza koristi se, uglavnom, mešavina acetonitrila ili metanola sa različitim molaritetom acetatnog ili formijatnog pufera u raznim gradijentnim programima^{6,9-12}.

Izomalation uveden je u ovu hromatografsku metodu kao interni standard. Pogodnost izabranog internog standarda zasniva se na sličnoj polarosti i sličnim ostalim fizičko-hemijskim karakteristikama. Interni standard dopušta da se i preko relativnih retencionih vremena poboljša klasična hromatografska identifikacija, za šta u ovom slučaju nije bilo potrebe zbog dobijanja potpune potvrde identiteta preko masenog spektra.

Posle validacije instrumentalne tehnike, bilo je neophodno naći optimalni način pripreme uzoraka seruma i urina opterećenih standardima analiziranih jedinjenja. U literaturi se navode različite pripreme uzoraka, od precipitacije proteina acetonitrilom, preko različitih tečno-tečnih do SP ekstrakcija i to, uglavnom, pri niskim pH vrednostima. U ovom radu opisana je SP ekstrakcija na Oasis[®] HLB ketrizidima. Metoda je uspostavljena modifikovanjem Waters-ovog generičkog metoda. Promena pH vrednosti uzoraka nije uticala na prinos ekstrakcije.

Prinos ekstrakcije ispitan je UPLC-MS tehnikom. Uticaj matriksa iz seruma i urina gotovo je zanemarljiv, ako se pretražuje preko karakterističnog jona.

Prema podacima iz literature prinosi ekstrakcije kretali su se od 60 do 108,1% za diazinin, malation i još 8 organofosfora jedinjenja⁹, 80,1 ± 4,2% za malation i 75,2 ± 4,6% za malaokson⁶ i 86,3 ± 8,6% za diazinon¹⁰. U uspostavljenoj metodi, dobijeni rezultati prinosa ekstrakcije kretali su se od 90 do 99%. Statistički parametri dobijenih rezultata pokazuju da ova metoda pripreme uzoraka biološkog materijala (serum i urin) zadovoljava neophodne uslove izolacije i postiže bolje prinose ekstrakcije u odnosu na do sada opisane metode.

Takođe, u literaturi se navode vrednosti LOD u opsegu od 0,2 do 2,5 mg/L⁶ i 0,125 do 1,0 mg/L, a LOQ u opsegu od 0,25 do 1,25 mg/L⁹. Dobijene LOD uspostavljene metode kretale su se od 0,007 do 0,07 mg/L, a LOQ od 0,022 do 0,085 mg/L. Ponovo se može videti da se primenjenom metodom postiže bolja osetljivost.

Svi prethodno ispitani parametri potvrđuju visoku specifičnost, preciznost i reproduktivnost metode, što je preporučuje za upotrebu u svakodnevnoj analitičko-toksikološkoj praksi.

Zaključak

Razvijena je i validirana pouzdana, precizna, tačna i brza UPLC-MS metoda za identifikaciju i kvantitativno odre-

đivanje četiri organofosforna jedinjenja (dimetoat, diazinon, malation i malaokson) u biološkom materijalu (serum i urin), što je od značaja za dijagnostiku i optimalno lečenje akutnih trovanja ovim jedinjenjima.

Hromatografija ultravisokih performansi, u odnosu na postojeće hromatografske tehnike, daje bolju rezoluciju hromatografskih pikova i smanjuje vreme trajanja analize. Masena spektrometrija daje potpunu spektralnu potvrdu identiteta analiziranih jedinjenja.

L I T E R A T U R A

1. Vučinić S, Joksović D, Todorović V, Šegrt Z, Režić T. The experience of national poison control centre in management of acute organophosphorus insecticide (OPI) poisoning. Proceedings from CBMTS IV, May 2002. Switzerland: Spiez; 2002. p. 51–4.
2. Singh S. Organophosphorous poisoning: an evidence based approach. MJAFI 2004; 60: 2–4.
3. Centers for Disease Control and Prevention. Terrorism preparedness in state health departments – United States, 2001–2003. JAMA 2003; 290: 3190.
4. Moffat AC, Osselton MD, Widdop B. Clarke's Analysis of Drugs and Poisons. London, Chicago: Pharmaceutical Press; 2004.
5. Dulaurent S, Saint-Marcon F, Marquet P, Lachâtre G. Simultaneous determination of six dialkylphosphates in urine by liquid chromatography tandem mass spectrometry. J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci 2006; 831(1–2): 223–9.
6. Katagi M, Tatasuno M, Tsuchihashi H. Determination of malathion metabolites in biological samples by LC/MS. Jpn Jtoxicol Environ Health 1994; 40(4): 357–64. (Japanese)
7. Suzuki O, Watanabe K. Drugs and poisons in humans. A handbook of practical analysis. Berlin, New York: Springer-Verlag; pp. 455–67.
8. Bertholf RL, Wineber RE. Chromatographic methods in clinical chemistry and toxicology. Hoboken, NJ: John Wiley & Sons Ltd; 2007.
9. Inoue S, Saito T, Mase H, Suzuki Y, Takazawa K, Yamamoto I, et al. Rapid simultaneous determination for organophosphorus pesticides in human serum by LC-MS. J Pharm Biomed Anal 2007; 44(1): 258–64.
10. Abu-Qare AW, Abou-Donia MB. Determination of diazinon, chlorpyrifos, and their metabolites in rat plasma and urine by high-performance liquid chromatography. J Chromatogr Sci 2001; 39(5): 200–4.
11. Abu-Qare AW, Abou-Donia MB. Simultaneous determination of malathion, permethrin, DEET (N,N-diethyl-m-toluamide), and their metabolites in rat plasma and urine using high performance liquid chromatography. J Pharm Biomed Anal 2001; 26(2): 291–9.
12. Poletini A. Applications of LC-MS in toxicology. London-Chicago: Pharmaceutical Press; 2006.

Primljen 22. VI 2009.
Revidiran 13. VII 2009.
Prihvaćen 17. VII 2009.



Značaj praćenja serumskih tumorskih markera kod metastatskih karcinoma nepoznatog primarnog ishodišta

Significance of serum tumor markers monitoring in carcinomas of unknown primary site

Ivica Pejčić*, Svetislav Vrbić*, Sladjana Filipović*, Mirjana Šćekić*,
Ivan Petković*, Ljiljana Pejčić†, Nebojša Djenić‡

Univerzitetski klinički centar Niš, *Klinika za onkologiju, †Klinika za pedijatriju, Niš,
Srbija; ‡Vojna bolnica, Niš, Srbija

Apstrakt

Uvod/Cilj. Tumori nepoznatog primarnog ishodišta predstavljaju heterogenu grupu malignih tumora sa nepovoljnom prognozom. Kancer nepoznatog porekla (CUP) definiše se kao odsustvo bilo kakvog primarnog tumora nakon kompletnog kliničkog ispitivanja, a javlja se kod 3–5% svih bolesnika sa dijagnozom maligniteta. Cilj ovog ispitivanja bio je da se pokaže prognostička i prediktivna vrednost 8 serumskih tumorskih markera u ovoj grupi bolesnika. **Metode.** U studiju je bilo uključeno 63 bolesnika kod kojih je histološka analiza pokazala prisustvo metastatskog tumora čije se primarno ishodište (poreklo) nije moglo dokazati neinvazivnim dijagnostičkim tehnikama. Svi histološki nalazi su na osnovu svetlosne mikroskopije klasifikovani u jednu od sledeće tri grupe: planocelularni karcinomi – 8 bolesnika; adenokarcinomi – 33 bolesnika; nediferentovani karcinomi – 22 bolesnika. Kod svih bolesnika odredili smo nivo 8 serumskih tumorskih markera u trenutku postavljanja dijagnoze: Alfa-fetoprotein (AFP), humani horionski gonadotropin (beta-HCG), neuron specifična ekolaza (NSE), marker malignih tumora ovarijuma (CA 125), prostata specifični antigen (PSA), marker malignih tumora dojke (CA 15-3), marker malignih tumora pankreasa i gastrointestinalnog trakta (CA 19-9) i karcinoembrionalni antigen (CEA). Bolesnicima kojima je ordinirana hemioterapija markeri su određivani nakon trećeg i šestog ciklusa hemioterapije, odnosno u trenutku registrovanja progresije bolesti, ukoliko je ova nastupila. Kod bolesnika čiji je odgovor na hemioterapiju procenjen kao kompletan odgovor (CR), parcijalni odgovor (PR) ili stabilna bolest (SD) markeri su odre-

đivani u tromesečnim intervalima do trenutka relapsa ili progresije. Hemioterapija je primenjena kod 32 bolesnika (20 žena i 12 muškaraca) starosti od 29–70 godina, koji su ispunjavali kriterijume za uključivanje. Primenjena je sledeća hemioterapijska šema: doksorubicin 50 mg/m² (dan 1), cisplatin 60 mg/m² (dan 1), etoposide 120 mg/m² (dani 1–3). Interval između hemioterapijskih ciklusa iznosio je 3 sedmice, a u slučaju protrahovane hematološke toksičnosti najviše 5 sedmica. **Rezultati.** Najčešće bile su povišene vrednosti NSE (82,54%), a najređe AFP (11,11%). Prosečno vreme preživljavanja iznosilo je 17,89 meseci (95% CI 12,96; 22,83). Verovatnoća da bolesnik preživi 24 meseca iznosila je 0,228. Grupa od 32 bolesnika, koji su bili na hemioterapiji, u posmatranom periodu (72 meseca) imala je 12 (37,5%) letalnih ishoda. Prosečno vreme preživljavanja bilo je 26,6 meseci (95% CI 19,5; 33,7). Srednje vrednosti tumorskih markera, pre i posle primenjene hemioterapije, bile su značajno niže za NSE i CA 125. Preživljavanje je bilo značajno bolje u slučaju pada vrednosti nivoa NSE i CA 125 tokom terapije za više od 20%. **Zaključak.** Povišene vrednosti tumorskih markera u serumu vrlo su česte u CUP sindromu. Ovi tumori pokazuju nespecifičnu povećanu ekspresiju tumorskih markera. Nivo NSE i CA 125 pokazuje dobru korelaciju sa odgovorom na preduzetu hemioterapiju. Ne preporučuje se, međutim, rutinska primena najčešće korišćenih serumskih tumorskih markera u svetlu prognostičke i prediktivne vrednosti.

Ključne reči:
tumorski markeri, biološki; neoplazme nepoznatog porekla; preživljavanje, analiza.

Abstract

Background/Aim. Unknown primary tumors represent a heterogeneous group of malignancies that are indicative of ominous prognosis. Cancer of unknown primary site (CUP) is defined as the lack of any detectable primary site after full evaluation, and accounts for approximately 3–5% of all newly diagnosed patients with malignancies. The aim of this

report was to present the prognostic and predictive value of 8 serum tumor markers in this group of patients. **Methods.** The study involved 63 patients. On histological examination, all the patients were presented with metastatic tumors whose primary site (origin) could not be detected with non-invasive diagnostic techniques. Following the routine light microscopy, all histological findings were classified into one of the following three groups: plano-cellular carcinoma – 8

patients; adenocarcinoma – 33 patients; unclassifiable (undifferentiated) carcinoma – 22 patients. In all the cases we evaluated 8 serum tumor markers: alpha-fetoproteins (AFP), chronic gonadotrophin beta submit, human (beta-HCG), neuron specific enolase (NSE), marker of malignant ovarian tumors (CA 125), prostate-specific antigen (PSA), marker of malignant breast tumor (CA 15-3), marker of malignant pancreas tumor and gastrointestinal tumor (Ca 19-9), carcinoembryonic antigen (CEA) at the time of diagnosis. The patients on chemotherapy had the markers determined after the third and sixth chemocycle, i.e. at the time of illness progression observation, if present. The patients responding to chemotherapy with complete response (CR), partial response (PR) or stable disease (SD) had the markers determined after three-month periods until the time of relapse or progression. Chemotherapy was applied in 32 patients (20 females and 12 males), aged 29-70 years, who met the inclusion criteria. The following chemotherapy regimen was used: doxorubicin 50mg/m² (day 1), cisplatin 60mg/m² (day 1), and etoposide 120 mg/m² (days 1–3). The period between two chemotherapy cycles was three weeks, and maximum five weeks in the case of prolonged hematologi-

cal toxicity. **Results.** Most commonly elevated were NSE values (82.54%), while AFP values were least commonly elevated (11.11%). Average survival time was 17.89 months (95%CI 12.96; 22.83). The probability of 24 months' survival was 0.228. The group of 32 patients treated with chemotherapy had 12 (37.5%) fatal outcomes in the observed period (72 months). Average survival time was 26.6 months (95% CI 19.5; 33.7). Average tumor marker values before and after the chemotherapy were significantly lower for NSE and CA 125. Survival was significantly better in cases of NSE and CA 125 decrease of more than 20%. **Conclusion.** Increased values of serum tumor markers are very often in CUP. The tumors show nonspecific overexpression of tumor markers. The NSE and CA 125 levels show good correlation with response to the given chemotherapy. However, a routine evaluation of commonly used serum tumor markers has not been proven of any prognostic and predictive assistance.

Key words:
tumor markers, biological; neoplasms, unknown primary; survival analysis.

Uvod

Tumori nepoznatog primarnog ishodišta (*Carcinomas of unknown primary site* – CUP) javljaju se kod heterogene grupe bolesnika i veoma ih je teško definisati i lečiti. Smatra se da ovi tumori stiču metastatski potencijal pre nego što se razvije klinički manifestna primarna lezija. Uprkos stalnom napretku tehnike snimanja tumora i patologije ovi tumori čine 3% svih malignoma koji se dijagnostikuju u svakodnevnoj onkološkoj praksi¹. Ne postoji standardizovana definicija, ali je za kliničara-praktičara dovoljno da ih tretira kao biopsijom dokazanu malignu tumorsku bolest čije se anatomsko poreklo ne može identifikovati nakon temeljnog kliničkog, radiološkog i laboratorijskog ispitivanja², ili odsustvo bilo kojeg primarnog mesta nakon pune evaluacije³. Smatra se da primarni tumor pokazuje kako spori rast, tako i involuciju. To je oblik metastatskog maligniteta čije poreklo ostaje nepoznato čak i nakon iscrpne anamneze, kliničkog pregleda, grafije pluća, abdominalne i pelvične kompjuterizovane tomografije (CT) i drugih analiza u zavisnosti od kliničke prezentacije. Danas još uvek nema konsenzusa o tome da li je CUP samo grupa metastatskih tumora kod kojih nije identifikovan primarni, ili poseban entitet sa specifičnim genetskim/fenotipskim aberacijama što ih karakteriše kao „primarnu metastatsku bolest“⁴. Dilema onkologa-kliničara je da determinišu princip rada sa ovom grupom malignoma.

Uloga tumorskih markera kod ovih tumora ostaje kontroverzna. Često korišćeni tumorski markeri karcinoembrionalni antigen (CEA), marker malignih tumora pankreasa i gastrointestinalnog trakta (CA 19-9), marker malignih tumora dojke (CA 15-3), marker malignih tumora ovarijuma (CA 125), humani horionski gonadotropin (beta-HCG) i alfa-fetoprotein (AFP), nisu korisni kao dijagnostički i prognostički test – obično su povišenog nivoa, a mogu se koristiti u monitoringu odgovora na terapiju⁵⁻⁷. Nespecifična pojačana

ekspresija različitih markera kod CUP sindroma prisutna je kod većine bolesnika⁸. Tumorski markeri nisu pokazali dijagnostičku vrednost čak i u kombinovanom panelu, samo su pokazali prognostički značaj⁹.

Otkrivanje ishodišta metastatskog tumora poželjno je radi prilagođavanja hemioterapija svakom pojedinačnom malignomu. Ipak, optimalna hemioterapija do sada nije definisana, a korist od hemioterapije u odnosu na *best supportive care* i dalje je nejasna¹⁰. Analiza 20 kliničkih studija, novijeg datuma, sa ukupnim brojem od 1 319 bolesnika loše prognostičke grupe i korišćenjem različitih hemioterapijskih režima pokazala je nezadovoljavajući terapijski odgovor (20–45%), sa medijanom preživljavanja manjom od jedne godine¹¹.

Cilj ove studije bio je da se utvrdi prognostički značaj određivanja nivoa tumorskih markera, odnosno prediktivna vrednost u odnosu na ukupno preživljavanje bolesnika sa metastazama nepoznatog primarnog porekla. Takođe, cilj je bio odrediti prediktivnu vrednost određivanja tumorskih markera u odnosu na ordiniranu hemioterapiju (predviđanje odgovora na hemioterapiju i koristi od iste).

Metode

U ispitivanje su bila uključena 63 bolesnika kod kojih su sprovedeni dijagnostika i lečenje u periodu od januara 1997. godine do decembra 2002. u Klinici za onkologiju Kliničkog centra u Nišu. Kod svih bolesnika histološki je dokazan metastatski tumor čije se poreklo nije moglo detektovati neinvazivnim dijagnostičkim tehnikama (klinički pregled, standardne hematološke i biohemijske analize, grafija pluća, ehosonografija i/ili CT sken abdomena, endoskopske analize shodno histološkom nalazu).

Kod svih bolesnika određivan je serumski nivo 8 tumorskih markera.

Humani alfa fetoprotein određivan je *fluoroimmunoassay* metodom korišćenjem DELFIA hAFP kompleta firme Vallac Oy. Kao referentne vrednosti korišćene su vrednosti u rasponu od 0 do 7 ng/mL.

Humani horionski gonadotropin beta određivan je imunoradiometrijskom metodom na čvrstoj fazi korišćenjem kompleta INEP-DIJAGNOSTIKA. Za referentne vrednosti uzimani su nivoi od 0 do 3 IU/mL.

Neuron specifična enolaza određivana je *fluoroimmunoassay* metodom korišćenjem DELFIA NSE kompleta firme Vallac Oy. Kao referentne vrednosti korišćeni su nivoi od 0 do 12 mg/L.

Tumorasocirani antigen CA 125 određivan je imunoluminometrijskom test metodom (LIA-mat CA 125 II) firme „Byk-Sangtec Diagnostica GmbH“. Kao referentne vrednosti uzimani su nivoi od 0 do 30 IU/mL.

Prostata specifični antigen određivan je imunoluminometrijskom test metodom (LIA-mat PSA) firme „Byk-Sangtec Diagnostica GmbH“. Kao referentne vrednosti uzimani su nivoi od 0 do 3 ng/mL.

Tumorasocirani antigen CA 15-3 određivan je imunoluminometrijskim testom (LIA-mat CA 15-3) firme „Byk-Sangtec Diagnostica GmbH“. Kao referentne vrednosti korišćeni su nivoi od 0 do 30 IU/mL.

Tumorasocirani antigen CA 19-9 određivan je imunoluminometrijskom test metodom (LIA-mat CA 19-9) firme „Byk-Sangtec Diagnostica GmbH“. Kao referentne vrednosti uzimani su nivoi od 0 do 30 IU/mL.

Karcinoembrionalni antigen određivan je imunoluminometrijskom test metodom (LIA-mat CEA) firme „Byk-Sangtec Diagnostica GmbH“. Kao referentni nivoi korišćene su vrednosti od 0 do 4 ng/mL.

Svim bolesnicima određen je serumski nivo navedenih tumorskih markera u trenutku postavljanja dijagnoze, a u sklopu preciznog određivanja stadijuma bolesti. Bolesnicima kojima je ordinirana hemioterapija, markeri su određivani nakon trećeg i šestog ciklusa hemioterapije, odnosno u trenutku registrovanja progresije bolesti, ukoliko je ova nastupala. Kod bolesnika čiji odgovor na hemioterapiju je procenjen kao kompletan odgovor (CR), parcijalni odgovor (PR) ili stabilna bolest (SD) markeri su određivani u tromesečnim intervalima do trenutka relapsa ili progresije, ukoliko bi ova nastupila. Kod bolesnika kojima nije ordinirana hemioterapija ili je prethodna terapija iscrpljena, nastavljeno je određivanje tumorskih markera u tromesečnim intervalima.

Hemioterapija je ordinirana kod 32 bolesnika (20 ženskog i 12 muškog pola), starosti 29–70 godina, koji su ispunjavali kriterijume uključivanja¹²: starost ispod 70 godina, *Eastern Cooperative Oncology Group* (ECOG) performans status 0–3, prethodno nelečeni hemioterapijom, odsustvo poremećaja kardijalne, renalne i hepatične funkcije, očekivano preživljavanje od najmanje 2 meseca, metastatsko oboljenje bez mogućnosti za hirurški pristup, prisustvo dvodimenzionalno merljivih i procenjivih lezija, odsustvo metastaza u centralnom nervnom sistemu.

U ovoj grupi bilo je pet bolesnika sa planocelularnim karcinomom, 13 sa histologijom adenokarcinoma, 14 sa nediferentovanom (anaplasičnom) histologijom.

Primenjena je sledeća hemioterapijska šema: doksorubicin 50 mg/m² (dan 1), cisplatin 60 mg/m² (dan 1), etoposid 120 mg/m² (dani 1–3).

Interval između hemioterapijskih ciklusa iznosio je tri sedmice, a u slučaju protrahovane hematološke toksičnosti najviše pet sedmica. Bolesnici sa stabilnom bolešću, parcijalnim odgovorom ili kompletnim odgovorom primili su šest ciklusa terapije.

Kompletni odgovor definisan je kao kompletan nestanak bolesti koja se otkriva klinički u trajanju od najmanje četiri sedmice. Parcijalni odgovor procenjen je u slučaju redukcije u veličini svih merljivih lezija od najmanje 50%, merenih kao produkt dva najveća normalna prečnika bez pojave novih lezija. Stabilna bolest definisana je kao redukcija < 50% ili povećanje < 25% merljive bolesti bez pojave novih lezija. Progresija bolesti (PD) je definisana kao povećanje > 25% bilo koje prisutne merljive lezije ili pojava bilo koje nove lezije. Trajanje odgovora je definisano kao period od trenutka kada je objektivni odgovor prvi put registrovan do pojave znakova PD.

Hemioterapijska toksičnost merena je u skladu sa kriterijumima Svetske zdravstvene organizacije (WHO)¹³.

Dobijeni rezultati analizirani su metodama deskriptivne i analitičke statistike. Analiza preživljavanja radena je prema Kaplan-Meier-u sa Log-Rank testom kod upoređivanja dva ili više faktora¹⁴.

Rezultati

Od 63 bolesnika uključena u ovo istraživanje, 37 su bili muškarci, a 26 žene, starosti od 29 do 70 godina (medijana 56). Njihove karakteristike navedene su u tabelama 1 i 2. Rutinskom svetlosnom mikroskopijom sve histološke dijagnoze klasifikovane su u jednu od tri sledeće grupe: planocelularni karcinomi („*Squamous Cell Carcinoma*“) – 8 (13%) bolesnika; adenokarcinomi – 33 (52%) bolesnika; neklasifikovani (nediferentovani) karcinomi – 22 (35%) bolesnika.

U ovoj seriji nije bilo nijednog ispitanika kod koga su svi analizirani markeri bili u granicama referentnih vrednosti (u trenutku postavljanja dijagnoze oboljenja). Takođe, nije bilo bolesnika sa sedam ili osam markera sa povišenim vrednostima. Najčešće su bile povišene vrednosti NSE (82,54%), a najređe AFP (11,11%). Učestalost povišenih vrednosti PSA treba uzeti sa rezervom, pošto je on određivan i kod bolesnika. Ukoliko se analiziraju samo bolesnici, PSA je bio povišen kod 13,51%. Učestalost povišenih vrednosti pojedinih markera prikazana je na slici 1.

Akturijalna krivulja na slici 2 prikazuje očekivano preživljavanje bolesnika sa metastazama nepoznatog primarnog ishodišta. Prosečno vreme preživljavanja iznosilo je 17,89 meseci (95% CI 12,96; 22,83), a medijana je bilo 10 meseci (95% CI 2,95; 17,05). Verovatnoća da bolesnik preživi 24 meseca iznosila je 0,228.

U cilju procene prognostičke vrednosti tumorskih markera kod metastatskih tumora nepoznatog primarnog porekla analizirano je ukupno preživljavanje bolesnika koji su imali normalne vrednosti (u referentnim granicama) i povišene, u trenutku postavljanja dijagnoze (tabela 3). Nijedan ispitanik marker nije pokazao prognostički značaj.

Tabela 1

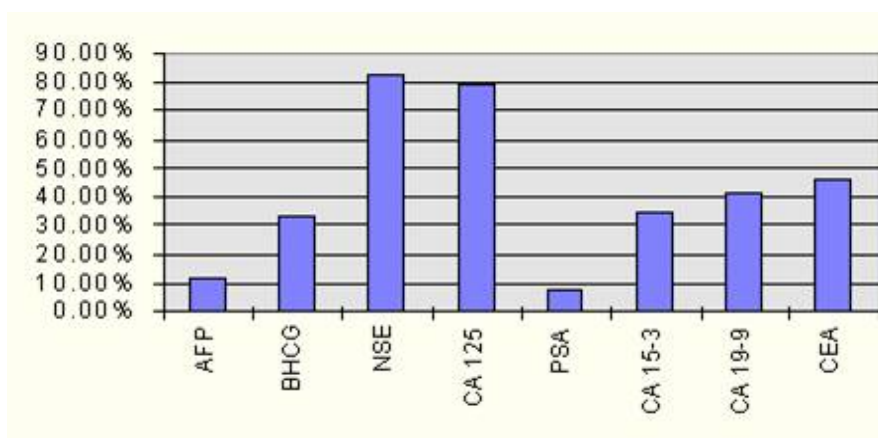
Karakteristike bolesnika	
Karakteristike	Bolesnici n (%)
Starost, $\bar{x} \pm SD$ (opseg)	56,05 \pm 8,29 (29–72)
Performans status-ECOG	
0	4 (6,3)
1	16 (25,4)
2	19 (30,2)
3	17 (27,0)
4	7 (11,1)
Metastatsko mesto	
1 – jetra, peritoneum, retroperitoneum	31 (49,2)
2 – pluća, medijastinum, pleura	29 (46,0)
3 – periferni supradijafragmalni limfni nodusi	24 (38,1)
4 – periferni infradijafragmalni limfni nodusi	15 (23,8)
5 – kosti, meko tkivo	19 (30,2)
Broj metastatskih mesta	
1	15 (23,8)
2	22 (34,9)
> 2	26 (41,3)

ECOG – Eastem Cooperative Oncology Group

Tabela 2

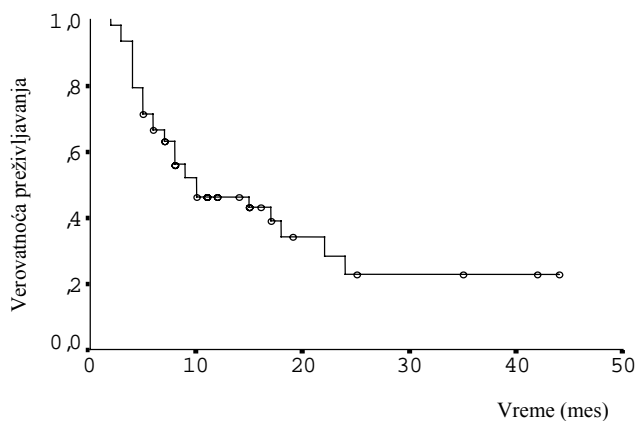
Organi i tkiva zahvaćena metastazama

Organi i tkiva	Bolesnici n (%)
Mozak	1 (1,58)
Cervikalni limfni nodusi	24 (38,09)
Medijastinalni limfni nodusi	2 (3,17)
Pluća	25 (39,68)
Pleura	2 (3,17)
Aksilarni limfni nodusi	11 (17,46)
Jetra	18 (28,57)
Peritoneum	8 (12,69)
Retroperitonealni limfni nodusi	17 (26,98)
Nadbubreg	1 (1,58)
Kosti	16 (25,39)
Koštana srž	3 (4,76)
Kožni nodusi	4 (6,35)
Ingvinalni limfni nodusi	14 (22,22)
Meko tkivo	3 (4,76)
Testis	1 (1,58)



Sl. 1 – Učestalost povišenih vrednosti pojedinih tumorskih markera

AFP – alfa fetoprotein; bHCG – humani horionski gonadotropin; NSE – neuron specifična enolaza; C 125 – marker malignih tumora ovarijuma; PSA – prostata specifični antigen; Ca 19-9 – marker malignih tumora pankreasa i gastrointestinalnog trakta; Ca 15-3 – marker malignih tumora dojke; CEA – karcinoembrionalni antigen



Sl. 2 – Preživljavanje bolesnika

Tabela 3

Poređenje preživljavanja bolesnika u odnosu na serumski nivo markera

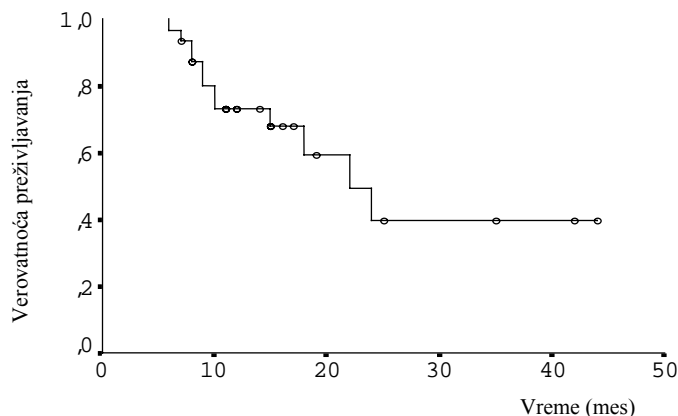
Marker	Normalne vrednosti		Povišene vrednosti		Log Rank
	umrli / ukupan broj	Prosečno preživljavanje (meseći) \bar{x} (95%; CI)	umrli / ukupan broj	Prosečno preživljavanje (meseći) \bar{x} (95%; CI)	
AFP	32/56	18,47 (13,2; 23,7)	5/7	7,57 (5,4; 9,7)	1,09; $p = 0,297$
beta HCG	20/37	13,75 (10,5; 17,0)	17/26	17,47 (10,8; 24,1)	0,07; $p = 0,784$
NSE	6/11	15,30 (9,1; 21,4)	31/51	18,43 (13,0; 23,9)	0,00; $p = 0,949$
CA 125	6/14	17,05 (8,6; 25,5)	31/49	16,99 (11,6; 22,3)	1,14; $p = 0,287$
PSA	31/56	18,69 (13,3; 24,0)	6/7	8,00 (4,5; 11,5)	2,38; $p = 0,123$
CA 15-3	22/40	15,97 (10,4; 21,5)	15/23	17,53 (10,6; 24,4)	0,00; $p = 0,976$
CA 19-9	21/37	13,11 (9,9; 16,3)	16/26	19,01 (12,1; 26,0)	0,10; $p = 0,757$
CEA	20/32	18,98 (12,9; 25,1)	17/31	11,27 (8,8; 13,8)	0,52; $p = 0,470$

AFP – alfa fetoprotein; bHCG – humani horionski gonadotropin; NSE – neuron specifična enolaza; C 125 – marker malignih tumora ovarijuma; PSA – prostata specifični antigen; Ca 19-9 – marker malignih tumora pankreasa i gastrointestinalnog trakta; Ca 15-3 – marker malignih tumora dojke; CEA – karcinoembrionalni antigen; CI – Confidence interval

U grupi od 32 bolesnika koji su bili na hemioterapiji u posmatranom periodu (44 meseca) bilo je 12 (37,5%) letalnih ishoda. Prosečno vreme preživljavanja bilo je 26,6 meseci (95% CI 19,5; 33,7), a medijana je bila 22 meseca (95% CI 14,3; 29,7). Verovatnoća da bolesnik iz ove grupe doživi 24 meseca iznosila je 0,397 (slika 3).

bela 4). Analiza značajnosti (*Wilcoxon Matched-Pairs Signed-Ranks Test*) pokazala je značajno niže vrednosti za NSE i CA 125.

Nadalje, analizirano je ponašanje nivoa markera pre početka hemioterapije i nakon šestog ciklusa hemioterapije, dakle u trenutku procene odgovora na hemioterapiju. Tražen je



Sl. 3 – Preživljavanje bolesnika na hemioterapiji (n = 32)

U cilju procene prediktivne vrednosti tumorskih markera najpre je urađena analiza ponašanja srednjih vrednosti tumorskih markera pre i posle primenjene hemioterapije (ta-

onaj procenat sniženja početnih vrednosti markera, dakle onih pre početka hemioterapije, za koji neki od markera pokazuje značajnu razliku posmatrano kroz preživljavanje.

Tabela 4

Markeri	Vrednosti markera pre i posle terapije		Statistika
	Pre terapije $\bar{x} \pm SD$	Posle terapije $\bar{x} \pm SD$	
AFP (ng/mL)	5,82 ± 9,97	9,27 ± 26,23	$z = -0,546; p = 0,585$
beta HCG (IJ/mL)	10,26 ± 23,82	7,29 ± 14,29	$z = -0,257; p = 0,797$
NSE (mg/L)	43,94 ± 116,11	18,39 ± 11,84	$z = -2,954; p = 0,003$
CA 125 (IJ/mL)	203,77 ± 237,78	100,81 ± 167,13	$z = -2,225; p = 0,026$
PSA (ng/mL)	1,24 ± 2,16	1,12 ± 1,76	$z = -0,454; p = 0,650$
CA 15-3 (IJ/mL)	60,34 ± 101,34	33,41 ± 26,62	$z = -1,117; p = 0,264$
CA 19-9 (IJ/mL)	139,43 ± 241,18	86,15 ± 151,10	$z = -0,194; p = 0,846$
CEA (ng/mL)	59,69 ± 188,55	42,40 ± 136,80	$z = -1,152; p = 0,249$

AFP – alfa fetoprotein; bHCG – humani horionski gonadotropin; NSE – neuron specifična enolaza; C 125 – marker malignih tumora ovarijuma; PSA – prostata specifični antigen; Ca 19-9 – marker malignih tumora pankreasa i gastrointestinalnog trakta; Ca 15-3 – marker malignih tumora dojke; CEA –karcinoembrionalni antigen

Značajnost je uočena na nivou pada vrednosti markera za 20% tokom primenjene terapije, i to za NSE (tabele 5 i 6 i slika 4) i CA 125 (tabele 7 i 8 i slika 5).

U grupi bolesnika kod kojih je zabeleženo sniženje vrednosti markera CA 125 bilo je 17 bolesnika (8 nediferentovanih, 6 adenokarcinoma i 3 planocelularna procesa): kod 12

Tabela 5

Veza između uspeha terapije i vrednosti neuron specifične enolaze ($\chi^2 = 6,47; p = 0,011$)

Odgovor	Smanjenje > 20%	Ostali	Ukupno
CR+PR	12 (66,7%)	3 (21,4%)	15 (46,9%)
SD + PD	6 (33,3%)	11 (78,6%)	17 (53,1%)
Svega	18 (100%)	14 (100%)	32 (100%)

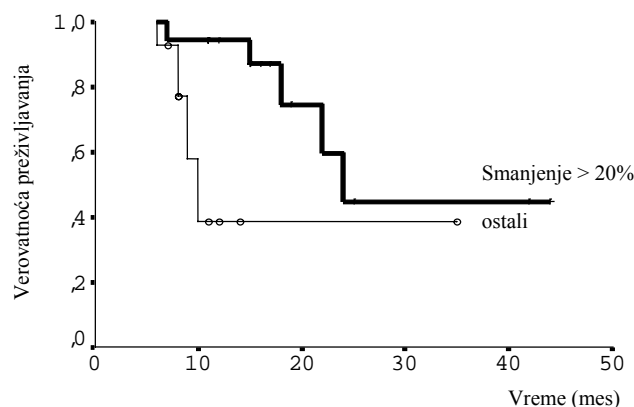
CR – kompletan odgovor; PR – parcijalni odgovor, SD – stabilna bolest; PD – progresija bolesti

Tabela 6

Preživljavanje grupa sa ili bez pada nivoa neuron specifične enolaze (NSE)

Nivo NSE	Umrli / ukupan broj	Prosečno preživljavanje (meseci) \bar{x} (95%; CI)
Smanjenje za $\geq 20\%$	5 / 18	30,32 (21,7; 38,9)
Ostali	7 / 04	18,88 (11,3; 26,5)
<i>Long Rank</i>		5,82; $p = 0,016$

CI – Confidence interval



Sl. 4 – Preživljavanje bolesnika sa i bez pada nivoa neuron specifične enolaze za > 20% ($p < 0,05$)

Tabela 7

Veza između uspeha terapije i vrednosti markera malignog tumora ovarijuma (CA 125) ($\chi^2 = 8,19; p = 0,004$)

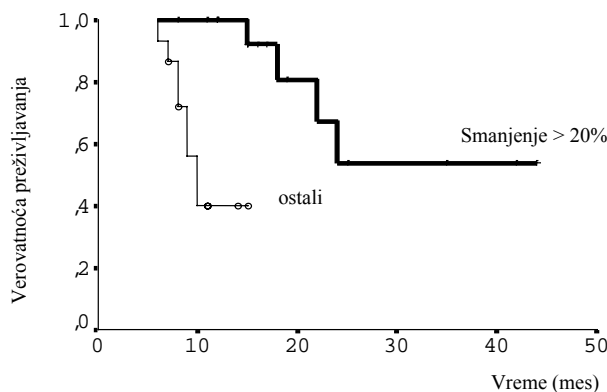
Odgovor	Smanjenje za 20% i više	Ostali	Ukupno
CR+PR	12 (70,6%)	3 (20,0%)	15 (46,9%)
SD + PD	5 (29,4%)	12 (80,0%)	17 (53,1%)
Svega	17 (100%)	15 (100%)	32 (100%)

CR – kompletan odgovor; PR – parcijalni odgovor, SD – stabilna bolest; PD – progresija bolesti

Tabela 8
Preživljavanje grupa sa ili bez pada nivoa tumorskih markera
malignog tumora ovarijuma (CA 125)

Nivo CA 125	Umrli / ukupan broj	Prosečno preživljavanje (meseci) \bar{x} (95%; CI)
Smanjenje za $\geq 20\%$	4 / 17	33,12 (25,0; 41,2)
Ostali	8 / 15	11,09 (9,3; 12,9)
<i>Long Rank</i>		12,54; $p = 0,0004$

CI – Confidence interval



Sl. 5 – Preživljavanje bolesnika sa i bez pada nivoa markera malignog tumora ovarijuma (CA 125) za $> 20\%$ ($p < 0,05$)

je zabeležen odgovor na terapiju (CR+PR), kod njih petoro nije bilo odgovora (SD+PD). Sve bolesnice (4) koje su imale histološki tip adenokarcinoma i zahvatanje retroperitoneuma (dve sa ascitom) imale su odgovor na terapiju (2CR i 2PR). Odgovor i pad markera zabeleženi su i kod 7 od 8 nediferentovanih (anaplastičnih) karcinoma (4 muškarca i 3 žene), a u kliničkoj slici dominirala je limfadenopatija od regionalne do generalizovane, uz zahvatanje pluća, pleure, jetre, koštane srži. Takođe, “skoro kompletnu remisiju” imala je i bolesnica (1 od 3 planocelularna procesa) sa masivnom, obostranom limfadenopatijom vrata.

Za ostale markere nije uočena statistička značajnost za bilo koju dinamiku serumskog nivoa pre i posle terapije.

Diskusija

U ovoj studiji korišćeni su markeri koji su pokazali veliku kliničku vrednost. U poređenju sa poznatom studijom Pavlidisa i sar.⁷, ova studija sadrži pored šest markera, koje je koristila pomenuta grupa autora, i određivanje NSE i PSA. Izborom ovih markera „pokrivena“ je grupa neuroendokrinih i neuroepitelnih tumora (NSE), dok PSA kao organ specifični marker usmerava dijagnostiku, uz pokušaj da se isključe primarni tumori prostate koji su rano diseminovani. Svi markeri, izuzev AFP i PSA, bili su povišeni kod više od 30% bolesnika, što odgovara rezultatima drugih studija⁷ gde su markeri bili povišeni kod preko 40%, izuzev AFP (17%). Doprinos ove studije je analiza zastupljenosti povišenih vrednosti NSE, koji je sa 82,54% povišenih vrednosti najčešće povišeno ekspresiran tumorski marker.

Preživljavanje ispitivane grupe bolesnika uglavnom se slaže sa rezultatima drugih autora. Medijana cele grupe od 10 meseci sa verovatnoćom preživljavanja 24 meseca kod

22,8% odgovara rezultatima Altmana i Cadmana¹⁵, Hessa i sar.¹⁶, i bolja je od iskustva Jungingera i Hoeffkena¹⁷. Pentheroudakis i Pavlidis¹¹ u novije vreme izveštavaju, na osnovu pregleda 20 „svežih“ kliničkih ispitivanja, da medijana ukupnog preživljavanja ne prelazi 12 meseci. Analiza prognostičkih vrednosti tumorskih markera pokazala je da nijedan marker ne poseduje prognostički značaj kod metastatskih tumora nepoznatog ishodišta, odnosno, ne može se smatrati nezavisnim prognostičkim faktorom. Ovo je u saglasnosti sa studijom Pavlidisa i sar.⁷. Ipak, ista grupa navodi, u radu novijeg datuma, da veće šanse za preživljavanje imaju bolesnici sa uvećanim vrednostima CA 125 i normalnim vrednostima CA 19-9¹⁷. Iako su neki autori, Greko i Hainsworth¹⁸ pokazali da CEA, CA 125, CA 19-9 i CA 15-3 ne koreliraju sa odgovorom na primenjenu hemioterapiju, u ovoj studiji uočeno je, najpre, da je za NSE i CA 125 karakterističan pad srednjih vrednosti nivoa pre i nakon završene hemioterapije. Nadalje, vršeno je upoređivanje bolesnika, njihovo ukupno preživljavanje, zavisno od dinamike pada nivoa vrednosti markera pre i nakon hemioterapije. S obzirom da bolesnici kod kojih je došlo do sniženja vrednosti NSE i CA 125 imaju bolje ukupno preživljavanje od onih bez uočenog pada nivoa, može se reći da ova dva markera pokazuju dobru korelaciju sa odgovorom na preduzetu hemioterapiju. Kod bolesnica sa adenokarcinomom i padom nivoa CA 125 uvek postoji sumnja da je reč o nedokazanom primarnom epitelnom tumoru ovarijuma. Korelacija pada nivoa NSE i odgovora na hemioterapiju do sada nije ispitivana.

Iako se može zaključiti da je prognostička i prediktivna vrednost najčešće korišćenih serumskih markera kod CUP sindroma ograničena, još uvek se može diskutovati o njihovom značaju u diferencijalnoj dijagnostici, odnosno izboru sistemske terapije za pojedine entitete. Od posebnog značaja

bilo bi određivanje i kliničkih sindroma koji sugerišu potencijalno kurabilna stanja, odnosno metastatske tumore sa visokom responzivnošću. Danas je uobičajeno da se tumorski markeri koriste u cilju određivanja lokacije primarnog tumora. Povišen nivo markera može da sugerise primarno mesto, ali ne i da da preciznu dijagnozu primarnog tumora. Izuzeci su PSA u dijagnostici kancera prostate, beta-HCG za dijagnozu *germ-cell* tumora, kao i, možda, AFP za dijagnozu *germ-cell* tumora ili hepatoma. Sa druge strane, povišen nivo CEA, CA 125, CA 27-29 ili CA 19-9 može samo da sugerise primarno mesto, ali ne i definitivnu dijagnozu. Stoga, ukoliko se markeri, uopšte, koriste u evaluaciji CUP sindroma, treba ih primeniti kao pomoćno sredstvo za otkrivanje porekla primarnog tumora¹⁹.

Preporuke za dijagnozu, lečenje i praćenje CUP sindroma Evropskog društva za *European Society for Medical Oncology* (ESMO) insistiraju na određivanju AFP i beta-HCG, odnosno PSA kod bolesnika, u cilju isključenja izlečnih ekstragonadnih *germ-cell* tumora i kancera prostate kod koga se mora primeniti hormonsko lečenje. Takođe, insistira se na definisanju potencijalno izlečivih tumora kao što su slabo diferentovani karcinomi sa predominantno nodalnim metastazama i bolesnici sa peritonealnom karcinomatozom i histološkim tipom adenokarcinoma²⁰.

Iako nije predmet ove studije, treba istaći sve veći značaj imunohistohemije koja mora da bude ekstenzivna, naročito u slučajevima nediferentovanih karcinoma, odnosno slabo diferentovanih adenokarcinoma. Namera je da se izbegne neprepoznavanje maligniteta tipa nehoćinskih limfoma, ekstragonadnih *germ-cell* tumora, melanoma i nediferentovanih

sarkoma. Najčešće korišćeni markeri su LCA, citokeratini 7 i 20, neuroendokrini markeri tipa NSE, hromogranin, S-100 ili vimentin. Bez obzira na histološki tip, u većini slučajeva neophodno je da se odredi PSA kod muškaraca, odnosno estrogeni i progesteronski receptori kod žena¹.

Jedno od polja daljeg napretka u rasvetljavanju ovog problema je identifikacija profila organ specifične genske ekspresije koja omogućava korišćenje molekularnih tehnika. Primer za to je identifikacija izohromozoma 12p kod retroperitonealnih i medijastinalnih slabo diferentovanih karcinoma koji indikuju *germ-cell* tumore²¹.

Krajnji cilj dijagnostičkog panela je otkrivanje podgrupe sa povoljnom prognozom i senzitivnošću na sistemsku terapiju. Najbolje terapijske odgovore daju kombinacije platinskih agenasa (cisplatin, carboplatin) sa taksanima (RR oko 12–26% uz medijanu preživljavanja 5–7 meseci). Dodatak trećeg agensa ne pokazuje dodatnu korist²². Bolesnici kod kojih nije postignut efekat kombinacijom agenasa mogu imati koristi od monoterapije gemcitabinom²³. U toku su studije II faze sa bevacizumabom i erlotinibom²⁴.

Zaključak

Povišene vrednosti serumskih tumorskih markera vrlo su česte u CUP sindromu. Ovi tumori pokazuju nespecifičnu povećanu ekspresiju tumorskih markera. Nivo NSE i CA 125 pokazuje dobru korelaciju sa odgovorom na preduzetu hemioterapiju. Ne preporučuje se, međutim, rutinska primena najčešće korišćenih serumskih tumorskih markera u svetlu prognostičke i prediktivne vrednosti.

L I T E R A T U R A

1. *Briasoulis E, Kalofonos H, Bafalonkos D, Samantas E, Fountzilas G, Xiros N, et al.* Carboplatin plus paclitaxel in unknown primary carcinoma: a phase II Hellenic Cooperative Oncology Group Study. *J Clin Oncol* 2000; 18(17): 3101–7.
2. *Abbruzzese JL, Abbruzzese MC, Lenz R, Hess KR, Raber MN.* Analysis of a diagnostic strategy for patients with suspected tumors of unknown origin. *J Clin Oncol* 1995; 13(8): 2094–103.
3. *Oien KA, Evans TR.* Raising the profile of cancer of unknown primary. *J Clin Oncol* 2008; 26(27): 4373–5.
4. *Pentheroudakis G, Briasoulis E, Pavlidis N.* Cancer of unknown primary site: missing primary or missing biology? *Oncologist* 2007; 12(4): 418–25.
5. *Ruddon RW, Norton SE.* Use of biological markers in the diagnosis of cancers of unknown primary tumors. *Semin Oncol* 1993; 20(3): 251–60.
6. *Currow DC, Findlay M, Cox K, Harnett PR.* Elevated germ cell markers in carcinoma of uncertain primary site do not predict response to platinum based chemotherapy. *Eur J Cancer* 1996; 32A(13): 2357–9.
7. *Pavlidis N, Kalef-Ezra J, Briasoulis E.* Evaluation of six tumor markers in patients with carcinoma of unknown primary. *Med Pediatr Oncol* 1994; 22: 162–7.
8. *Milović M, Popov J, Jelić S.* Tumor markers in metastatic disease from cancer of unknown primary origin. *Med Sci Monit* 2002; 8(2): MT 25–30.
9. *Parvez T, Ibraheem MI.* Diagnostic and prognostic yield of tumor markers in cancer of unknown primary site. *J Coll Physicians Surg Pak* 2006; 16(2): 154–6.
10. *Sporn JR, Greenberg BR.* Empirical chemotherapy for adenocarcinoma of unknown primary tumor site. *Semin Oncol* 1993; 20(3): 261–7.
11. *Pentheroudakis G, Pavlidis N.* Cancer of unknown primary: what kind of chemotherapy? What kind of disease? *Onkologie* 2009; 32(4): 159–60.
12. *Pejčić I, Vrbić S, Filipović S, Radić S, Pejčić Lj.* Chemotherapy in carcinomas of unknown primary site. *J BUON* 2004; 9(1): 27–31.
13. *Oken MM, Creech RH, Tormey DC, Horton J, Davis TE, McFadden ET, et al.* Toxicity and response criteria of the Eastern Cooperative Oncology Group. *Am J Clin Oncol* 1982; 5(6): 649–55.
14. *Kaplan EL, Meier P.* Nonparametric estimation from incomplete observations. *J Am Stat Assoc* 1958; 53: 458–81.
15. *Altman E, Cadman E.* An analysis of 1539 patients with cancer of unknown primary site. *Cancer* 1986; 57(1): 120–4.
16. *Hess KR, Abbruzzese MC, Lenz R, Raber MN, Abbruzzese JL.* Classification and regression tree analysis of 1000 consecutive patients with unknown primary carcinoma. *Clin Cancer Res* 1999; 5(11): 3403–10.
17. *Junginger TH, Hoefken K.* Der suchet der findet? *Onkologie* 1997; 3(4): 333–4.
18. *Pentheroudakis G, Briasoulis E, Karavassilis V, Fountzilas G, Xeros N, Samelis G, et al.* Chemotherapy for patients with two favourable subsets of unknown primary carcinoma: active, but how effective? *Acta Oncol* 2005; 44(2): 155–60.
19. *Mennel RG.* Clinical evaluation of the patient with an unknown primary tumor. In: *Perry MC*, editor. *American Society of*

- Clinical Oncology 2002 Educational Book. Baltimore, Md: Lippincott Williams & Wilkins; 2002: 327–34.
20. *Briasoulis E, Pavlidis N, Felip E.* Cancers of unknown primary site: ESMO clinical recommendations for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol* 2009; 20(Suppl 4): 154–5.
 21. *Netto GJ.* Tumors of unknown primary origin: the role of immunohistochemistry and molecular diagnostics. In: *Perry MC*, editor. American Society of Clinical Oncology 2002 Educational Book. Baltimore, Md: Lippincott Williams & Wilkins; 2002: 343–47.
 22. *Pentheroudakis G, Briasoulis E, Kalofonos HP, Fountzilas G, Economopoulos T, Samelis G, et al.* Docetaxel and carboplatin combination chemotherapy as outpatient palliative therapy in carcinoma of unknown primary: a multicentre Hellenic Cooperative Oncology Group phase II study. *Acta Oncol* 2008; 47(6): 1148–55.
 23. *Neben K, Hübner G, Folprecht G, Jäger D, Krämer A.* Metastases in the absence of a primary tumor: advances in the diagnosis and treatment of CUP syndrome. *Dtsch Arztebl Int* 2008; 105(43): 733–40.
 24. *Hainsworth JD, Spigel DR, Farley C, Thompson DS, Shipley DL, Greco FA.* Phase II trial of bevacizumab and erlotinib in carcinomas of unknown primary site: the Minnie Pearl Cancer Research Network. *J Clin Oncol* 2007; 25: 1747–52.
- Primljen 26. VI 2009.
Revidiran 14. XII 2009.
Prihvaćen 21. XII 2009.



Urgentna perkutana koronarna intervencija dovodi do pada serumske koncentracije solubilnog CD40 liganda

Urgent percutaneous coronary intervention leads to a decrease in serum concentrations of soluble CD40 ligand

Nenad Ratković*, Radoslav Romanović*, Aleksandra Jovelić†, Branko Gligić*,
Sašo Rafajlovski*, Danilo Vojvodić‡, Slobodan Obradović*

Vojnomedicinska akademija, *Klinika za urgentnu internu medicinu, †Institut za medicinska istraživanja, Beograd, Srbija; ‡Institut za kardiovaskularne bolesti Vojvodine, Klinika za kardiologiju, Sremska Kamenica, Srbija

Apstrakt

Uvod/Cilj. Vaskularne povrede nakon perkutane koronarne intervencije (PKI) i posledična inflamacija predstavljaju patološki supstrat restenoze i njenih komplikacija. Cilj ove studije bio je da se ispita periproceduralni inflamatorni odgovor izražen preko solubilnog CD40 liganda (sCD40L) i C-reaktivnog proteina (CRP) kod bolesnika lečenih primenom PKI uz dvojni antitrombocitnu terapiju (DAT). **Metode.** U eksperimentalnu grupu bila su uključena 52 bolesnika (80,8% muškaraca, starosti 60 ± 9 godina) sa anginom pektoris koji su lečeni primenom PKI (22 urgentne PKI) sa implantacijom stenta, uz DAT (jedan od tienopiridina i aspirin), prema važećim preporukama za izvođenje intervencije. Kontrolnu grupu činilo je 8 bolesnika (70,5% muškaraca, starosti 59 ± 7 godina) sa anginom pektoris, kod kojih je rađena samo koronarografija, a aspirin su dobijali tri dana pre koronarografije. Kod svih bolesnika pre i 24 h nakon PKI određivana je koncentracija CRP i sCD40L u krvi. **Rezultati.** U eksperimentalnoj grupi koncentracija sCD40L bila je niža u odnosu na kontrolnu grupu ($p < 0,02$). Kod 34 (65%) bolesnika zabeležen je postproceduralni pad sCD40L, kod

18 (34,6%) porast, dok je kod 50 (96%) bolesnika došlo do porasta CRP. Bolesnici sa postproceduralnim padom sCD40L imali su višu preproceduralnu koncentraciju sCD40L ($p < 0,001$), kao i nižu postproceduralnu koncentraciju sCD40L ($p < 0,001$) u odnosu na grupu kod koje je došlo do porasta sCD40L posle PKI, dok se nivo CRP između ovih grupa nije statistički razlikovao. Bolesnici lečeni urgentnom PKI u odnosu na bolesnike sa elektivnom PKI imali su postproceduralni pad sCD40L ($p = 0,02$). Porast nivoa CRP bio je viši u grupi urgentnih, u odnosu na elektivne PKI ($p < 0,01$). **Zaključak.** Urgentna PKI, kao procedura u lečenju bolesnika sa nestabilnom anginom pektoris, dovodi do postproceduralnog pada serumske koncentracije sCD40L. Dvojni antitrombocitna terapija, odnosno terapija sa tienopiridinima i aspirinom, inhibiše oslobađanje sCD40L. Bez obzira na kliničku prezentaciju koronarne bolesti PKI dovodi do postproceduralnog porasta serumske koncentracije CRP.

Ključne reči: arterioskleroza; zapaljenje; medijatori; angioplastika, balonska; trombociti, inhibitori agregacije.

Abstract

Background/Aim. Inflammation as a consequence of vascular injury after percutaneous coronary intervention (PCI) is a pathological substrate of restenosis and of its complications. The aim of the study was to examine periprocedural inflammatory response expressed by soluble CD40 ligand (sCD40L) and C-reactive protein (CRP) in patients treated with PCI and dual antiplatelet therapy. **Methods.** The experimental group included 52 patients (80.8% men, age 60 ± 9 years) with angina pectoris treated by PCI (22 urgent PCI) with stent implantation, and dual antiplatelet therapy (tienopiridins and aspirin), according to the current recommendations for the execution of the intervention. The con-

trol group consisted of 8 patients (70.5% men, age 59 ± 7 years) with angina pectoris, who had undergone coronary angiography taking aspirin 3 days prior to it. In all the patients 24 hours before and after the PCI concentrations of CRP and sCD40L in the blood were determined. **Results.** In the experimental group, the concentration of sCD40L was lower as compared to the control ($p < 0.02$). In 34 (65%) patients postprocedural decrease in sCD40L was recorded, in 18 (34.6%) of them increase, while in 50 (96%) patients there was a rise in CRP. The patients with postprocedural fall in sCD40L had greater preprocedural concentration of sCD40L ($p < 0.001$), and less postprocedural concentration of sCD40L ($p < 0.001$), compared to the group with an increase in sCD40L after the PCI, while CRP levels

between these groups were not statistically different. Patients treated with emergency PCI compared to elective patients had a postprocedural decrease in sCD40L ($p = 0.02$). Increase in the level of CRP was higher in the group with emergency PCI in relation to elective PCI ($p < 0.01$). **Conclusion.** Emergency PCI procedures in the treatment of patients with unstable angina pectoris lead to a postprocedural fall in the serum concentration of sCD40L. Dual anti-

plate therapy with tienopiridins and aspirin inhibits the release of sCD40L. Regardless a clinical presentation of coronary disease PCI leads to an postprocedural increase in concentrations of CRP in the serum.

Key words:
arteriosclerosis; inflammation mediators; angioplasty, balloon; platelet aggregation inhibitors.

Uvod

Prilikom perkutane koronarne intervencije (PKI) uvek dolazi do značajnog oštećenja endotela, intime i medije arterije na mestu dilatacije. Oštećenje zida krvnog suda uzrokuje aktivaciju hemostaze i inflamatorni odgovor, dva povezana procesa koja bi trebala da budu u službi reparacije oštećenog tkiva, ali su, u osnovi, komplikacija posle PKI^{1,2}. Aktivacija trombocita centralni je događaj vaskularnog odgovora na PKI, a uz već postojeću hiperreaktivnost trombocita kod bolesnika sa okluzivnom koronarnom bolešću, pogotovo kod onih sa akutnim koronarnim sindromom (AKS), predstavlja predisponirajuću faktor za aterotrombotske komplikacije. U tom kontekstu, dvojna antitrombotična terapija (DAT) sa aspirinom i tienopiridinima osnova je u prevenciji mogućih komplikacija PKI, uključujući trombozu stenta, infarkt miokarda i restenozu³⁻⁵.

Inflamacija ima glavnu ulogu u nastanku ateroskleroze i njenih komplikacija⁶. Tradicionalno definisan kao reaktant akutne faze, C-reaktivni protein (CRP) postao je prepoznatljiv kao pokazatelj inflamatornog odgovora. Pojačan inflamatorni odgovor, kao i povišene koncentracije serumskog CRP udružene su sa većim rizikom od nastanka neželjenih kardiovaskularnih događaja^{7,8} kako u zdravoj populaciji⁹, tako i kod bolesnika sa AIM, stabilnom ili nestabilnom anginom pectoris¹⁰. Sa druge strane, CRP kao pokazatelj vaskularne inflamacije (posledice vaskularne povrede nakon koronarne intervencije) korišten je u stratifikaciji rizika kod bolesnika nakon perkutane koronarne intervencije¹¹. Povišena periproceduralna serumaska koncentracija CRP udružena je sa ozbiljnim ishemijskim komplikacijama kod bolesnika nakon PKI sa ili bez implantacije stenta^{12,13}. Bazalne ili postproceduralne vrednosti CRP odličan su pokazatelj kliničkog ishoda kod bolesnika nakon PKI^{11,14}.

Jedna od važnih spona između hemostaze i inflamacije jeste aktivacija ćelija preko signalnog puta CD40 i CD40 liganda. Naime, CD40 ligand (CD40L ili CD154) je transmembranski protein, strukturno srodan faktoru nekroze tumora (TNF). CD40L prvo je bio identifikovan na aktiviranim CD4+ T-ćelijama, a njegova interakcija sa receptorom CD40 na B limfocitima je od ključnih interakcija u imunološkom odgovoru¹⁵⁻¹⁷. Međutim, CD40 i CD40L identifikovani su i na drugim ćelijama, pa i na vaskularnim, uključujući endotelne i glatkomišićne ćelije, ali i na monocitima i makrofagima, te tako, kao medijatori inflamacije, učestvuju u procesu ateroskleroze¹⁷. CD40 nalazi se i na trombocitima, dok je CD40L u α -granulama neaktivnih trombocita, ali se veoma brzo ekspri-muje na površinu posle njihove aktivacije, kada se oslobađaju i u solubilnoj formi (sCD40L)¹⁷. U stvari, glavni izvor

sCD40L, odnosno više od 95% cirkulišućeg sCD40L poreklom je iz aktivisanih trombocita^{15,18}.

Interakcija CD40L i sCD40L sa receptorom CD40 dovodi do različitog oblika inflamatornog odgovora, kao i trombo-inflamatorne reakcije endotelne ćelije¹⁹. Vezivanje CD40L za ćelije ateroma indukuje aktivaciju matriks metaloproteinaza, povećano ispoljavanje ćelijskih adhezivnih molekula, produkciju proinflamatornih citokina, hemokina i tkivnog faktora¹⁹, što ima za posledicu progresiju aterosklerotskih promena (destabilizaciju plaka i/ili intravaskularnu trombozu)^{17,20}.

Povišena serumaska koncentracija sCD40L zabeležena je kod bolesnika sa akutnim koronarnim sindromom, što koreliše sa lošom prognozom²¹⁻²³. Sem toga, vrednosti sCD40L su povišene i kod bolesnika sa hiperholesterolemijom²⁴, a imaju nezavisan prognostički značaj za nastanak neželjenih kardiovaskularnih događaja i u zdravoj populaciji²⁵. Uspesna PKI dovodi do postproceduralnog smanjenja koncentracije sCD40L, što je posebno izraženo kod bolesnika sa AKS²⁶. Sa druge strane, kod bolesnika lečenih primenom PKI periproceduralne povišene vrednosti sCD40L korelišu sa pojavom restenoze i drugim vaskularnim komplikacijama intervencije. Tokom angioplastike dolazi do aktivacije trombocita i oslobađanja sCD40L^{26,27}, a CD40/CD40L sistem inhibiše migraciju endotelne ćelije sprečavajući reendotelizaciju²⁸, indukuje ekspresiju tkivnog faktora na različitim ćelijskim tipovima, a sve to potencira prokoagulantno stanje i može da uzrokuje trombozu i/ili restenozu stenta^{29,30}.

Sve u svemu, CD40L, a posebno sCD40L, imaju ključnu ulogu u aterotrombozi, predstavljajući vezu između trombocita, inflamacije, tromboze i aterogeneze¹⁷.

Cilj ove studije bio je da se utvrdi periproceduralni inflamatorni odgovor izražen preko sCD40L i CRP kod bolesnika kod kojih postoje indikacije za lečenje perkutanom koronarnom angioplastikom sa implantacijom stenta.

Metode

Ova studija obuhvatila je 52 bolesnika hospitalno lečena u Klinici za urgentu internu medicinu Vojnomedicinske akademije (VMA) i to 17 bolesnika sa stabilnom anginom pectoris (SAP) (*Canadian Cardiovascular Society* – CCS klasa III i IV) i 35 sa nestabilnom anginom pectoris (NAP) (13 bolesnika klase IIB i 22 klase IIIB po Barunwald-u) kod kojih je na osnovu važećih indikacija za izvođenje PKI, ista sprovedena (eksperimentalna grupa). Svim bolesnicima tokom PKI implantiran je stent od nerđajućeg čelika. Kontrolnu grupu sačinjavalo je osam bolesnika koji su primljeni u Kliniku za urgentnu internu medicinu VMA zbog anginoznih tegoba i kojima je ko-

ronarografski dokazana okluzivna koronarna bolest, a nisu lečeni PKI. Bolesnici sa SAP i NAP IIB klase više od pet dana pre intervencije dobijali su najmanje 100 mg aspirina uz tienopiridine, dok je kod grupe bolesnika sa NAP IIIB klase rađena urgentna PKI, te su 3–4 sata pre intervencije dobili dozu opterećenja od 300 mg klopidogrela uz aspirin, što je podrobnije opisano u prethodno objavljenom radu³¹. Kontrolna grupa bolesnika nije bila na terapiji tienopiridinima, a aspirin (najmanje 100 mg) i heparin dobijali su najmanje do tri dana pre uzimanje krvi za analizu. Pojednostosti o premedikaciji, dijagnostici i angioplastici opisane su u prethodno objavljenom radu iz istog projekta³¹. Bolesnici sa infarktom miokarda sa elevacijom ST segmenta, postproceduralnim porastom kreatinin-kinaze većim od dva puta, sa hroničnim inflamatornim bolestima, permanentnom atrijalnom fibrilacijom, kao i valvularnim manama, nisu bili uključeni u ispitivanje.

Svim pacijentima uzeti su uzorci krvi neposredno pre intervencije, kao i 24 sata nakon intervencije, a plazma i serum bili su zamrznuti na -80 °C. Koncentracija sCD40L određivana je ELISA metodom po uputstvu proizvođača³¹, a koncentracija CRP lateks imunonefelometrijom, visokosenzitivnom metodom na aparatu BN100 (Dade Behring) u In-

stitutu za biohemiju VMA. Svi ispitanici bili su upoznati sa značajem istraživanja, a za učešće u studiji dali su pristanak.

U radu su od metoda deskriptivne statistike primenjene mere centralne tendencije i to aritmetička sredina i medijana, mere varijabiliteta – standardna devijacija i interkvartilni opseg (*interquartile range* – IQR), kao i relativni brojevi. Od metoda analitičke statistike u radu su korištene metode identifikacije empirijskih raspodela, χ^2 test za procenu značajnosti razlike učestalosti, za procenu značajnosti razlike srednjih vrednosti varijabli koje su raspoređene po normalnoj raspodeli *t*-test za nezavisne i zavisne uzorke, a za procenu značajnosti razlike srednjih vrednosti varijabli koje nisu raspoređene po normalnoj raspodeli (sCD40L i CRP) Mann-Whitney *U*-test za nezavisne uzorke i Wilcoxonov test za zavisne uzorke.

Rezultati

Opšte karakteristike bolesnika na početku ispitivanja prikazane su u tabeli 1. Kontrolna grupa bolesnika po svojim demografskim, kliničkim i angiografskim osobinama nije se statistički značajno razlikovala od ispitanika eksperimentalne grupe (tabela 1). U kontrolnoj grupi koncentracija sCD40L

Tabela 1
Karakteristike eksperimentalne i kontrolne grupe ispitanika na početku ispitivanja

Karakteristike bolesnika	Eksperimentalna grupa (n = 52)	Kontrolna grupa (n = 8)	<i>p</i>
Starost ($\bar{x} \pm SD$), godine	60 ± 9	59 ± 7	0,98
Muški pol [n (%)]	42(81)	6 (75)	0,92
Faktori rizika [n (%)]			
dijabetes melitus	10(19)	2 (25)	0,92
arterijska hipertenzija	34(65)	5 (63)	0,81
hiperholestolemija	23(44)	3 (38)	0,98
pušenje cigareta	15(29)	2 (25)	0,84
prethodni infarkt	14(27)	2 (25)	0,75
porodična anamneza	26(50)	4 (50)	0,71
Istisna frakcija leve komore ($\bar{x} \pm SD$), %	55 ± 7	57 ± 8	0,95
Klinička prezentacija [n (%)]			0,89
stabilna angina pectoris	17(33)	3 (37)	
nestabilna angina pectoris	35(67)	5 (63)	
Urgentnost PKI [n (%)]			
elektivna	30(58)		
urgentna	22(42)		
Klasifikacija lezija [n (%)]			0,81
A i B1	21(40)	3 (38)	
B2 i C	31(60)	5 (62)	
Uzročna arterija [n (%)]			0,97
LKA	32(62)	5 (62)	
ACx	12(23)	2 (25)	
DKA	8(15)	1 (13)	
Višesudovna bolest [n (%)]	29(56)	4 (50)	0,94
Tienopiridini [n (%)]			
klopidogrel	29(56)	0	
tiklopidipin	23(44)	0	
Aspirin [n (%)]	52(100)	8 (100)	
Glikoproteinski inhibitori [n (%)]	15(29)	0	
Enoksaparin [n (%)]	22(42)	3(38)	0,80
Statini [n (%)]	35(67)	5 (63)	0,89
Kreatinin kinaza ($\bar{x} \pm SD$), mmol/L	170 ± 141	155 ± 183	0,81
Trombociti ($\bar{x} \pm SD$), $\times 10^3$	185 ± 49	188 ± 50	0,93
CRP medijana (IQR), mg/L	4,71 (3,10–11,00)	5,1(3,2–12,2)	0,94
sCD40L medijana (IQR), ng/L	2,33 (1,20–3,99)	4,11 (2,2–7,1)	0,02

PKI-perkutana koronarna intervencija; LKA-leva koronarna arterija; ACx-cirkumfleksna koronarna arterija; DKA-desna koronarna arterija; CRP – C-reaktivni protein; sCD40L-solubilni CD40 ligand; IQR-interkvartilni opseg

iznosila je 4,11 (2,2–7,1) ng/mL, što je bilo statistički značajno više nego u eksperimentalnoj grupi u kojoj je koncentracija sCD40L iznosila 2,33 (1,20–3,99) ng/ml ($p < 0,02$). Nije bilo statistički značajne razlike između vrednosti CRP u kontrolnoj, 5,1 (3,2–12,2) mg/L, u odnosu na eksperimentalnu grupu, 4,7 (3,10–11,00), ($p < 0,94$).

U eksperimentalnoj grupi vrednost sCD40L pre intervencije iznosila je 2,33 (1,2–3,99) ng/mL, a posle intervencije bila je statistički neznačajno niža, 1,93 (1,04–3,01) ng/mL ($p < 0,12$). Vrednosti CRP pre intervencije bile su 4,71 (3,10–11,00) mg/L, a nakon intervencije registrovan je statistički veoma značajan porast CRP na 9,42 (4,83–19,75) mg/L ($p < 0,01$) (tabela 2).

Kod 34 (65%) bolesnika eksperimentalne grupe zabeležen je postproceduralni pad vrednosti sCD40L, a samo kod 2 (3,85%) pad vrednosti CRP. Na osnovu koncentracija sCD40L posle PKI, bolesnici eksperimentalne grupe bili su podeljeni u dve podgrupe: podgrupa 1 - kod kojih je evidentiran postproceduralni pad koncentracije sCD40L - 34 (65,4%) bolesnika, i podgrupa 2 - kod kojih je evidentiran postproceduralni porast koncentracije sCD40L - 18 (34,6%) bolesnika.

Opšte i angiografske karakteristike ovih podgrupa prikazane su u tabeli 3. Podgrupe se nisu statistički značajno razlikovale u kliničkoj prezentaciji bolesti ($p = 0,59$) i drugim karakteristikama (uključujući i upotrebu glikoproteinskih in-

Tabela 2
Vrednosti solubilnog CD40 liganda (sCD40L) i C-reaktivnog proteina (CRP) pre i posle perkutane koronarne intervencije (PKI)

Vreme određivanja	sCD40L (ng/mL)	CRP (mg/L)	<i>p</i>
	medijana (IQR)	medijana (IQR)	
Pre PKI	2,33 (1,20–3,99)	4,71 (3,10–11,00)	0,12
Posle PKI	1,93 (1,04–3,01)	9,42 (4,83–19,75)	0,001

Tabela 3
Karakteristike ispitanika u podgrupama eksperimentalne grupe

Karakteristike ispitanika	Podgrupa 1 (n = 34)	Podgrupa 2 (n = 18)	<i>p</i>
Starost ($\bar{x} \pm SD$) godine	59 \pm 9	60 \pm 9	0,71
Muški pol [n (%)]	26 (76)	16 (89)	0,28
Faktori rizika [n (%)]			
diabetes mellitus	5 (15)	5 (27,8)	0,22
arterijska hipertenzija	22 (65)	12 (67)	0,57
hiperholestolemija	12 (35)	11 (61)	0,06
pušenje cigareta	9 (27)	6 (33)	0,41
prethodni infarkt	8 (24)	5 (28)	0,5
porodična anamneza	18 (58)	8 (44)	0,39
Istisna frakcija leve komore ($\bar{x} \pm SD$), %	52 \pm 7	50 \pm 7	0,66
Klinička prezentacija [n (%)]			0,59
stabilna angina pektoris	11 (32)	6 (33)	
nestabilna angina pektoris	23 (68)	12 (67)	
Urgentnost PKI [n (%)]			0,03
elektivna	16 (47)	14 (78)	
urgentna	18 (53)	4 (22)	
Klasifikacija lezija [n (%)]			0,32
A i B1	15 (44)	6 (33)	
B2 i C	19 (56)	12 (67)	
Uzročna arterija [n (%)]			0,77
LKA	22 (65)	10 (56)	
Acx	8 (23)	4 (22)	
DKA	4 (12)	4 (22)	
Višesudovna bolest [n (%)]	21 (62)	8 (44)	0,18
Tienopiridini [n (%)]			0,98
klopidogrel	19 (56)	10 (56)	
tiklopidin	15 (44)	8 (44)	
Aspirin [n (%)]	34 (100)	18 (100)	
Glikoproteinski inhibitori [n (%)]	10 (29)	5 (28)	0,9
Enoksaparin [n (%)]	11 (32)	7(38)	0,63
Statini [n (%)]	23 (68)	12 (67)	0,94
Proceduralne karakteristike			
dužina stenta ($\bar{x} \pm SD$), mm	19,3 \pm 8	19,7 \pm 8	0,83
dijametar balona ($\bar{x} \pm SD$), mm	2,5 \pm 0,6	2,3 \pm 0,6	0,22

Podgrupa 1 – sa postproceduralnim padom sCD40L; podgrupa 2 – sa postproceduralnim porastom sCD40L; PKI – perkutana koronarna intervencija; LKA – leva koronarna arterija; ACx – cirkumfleksna koronarna arterija; DKA – desna koronarna arterija

hibitora), ali je postojala statistički značajna razlika u učestalosti urgentne PKI ($p < 0,03$). U podgrupi 1 učinjeno je 18 urgentnih PKI (53%), a u podgrupi 2 samo četiri (22%), odnosno 82% urgentnih PKI urađeno je grupi 1 (18 od 22 intervencije).

Vrednosti periproceduralnih serumskih koncentracija sCD40L i CRP prikazane su u tabeli 4. U podgrupi 1 vred-

Postojala je statistički značajna razlika u vrednosti periproceduralnog CRP⁰ između podgrupa [elektivna PKI 4,13 (3,00–6,40) mg/L u odnosu na urgentnu 10,10 (3,24–27,50) mg/L ($p = 0,02$), kao i postproceduralne vrednosti CRP¹ [elektivna PKI, 6,50 (3,33–15,37) mg/L, u odnosu na urgentnu 15,65 (5,73–49,00) mg/L ($p < 0,01$), kao i statistički visoko značajna razlika u periproceduralnim koncentracija-

Tabela 4

Periproceduralne koncentracija solubilnog CD40 liganda (sCD40L) i C-reaktivnog proteina (CRP)						
Podgrupe [n (%)]	sCD40L ⁰ (ng/L) medijana (IQR)	sCD40L ¹ (ng/L) medijana (IQR)	<i>p</i>	CRP ⁰ (mg/mL) medijana (IQR)	CRP ¹ (mg/L) medijana (IQR)	<i>p</i>
1 [34 (65)]	3,39 (2,21–7,73)	1,42 (0,74–2,29)	< 0,01	5,50 (3,20–11,20)	11,80 (5,41–24,80)	< 0,01
2 [18 (35)]	1,11 (0,64–1,97)	3,05 (2,11–5,61)	< 0,01	4,13 (2,81–10,78)	8,40 (4,39–18,10)	< 0,01
<i>p</i>	< 0,001	< 0,001		0,24	0,28	

Podgrupa 1 – sa postproceduralnim padom sCD40L; podgrupa 2 – sa postproceduralnim porastom sCD40L

⁰ – preproceduralna koncentracija; ¹ – postproceduralne koncentracija

nost sCD40L pre PKI (sCD40L⁰) bila je 3,39 (2,21–7,73) ng/mL, a u podgrupi 2 iznosila je 1,11 (0,64–1,97) ng/mL, ($p < 0,001$). Nakon PKI u podgrupi 1 dolazi do pada vrednosti sCD40L (sCD40L¹) na 1,42 (0,74–2,29) ng/mL, a u podgrupi 2 do porasta na 3,05 (2,11–5,61) ng/mL, ($p < 0,001$). Unutar samih podgrupa periproceduralna razlika koncentracija sCD40L, bila je, takođe, visokostatistički značajna ($p < 0,01$). Nije zabeležena statistički značajna razlika u preproceduralnoj koncentraciji CRP (CRP⁰) između podgrupe 1 i 2: 5,50 (3,20–11,20) mg/L u odnosu na 4,13 (2,81–10,78) mg/L ($p = 0,24$), kao ni u postproceduralnoj koncentraciji CRP (CRP¹) 11,80 (5,41–24,80) mg/L, u odnosu na 8,40 (4,39–18,10) mg/L, ($p < 0,28$). Unutar samih podgrupa postojao je statistički veoma značajan postproceduralni porast CRP ($p < 0,01$).

Periproceduralne serumске koncentracije sCD40L i CRP kod bolesnika lečenih PKI podeljenih prema urgentnosti intervencije prikazane su u tabeli 5. Između dve podgrupe

ma CRP unutar samih podgrupa pre i posle intervencije ($p < 0,01$) (tabela 5).

Diskusija

Rezultati ovog istraživanja pokazuju da je dvojna antitrombocitna terapija potentniji inhibitor oslobađanja sCD40L nego sam aspirin, što je saglasno sa drugim ispitivanjima^{3,32}. Aspirin inhibiše oslobađanje sCD40L koji nastaje kao odgovor na aktivaciju trombocita kolagenom, kao i na trombocitne agoniste zavisne od tromboksana A2³³. Takođe, aspirin snižava koncentraciju sCD40L kod bolesnika sa faktorima rizika od koronarne bolesti, kao i kod bolesnika sa ishemijskom bolešću srca, ali ne i do nivoa „normalne koncentracije“^{32,33}. Sa druge strane, tienopiridini svoje antitrombocitno dejstvo ispoljavaju selektivnom i ireverzibilnom inhibicijom aktivacije trombocita indukovane adenozin-difosfatom³³. Tienopiridini i aspirin svoj maksimalni antitrombocitni i an-

Tabela 5

Periproceduralne koncentracije solubilnog CD40 liganda (sCD40L) i C-reaktivnog proteina (CRP) (mg/L) ispitanika podeljenih prema urgentnosti perkutane koronarne intervencije (PKI)

Vrsta PKI [n (%)]	sCD40L ⁰ (ng/mL) medijana (IQR)	sCD40L ¹ (ng/mL) medijana (IQR)	<i>p</i>	CRP ⁰ (mg/L) medijana (IQR)	CRP ¹ (mg/L) medijana (IQR)	<i>p</i>
Elektivna [30 (58)]	2,23 (1,13–4,21)	2,31 (1,15–3,65)	0,76	4,13 (3,00–6,40)	6,50 (3,33–15,37)	< 0,01
Urgentna [22 (42)]	2,84 (1,24–4,01)	1,54 (0,85–2,43)	0,02	10,10 (3,24–27,50)	15,65 (5,73–49,0)	< 0,01

⁰ – preproceduralna koncentracija; ¹ – postproceduralne koncentracija

(elektivna PKI u odnosu na urgentnu PKI) nije bilo statistički značajne razlike u preproceduralnoj vrednosti sCD40L, 2,23 (1,13–4,21) ng/mL, u odnosu na 2,84 (1,24–4,01) ng/L, ($p = 0,64$), kao ni u postproceduralnoj koncentraciji sCD40L, 2,31 (1,15–3,65) ng/mL u odnosu na 1,54 (0,85–2,43) ng/mL ($p = 0,14$). Unutar samih podgrupa registrovan je statistički značajan postproceduralni pad sCD40L u podgrupi urgentne PKI sa 2,84 (1,24–4,01) ng/L na 1,54 (0,85–2,43) ng/L ($p = 0,02$), dok postproceduralni porast vrednosti sCD40L u podgrupi bolesnika lečenih elektivnom PKI nije bio statistički značajan, 2,23 (1,13–4,21) ng/L, u odnosu na 2,31 (1,15–3,65) ng/L ($p = 0,76$).

tiinflamatorni efekat postižu u prva 24 sata³³, s tim što tienopiridini, odnosno klopidogrel ima mnogo potentniji antitrombocitni efekat nego aspirin^{34,35}, a njegova efikasnost je posebno izražena u klinički manifestnim aterotrombotskim komplikacijama i/ili AKS^{33, 35–37}. U našem radu, eksperimentalna grupa imala je statistički značajno nižu koncentraciju sCD40L u odnosu na kontrolnu, što se objašnjava činjenicom da su u premedikaciji dobijali DAT, za razliku od kontrolne grupe koja je dobijala samo aspirin (nije bilo statistički značajne razlike u kliničkim, demografskim ni drugim karakteristikama podgrupa) (tabela 1). Sa druge strane, DAT ne dovodi do promene u serumskoj koncentraciji CRP, odno-

sno nema statističke značajne razlike u koncentraciji CRP između eksperimentalne i kontrolne grupe. Ovaj rezultat u saglasnosti je sa ispitivanjem koje je proučavalo efekat klopidogrela i aspirina kod bolesnika sa okluzivnom bolešću koronarnih arterija^{32, 33}.

Kao što je već naglašeno, nije bilo statistički značajne razlike između koncentracije CRP kod ispitanika eksperimentalne i kontrolne grupe, ali u obe grupe postojala je povišena vrednost CRP. Ovaj rezultat je razumljiv, jer je više od 60% bolesnika bilo sa kliničkom slikom NAP, a poznato je da bolesnici sa NAP ili AKS imaju značajno povišene bazalne vrednosti CRP^{13, 38-40}.

Nakon PKI evidentiran je pad nivoa sCD40L bez statističke značajnosti, ali i postproceduralni porast CRP i to statistički veoma značajan, što je saglasno rezultatima drugih istraživanja^{12, 13, 39}. Perkutana koronarna intervencija uzrokuje aktivaciju složene mreže inflamatornog odgovora u koju su uključeni trombociti, leukociti i drugi proinflamatorni molekuli^{1, 2}. Vaskularna povreda nakon koronarne angioplastike dovodi do skoro potpunog uništenja jednoslojnog endotelnog pokrivača uzrokujući, sa jedne strane, stvaranja trombocitno-fibrinskog pokrivača na intimi, a sa druge, ekspresiju adhezivnih molekula na aktivisanim trombocitima i endotelnim ćelijama, što ima za posledicu adheziju, aktivaciju i migraciju leukocita u subendotelni prostor gde oni sekretuju brojne citokine, faktore rasta i metaloproteinaze^{1, 2}. U suštini, u osnovi su dva fenomena kao posledice mehaničke povrede u PKI - aktivacija trombocita i sistemska stimulacija urođenog imunog sistema^{2, 41, 42}. Serumski sCD40L je pokazatelj aktivacije trombocita jer je preko 95% serumskog sCD40L poreklom iz aktivisanih trombocita, a CRP je mera nespecifičnog inflamatornog odgovora. U tom kontekstu, pada u oči nesklad između postproceduralne koncentracije ova dva pokazatelja inflamacije – statistički beznačajan pad koncentracije sCD40L i statistički veoma značajan porast CRP. Postproceduralni porast koncentracije sCD40L nije detektovan zbog moćnog antitrombocitnog efekta aspirina i klopidogrela i mehaničke eliminacije aterotrombotskog kompleksa⁴²⁻⁴⁴. Druga osobina DAT, odnosno antiinflamatorni efekat nije toliko očigledan kada je u pitanju inflamatorni odgovor izražen preko CRP^{32, 33}. Smatra se da je ruptura plaka nakon intervencije jak izvor aterotrombotskih i inflamatornih molekula, ali ruptura plaka *per se* nije glavni uzrok povišenih postproceduralnih vrednosti CRP^{39, 45, 46}. U prilog ovaj tvrdnji su i podaci da i nekomplikovana angiografija dovodi do porasta CRP, kao i podaci koji pokazuju gotovo uniformni porast CRP nakon intervencije^{13, 39}. Rezultati najvećeg broja studija govore u prilog tome da je najvažniji uzrok postproceduralnog porasta CRP vaskularna povreda prouzrokovana angioplastikom (dilatacija balonom i implantacija stenta)^{13, 41-49}. Međutim, i sama reakcija na isti mehanički stimulus, tj. povredu, je različita i može biti u osnovi detektovane koncentracije CRP, što ide u prilog hipoteze „povišene individualne reaktivnosti“, hipoteze koja nastoji da objasni različitost individualnog odgovora na slične (ili iste) patogene u procesu ateroskleroze, kao i različit inflamatorni odgovor u AKS i PKI^{39, 49}. Ovo je

potvrđeno i u istraživanjima koja su pokazala da postproceduralni porast koncentracije CRP ne zavisi ni od vrste stenta (metalni ili stent obložen lekovima), a ne koreliše ni sa postproceduralnom neointimalnom hiperplazijom⁵⁰.

Očekivan, odnosno pozitivan terapijski ishod PKI je postproceduralni pad serumske koncentracije solubilnog CD40L, što je efekat sa jedne strane mehaničke destrukcije atreosklerotskog plaka i/ili prateće aterotromboze, a sa druge strane farmakološkog dejstva DAT i pridruženih lekova na inflamatorni odgovor^{17, 26}. Ovo sa aspekta inflamacije i inflamatornog odgovora ukazuje da PKI eliminiše uzrok „povredanog inflamatornog odgovora“ što je uz primarni efekat, odnosno osnovni cilj („otvorena arterija“) i klinička svrha intervencije.

U našem istraživanju izdvaja se grupa bolesnika sa postproceduralnim padom koncentracije sCD40L (podgrupa 1) kao očekivano pozitivnim rezultatom intervencije, te podgrupa sa postproceduralnim porastom sCD40L (podgrupa 2), uz činjenicu da je u podgrupi 1 i preproceduralna vrednost sCD40L bila viša (tabela 4). U podgrupi 1 bilo je 18 ili 82% svih urgentnih PKI, dok je broj elektivnih bio skoro podjednak - 16 u podgrupi 1 i 14 u podgrupi 2. Mada bolesnici sa AKS (bez ST elevacije i bez udarne doze klopidogrela) imaju više koncentracije sCD40L pre PKI i značajno niže vrednosti sCD40L nakon 24 sata od intervencije u poređenju sa bolesnicima sa SAP koji su, takođe, bili podvrgnuti PKI^{51, 52}, navedeno ne može biti objašnjenje za promene koncentracija sCD40L u našim grupama. Ako bolesnike svrstamo po urgentnosti PKI diktiranoj kliničkim indikacijama, te uporedimo periproceduralne serumske koncentracije sCD40L bolesnika podvrgnutih elektivnim u odnosu na urgentne PKI, vidimo da se preproceduralne koncentracije nisu statistički razlikovale. To je razumljivo jer su bolesnici lečeni urgentnom PKI i najmanje tri sata pre intervencije dobili udarnu dozu klopidogrela od 300 mg, a oni sa elektivnim intervencijama najmanje pet dana uzimali su dnevnu dozu od 75 mg klopidogrela, ili tiklodipina³¹. Naime, klopidogrel svoj terapijski efekat postiže dva sata nakon primene, a efekat je dozno-zavisan, te udarna doza od 300 mg efikasno ireverzibilno inhibira agregaciju trombocita preko ADP (potpuno nakon 6 sati uz relativno stabilnu inhibiciju sledećih 48 h), a sa dnevnom dozom od 75 mg inhibicija se postiže između 3 i 7 dana³³. Takođe, izostavljanje tienopiridina iz terapije dovodi do ponovnog rasta koncentracije sCD40L nakon 24 sata^{26, 54}. Krv se kod naših bolesnika uzimala neposredno pre intervencije, te su prikazani rezultati i efekat premedikacije, što je i objašnjenje za preproceduralne statistički neznačajne razlike koncentracije sCD40 liganda između grupa elektivne i urgentne PKI. Sa druge strane, preproceduralna viša koncentracija sCD40L u podgrupi 1 je zbog sastava podgrupa (u podgrupi 1 bilo je 82% svih urgentnih i 53% svih elektivnih PKI). Sastav podgrupa za sobom povlači i odgovarajuću DAT, odnosno različite odgovore na premedikaciju lekovima čija je efikasnost doznozavisna, uz važnu napomenu koju smo već istakli, da u gorenavedenim radovima sa povišenim preproceduralnim vrednostima sCD40L u AKS pre intervencije, klopidogrel nije dat u udarnoj dozi od 300 mg^{52, 53}.

Međutim i pored „agresivne“ DAT, kod četiri (18%) bolesnika koji su bili podvrgnuti urgentnoj PKI i kod 14 (47%) bolesnika lečenih elektivnom PKA, zabeležen je postproceduralni porast sCD40L. Ovaj nalaz je u saglasnosti sa rezultatima istraživanja u kojima je opisano postojanje povećane agregabilnosti trombocita, rezistencije na DAT i/ili doznazavisne individualne reaktivnosti na antitrombocitne lekove^{31, 33, 53}.

Statistički značajan postproceduralni pad koncentracije sCD40L nakon urgentnih intervencija ukazuje da je farmakološki protokol urgentne PKI, koji podrazumeva i udarnu dozu klopidogrela od 300 mg pre intervencije, efikasan u kontroli inflamatornog odgovora i/ili aktivacija trombocita izraženog preko sCD40L.

Što se tiče serumske koncentracije CRP, pokazali smo značajno drugačije vrednosti u odnosu na sCD40L, odnosno, između grupa nije bilo statistički značajne razlike u periproceduralnim koncentracijama CRP. Objasnjenje ovakvih nalaza vraća nas na početak diskusije kada se komentarisao odnos eksperimentalne i kontrolne grupe, te postproceduralnih karakteristika eksperimentalne grupe. Između podgrupa 1 i 2 nije bilo statistički značajne razlike u periproceduralnim koncentracijama CRP, što je i razumljivo jer su podgrupe bile izjednačene po kliničkoj prezentaciji bolesti, a klinička prezentacija koronarne bolesti je i glavna odrednica serumske koncentracije CRP^{10, 45}. Sa ovim je u skladu i naš rezultat koji smo dobili posmatrajući periproceduralne koncentracije CRP kod elektivnih i urgentnih PKI. Urgentna PKI je jedna od procedura lečenja bolesnika sa AKS, a bolesnici sa AKS imaju značajno više periproceduralne koncentracije CRP nego bolesnici sa „stabilnijom“ kliničkom slikom^{10, 48}. Bolesnici lečeni urgentnom PKI imaju statistički značajno više ne samo preproceduralne, nego i postproceduralne koncentracije CRP, a evidentna je statistički značajna razlika u serumskim koncentracijama CRP pre i posle elektivne, u odnosu na urgentnu PKI.

Rezultati našeg ispitivanja ukazuju na različiti periproceduralni inflamatorni odgovor detektovan pomoću sCD40L i CRP. Naime, detektovali smo, praktično, uniformni postproceduralni porast CRP (kod 50 bolesnika – 96%), a u isto vreme postproceduralni porast sCD40L kod samo 18 bolesnika (35%) i pad sCD40L kod 34 bolesnika

(65%). Jedno od mogućih objašnjenja moglo bi da bude različito poreklo i/ili izvor ova dva inflamatorna biomarkera. C-reaktivni protein je protein akutne faze koji se primarno sintetiše i sekretuje u jetri kao nespecifičan pokazatelj inflamatornog odgovora i to veoma brzo nakon akutnog inflamatornog stimulusa¹⁰, dok je sCD40L poreklom iz aktiviranih trombocita i CD4+ T ćelija¹⁵. Mada se naše ispitivanje nije bavilo značajem ova dva biomarkera u kliničkoj prognozi, naši rezultati (iako na maloj grupi bolesnika) otvaraju pitanje upotrebne vrednosti periproceduralne koncentracije sCD40L u kliničkoj praksi, tim pre što je početni entuzijazam kliničkog značaja koncentracije sCD40L splasnulo posle objavljivanja rezultata studije Dallas Heart⁵⁵ koje pokazuju da sCD40L nema prognostički značaj u populaciji sa klinički neprimetnom aterosklerozom, kao i rezultata studije TACTICS-TIMI 18⁵⁶ koji pokazuju da sCD40L nema prognostički značaj kod bolesnika sa AKS lečenih savremenom antitrombocitnom terapijom. Činjenica da i pojedini lekovi (klopidogrel, glikoproteinski inhibitori, statini) imaju efikasno i brzo dejstvo na koncentraciju sCD40L^{24, 57, 58} dalje ograničava kliničku primenu ovog biomarkera¹⁷. Sa druge strane, nesporn je klinički značaj CRP u stratifikaciji rizika kod bolesnika sa bolešću koronarnih arterija, te se u praksi vrednost CRP poredi sa tradicionalnim faktorima rizika¹⁰.

Naše ispitivanje ima nekoliko ograničenja. Nismo bili u mogućnosti da merimo serumsku koncentraciju sCD40L pre početka antitrombocitne terapije jer je većina bolesnika imala antitrombocitnu terapiju i pre dolaska u bolnicu. Koristili smo dva različita tienopiridina. Na kraju, i broj ispitanika bio je mali, ali su, bez obzira na to, očite promene u serumskim koncentracijama biomarkera.

Zaključak

Urgentna perkutana koronarna intervencija, kao procedura u lečenju bolesnika sa nestabilnom anginom pectoris, dovodi do postproceduralnog pada serumske koncentracije sCD40L. Dvojna antitrombocitna terapija sa tienopiridinima i aspirinom inhibiše oslobađanje sCD40L. Bez obzira na kliničku prezentaciju koronarne bolesti, PKI dovodi do postproceduralnog porasta serumske koncentracije CRP.

L I T E R A T U R A

1. *Welt FG, Rogers C.* Inflammation and restenosis in the stent era. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2002; 22(11): 1769–76.
2. *Toutouzas K, Colombo A, Stefanadis C.* Inflammation and restenosis after percutaneous coronary interventions. *Eur Heart J* 2004; 25(19): 1679–87.
3. *Davi G, Patrono C.* Platelet activation and atherothrombosis. *N Engl J Med* 2007; 357(24): 2482–94.
4. *Campo G, Valgimigli M, Gemmati D, Pervoco G, Tognazzo S, Cicchitelli G, et al.* Value of platelet reactivity in predicting response to treatment and clinical outcome in patients undergoing primary coronary intervention: insights into the STRATEGY Study. *J Am Coll Cardiol* 2006; 48(11): 2178–85.
5. *Silber S, Albertsson P, Avilés FF, Camici PG, Colombo A, Hamm C, et al.* Guidelines for percutaneous coronary interventions. The Task Force for Percutaneous Coronary Interventions of the European Society of Cardiology. *Eur Heart J* 2005; 26(8): 804–47.
6. *Ross R.* Atherosclerosis-an inflammatory disease. *N Engl J Med* 1999; 340(2): 115–26.
7. *Choi H, Cho DH, Shin HH, Park JB.* Association of high sensitivity C-reactive protein with coronary heart disease prediction, but not with carotid atherosclerosis, in patients with hypertension. *Circ J* 2004; 68(4): 297–303.
8. *Mueller C, Buettner HJ, Hodgson JM, Marsch S, Perruchoud AP, Roskamm H, et al.* Inflammation and long-term mortality after non-ST elevation acute coronary syndrome treated with a very early invasive strategy in 1042 consecutive patients. *Circulation* 2002; 105: 1412–5.

9. Ridker PM, Buring JE, Cook NR, Rifai N. C-reactive protein, the metabolic syndrome, and risk of incident cardiovascular events: an 8-year follow-up of 14 719 initially healthy American women. *Circulation* 2003; 107(3): 391–7.
10. Morrow DA, Cannon CP, Jesse RL, Newby LK, Ravkilde J, Storror AB, et al. National Academy of Clinical Biochemistry. National Academy of Clinical Biochemistry Laboratory Medicine Practice Guidelines: Clinical characteristics and utilization of biochemical markers in acute coronary syndromes. *Circulation* 2007; 115(13): e356–75.
11. Iijima R, Byrne RA, Ndrepepa G, Braun S, Mehilli J, Berger PB, et al. Pre-procedural C-reactive protein levels and clinical outcomes after percutaneous coronary interventions with and without abciximab: pooled analysis of four ISAR trials. *Heart* 2009; 95(2): 107–12.
12. Saleh N, Svane B, Hansson LO, Jensen J, Nilsson T, Danielsson O, et al. Response of serum C-reactive protein to percutaneous coronary interventions has prognostic value. *Clin Chem* 2005; 51(11): 2124–30.
13. Liu PY, Li YH, Tsai WC, Chao TH, Tsai LM, Wu HL, et al. Prognostic value and the changes of plasma levels of secretory type II phospholipase A2 in patients with coronary artery disease undergoing percutaneous coronary intervention. *Eur Heart J* 2003; 24(20): 1824–32.
14. Park DW, Lee CW, Yun SC, Kim YH, Hong MK, Kim JJ, et al. Prognostic impact of preprocedural C reactive protein levels on 6-month angiographic and 1-year clinical outcomes after drug-eluting stent implantation. *Heart* 2007; 93(9): 1087–92.
15. Henn V, Shupsky JR, Gräfe M, Anagnostopoulos I, Förster R, Müller-Berghaus G, et al. CD40 ligand on activated platelets triggers an inflammatory reaction of endothelial cells. *Nature* 1998; 391(6667): 591–4.
16. Anand SX, Viles-Gonzalez JF, Badimon JJ, Cavusoglu E, Marmur JD. Membrane-associated CD40L and sCD40L in atherothrombotic disease. *Thromb Haemost* 2003; 90(3): 377–84.
17. Antoniadou C, Bakogiannis C, Tousoulis D, Antonopoulos AS, Stefanadis C. The CD40/CD40 ligand system: linking inflammation with atherothrombosis. *J Am Coll Cardiol* 2009; 54(8): 669–77.
18. Heeschen C, Dimmeler S, Hamm CW, van den Brand MJ, Boersma E, Zeiber AM, et al. CAPTURE Study Investigators. Soluble CD40 ligand in acute coronary syndromes. *N Engl J Med* 2003; 348(12): 1104–11.
19. Mach F, Schönbeck U, Sukhova G, Bourcier T, Bonnefoy JY, Pober J, et al. Functional CD40 ligand is expressed on human vascular endothelial cells, smooth muscle cells, and macrophages: implications for CD40-CD40 ligand signaling in atherosclerosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997; 94(5): 1931–6.
20. Lutgens E, Gorelik L, Daemen MJ, de Muinck ED, Grewal IS, Kotliansky VE, et al. Requirement for CD154 in the progression of atherosclerosis. *Nat Med* 1999; 5(11): 1313–6.
21. Aukrust P, Muller F, Ueland Thor BS, Berget T, Aaser E, Brunsvig BS, et al. Enhanced levels of soluble and membrane-bound CD40 ligand in patients with unstable angina. *Circulation* 1999; 100: 614–20.
22. Garlitsch CD, Eskafi S, Raaz D, Schmidt A, Ludwig J, Herrmann M, et al. Patients with acute coronary syndromes express enhanced CD40 ligand/CD154 on platelets. *Heart* 2001; 86: 649–55.
23. Tousoulis D, Antoniadou C, Nikolopoulou A, Koniari K, Vasiliadou C, Marinou K, et al. Interaction between cytokines and sCD40L in patients with stable and unstable coronary syndromes. *Eur J Clin Invest* 2007; 37(8): 623–8.
24. Cipollone F, Mezzetti A, Porreca E, Di Febbo C, Nutini M, Fazia M, et al. Association between enhanced soluble CD40L and prothrombotic state in hypercholesterolemia: effects of statin therapy. *Circulation* 2002; 106: 399–402.
25. Schönbeck U, Varo N, Libby P, Buring J, Ridker PM. Soluble CD40L and cardiovascular risk in women. *Circulation* 2001; 104: 2266–8.
26. Yip HK, Wu CJ, Yang CH, Chang HW, Fang CY, Hung WC, et al. Serial changes in circulating concentrations of soluble CD40 ligand and C-reactive protein in patients with unstable angina undergoing coronary stenting. *Circ J* 2005; 69(8): 890–5.
27. Invald DP, McDowall A, Peters MJ, Callard RE, Klein NJ. CD40 is constitutively expressed on platelets and provides a novel mechanism for platelet activation. *Circ Res* 2003; 92(9): 1041–8.
28. Santilli F, Basili S, Ferroni P, Davi G. CD40/CD40L system and vascular disease. *Intern Emerg Med* 2007; 2(4): 256–68.
29. Schönbeck U, Mach F, Sukhova GK, Herman M, Gruber P, Kebry MR, et al. CD40 ligation induces tissue factor expression in human vascular smooth muscle cells. *Am J Pathol* 2000; 156(1): 7–14.
30. Lindmark E, Tenno T, Seighabn A. Role of platelet. P-selectin and CD40 ligand in the induction of monocytic tissue factor expression. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2000; 20: 2322–8.
31. Obradović SD, Antović JP, Antonijević NM, Ratković NG, Vojvodić DV, Subota VS, et al. Elevations in soluble CD40 ligand in patients with high platelet aggregability undergoing percutaneous coronary intervention. *Blood Coagul Fibrinolysis* 2009; 20(4): 283–9.
32. Santilli F, Davi G, Consoli A, Cipollone F, Mezzetti A, Falco A, et al. Thromboxane-dependent CD40 ligand release in type 2 diabetes mellitus. *J Am Coll Cardiol* 2006; 47: 391–7.
33. Patrono C, Baigent C, Hirsh J, Roth G. Antiplatelet drugs. *Chest* 2008; 133: 199S–233S.
34. Yip HK, Chen SS, Liu JS, Chang HW, Kao YF, Lan MY, et al. Serial changes in platelet activation in patients after ischemic stroke: role of pharmacodynamic modulation. *Stroke* 2004; 35(7): 1683–7.
35. Simon T, Verstraeyt C, Mary-Krause M, Quteineh L, Dronet E, Meuneau N, et al. Genetic determinants of response to clopidogrel and cardiovascular events. *N Engl J Med* 2009; 360(4): 363–75.
36. Bhatt DL, Topol EJ. Need to test the arterial inflammation hypothesis. *Circulation* 2002; 106(1): 136–40.
37. Bhatt DL, Fox KA, Hacke W, Berger PB, Black HR, Boden WE, et al. Clopidogrel and aspirin versus aspirin alone for the prevention of atherothrombotic events. *N Engl J Med* 2006; 354(16): 1706–17.
38. Biasucci LM, Liuzzo G, Grillo RL, Caligiuri G, Rebuszi AG, Buffon A, et al. Elevated levels of C-reactive protein at discharge in patients with unstable angina predict recurrent instability. *Circulation* 1999; 99: 855–60.
39. Liuzzo G, Buffon A, Biasucci LM, Gallimore JR, Caligiuri G, Vitelli A, et al. Enhanced inflammatory response to coronary angioplasty in patients with severe unstable angina. *Circulation* 1998; 98: 2370–6.
40. Biasucci LM. CDC/AHA Workshop on Markers of Inflammation and Cardiovascular Disease: Application to Clinical and Public Health Practice: clinical use of inflammatory markers in patients with cardiovascular diseases: a background paper. *Circulation* 2004; 110(25): e560–7.
41. Danenberg HD, Welt FG, Walker M, Seifert P, Toegel GS, Edelman ER. Systemic inflammation induced by lipopolysaccharide increases neointimal formation after balloon and stent injury in rabbits. *Circulation* 2002; 105(24): 2917–22.
42. Azar RR, Kassab R, Zoghbi A, Aboujaoude S, El-Osta H, Ghorra P, et al. Effects of clopidogrel on soluble CD40 ligand and on high-sensitivity C-reactive protein in patients with stable coronary artery disease. *Am Heart J* 2006; 151: 521.e1–521.e4.
43. Kereiakes DJ. Adjunctive pharmacotherapy before percutaneous coronary intervention in non-ST-elevation acute coronary syndromes: the role of modulating inflammation. *Circulation* 2003; 108(16 Suppl 1): III22–7.
44. Quinn MJ, Bhatt DL, Zidar F, Vivekananthan D, Chew DP, Ellis SG, et al. Effect of clopidogrel pretreatment on inflammatory

- marker expression in patients undergoing percutaneous coronary intervention. *Am J Cardiol* 2004; 93: 679–84.
45. Packard RR, Libby P. Inflammation in atherosclerosis: from vascular biology to biomarker discovery and risk prediction. *Clin Chem* 2008; 54: 24–38.
46. Sano T, Tanaka A, Namba M, Nishibori Y, Nishida Y, Kawarabayashi T, et al. C-reactive protein and lesion morphology in patients with acute myocardial infarction. *Circulation* 2003; 108: 282–5.
47. Saleh N, Svane B, Jensen J, Hansson LO, Nordin M, Tornvall P. Stent implantation, but not pathogen burden, is associated with plasma C-reactive protein and interleukin-6 concentrations after percutaneous coronary intervention in patients with stable angina pectoris. *Am Heart J* 2005; 149: 876–82.
48. Ramadan MM, Kodama M, Mitsuuma W, Ito M, Kashimura T, Ikerai T, et al. Impact of percutaneous coronary intervention on the levels of interleukin-6 and C-reactive protein in the coronary circulation of subjects with coronary artery disease. *J Am Coll Cardiol* 2006; 98: 915–7.
49. Linuzzo G, Biasucci LM, Gallimore JR, Caligiuri G, Buffon A, Rebuffi AG, et al. Enhanced inflammatory response in patients with preinfarction unstable angina. *J Am Coll Cardiol* 1999; 34(6): 1696–703.
50. Kang WC, Ahn TH, Moon CI, Han SH, Shin EK, Kim JS, et al. Comparison of inflammatory markers and angiographic outcomes after implantation of sirolimus and paclitaxel-eluting stents. *Heart* 2009; 95(12): 970–5.
51. Wainstein MV, Bento da Silva DP, Ribeiro JP. Coronary stent implantation may seal the inflammatory response in patients with acute coronary syndromes. *Int J Cardiol* 2007; 130: 503–4.
52. Jaumdally RJ, Varma C, Blann AD, MacFadyen RJ, Lip GY. Platelet activation in coronary artery disease: intracardiac vs peripheral venous levels and the effects of angioplasty. *Chest* 2007; 132(5): 1532–9.
53. Prasad A, Holmes DR. Update on dual antiplatelet therapy for percutaneous coronary intervention. *Heart* 2009; 95(11): 861–5.
54. Sanguigni V, Pignatelli P, Lenti L, Ferro D, Bellia A, Carnevale R, et al. Short-term treatment with atorvastatin reduces platelet CD40 ligand and thrombin generation in hypercholesterolemic patients. *Circulation* 2005; 111(4): 412–9.
55. de Lemos JA, Zirlik A, Schönbeck U, Varo N, Murphy SA, Khera A, et al. Associations between soluble CD40 ligand, atherosclerosis risk factors, and subclinical atherosclerosis: results from the Dallas Heart Study. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2005; 25(10): 2192–6.
56. Morow DA, Sabatine MS, Brennan ML, de Lemos JA, Murphy SA, Ruff CT et al. Concurrent evaluation of novel cardiac biomarkers in acute coronary syndrome: myeloperoxidase and soluble CD40 ligand and the risk of recurrent ischaemic events in TACTICS-TIMI 18. *Eur Heart J* 2008; 29: 1096–102.
57. Anwaruddin S, Askari A, Topol E. Redefining risk in acute coronary syndromes using molecular medicine. *J Am Coll Cardiol* 2007; 49(3): 279–89.
58. Han SH, Kob KK, Quon MJ, Lee Y, Shin EK. The effects of simvastatin, losartan, and combined therapy on soluble CD40 ligand in hypercholesterolemic, hypertensive patients. *Atherosclerosis* 2007; 190: 205–11.

Primljen 1. VII 2009.
Revidiran 23. III 2010.
Prihvaćen 12. IV 2010.



Profesionalni stres kod lekara opšte prakse i psihijatarata – nivo psihičkog distresa i rizika od *burnout* sindroma

Professional stress in general practitioners and psychiatrists – the level of psychologig distress and burnout risk

Sreten Vićentić*, Aleksandar Jovanović†, Bojana Dunjić‡, Zorana Pavlović†, Milutin Nenadović‡, Nenad Nenadović§

*Opšta bolnica, Šabac, Odeljenje za psihijatriju, Šabac, Srbija; †Klinički centar Srbije, Institut za psihijatriju, Beograd, Srbija; ‡Specijalna psihijatrijska bolnica „Laza Lazarević“, Beograd, Srbija; §Vojnomedicinska akademija, Klinika za psihijatriju, Beograd, Srbija

Apstrakt

Uvod/Cilj. Dosadašnja istraživanja stresa pokazuju da je lekarska profesija u visokom riziku od obolevanja od psihičkih i somatskih poremećaja povezanih sa profesionalnim stresom, što može voditi značajnom poremećaju ličnog, porodičnog i profesionalnog funkcionisanja. Cilj ovog istraživanja bio je da se utvrdi nivo izloženosti lekara profesionalnom stresu, da se uporedi nivo stresa u grupi lekara opšte prakse sa nivoom stresa u grupi psihijatarata i stepen rizika od nastanka *burnout* sindroma. **Metode.** Za ovu studiju preseka ispitanici su izabrani metodom slučajnog uzorka. Trideset lekara opšte prakse i 30 psihijatarata (ukupan uzorak 60 lekara) popunili su tri testa – upitnika: Sociodemografski upitnik, Opšti zdravstveni upitnik (*General Health Questionnaire* – GHQ, Goldberg D, 1991), Masleč inventar izgaranja (*Maslach Burnout Inventory* – MBI, Maslach C, 1996). U interpretaciji rezultata korišćeni su Pearsonov χ^2 -test, *t*-test i analiza varijanse. **Rezultati.** Ukupni nivo psihičkog distresa meren GHQ testom u obe grupe lekara bio je jako nizak, što pokazuje da je ukupni uzorak lekara u ovom radu bio dobrog mentalnog zdravlja. Dobijena razlika u riziku od *burnout* sindroma na osnovu MBI testa između grupa lekara bila je statistički značajna ($\chi^2 = 4,286; p < 0,05$) samo kod supskale lične ispunjenosti poslom (MBI-PA), kao posledica većeg broja lekara opšte prakse sa srednjim *burnout* rizikom (13,3% prema 0,0%). Međutim, pokazano je da je visokim rizikom od *burnout* sindroma bilo ugroženo čak 35 lekara iz ukupnog uzorka, prema supskalama emocionalne iscrpljenosti (MBI-EE) i depersonalizacije (MBI-DP), što pokazuje da su lekari u obe grupe veoma ugroženi rizikom od nastanka *burnout* sindroma. **Zaključak.** Postoji visok rizik od nastanka *burnout* sindroma i u grupi lekara opšte prakse i u grupi psihijatarata. Ni u jednoj grupi lekara nije bilo prisutnih psihičkih poremećaja (anksioznosti, depresije, insomnije...). Međutim, utvrđen je visok stepen osećaja emocionalne iscrpljenosti i prenapregnutosti poslom, kao i konstantan osećaj neprijatnosti uzrokovan profesionalnim naporom, te smanjeno ukupno zadovoljstvo poslom. Nivo izloženosti profesionalnom stresu viši je u populaciji lekara opšte prakse nego u populaciji psihijatarata, ali dobijena razlika nije statistički značajna.

Ključne reči:

sagorevanje na radu, sindrom; lekari, porodični; psihijatrija; stres, psihički.

Abstract

Background/Aim. So far, studies of stress have shown that physicians are at a high risk of sickness from psychic and somatic disorders related to professional stress, that can lead to important disturbance of personal, familiar and professional functioning. The aim of this study was to investigate the doctors exposition level to professional stress, to compare stress level in general practitioners (GP) group with that in the group of psychiatrists and risk level for the appearance of burnout syndrome. **Methods.** This cross-section study included subjects recruited by a random sample method. Thirty General Practice doctors and 30 psychiatrists (totally 60 doctors) filled the set of 3 questionnaires: Sociodemographics features, General Health Questionnaire (GHQ; Goldberg D, 1991), and Maslach Burnout Inventory (MBI; Maslach C, 1996). Appropriate statistical procedures (Pearson test, *t*-test, variance analysis) in interpretation of the results were used. **Results.** A total level of psychic distress measured with the GHQ test in both groups of physicians was very low implying their good mental health. A difference in Burnout risk based on MBI test between the groups was statistically significant ($\chi^2 = 4,286; p < 0.05$) only at subscale Personal Accomplishment (MBI-PA); it was a consequence of a higher number of GPs with medium burnout risk (13.3 : 0.0%). However, even 35 physicians from the sample were affected with a high burnout risk measured with subscales Emotional Exhaustion (MBI-EE) and MBI-DP, showing that both groups of physicians had risk for the appearance of burnout syndrome. **Conclusion.** The obtained results showed a high burnout risk level in both, GPs and psychiatrists, groups. In both groups there was no presence of psychic disorders (anxiety, depression, insomnia), while there was a high level of emotional exhaustion and over-tension by job, and also a lower total personal accomplishment. Level of exposition to professional stress is higher in GPs than in psychiatrists, but the difference was not statistically significant.

Key words:

burnout, professional; physicians, family; psychiatry; stress, psychological.

Uvod

Radni ili stres vezan za profesiju ima relativno kratku istoriju u naučnom razmatranju. Iako nas počeci vraćaju u 1920. godinu i laboratorijska istraživanja fiziologa, šira upotreba ove kategorije javila se u posleratnom periodu. Prilagodavajući se ideološkim stavovima „hladnog rata“ mnoga rana istraživanja bazirala su se na širenju i razvijanju metoda za „regrutovanje“ mentalno zdravog, „elastičnog“ osoblja (naročito u vojnom kontekstu) i maksimalnoj produktivnosti u traženim uslovima. Tokom 1960-tih i 1970-tih godina u istraživanjima u SAD dominirala je teorija uloge stresa, čiji je fokus bio uglavnom baziran na subjektivnim karakteristikama i ličnim atributima više nego na situacionim karakteristikama vezanim za odgovor na stres. Ova krajnje individualizovana koncepcija uloge stresa efikasno je depolitizovala razmatranja o stresu na radu. Ali odgovor na pitanje zašto je jedan posao stimulirajući za jednog radnika, a na drugom deluje potpuno stresno, dat je tek 2000-te godine¹. Johanes Zigris ovo je objasnio u svom modelu stresa na radu nazvanom „trud-nagrada neslaganje“ (ERI model). Ovaj model „trud-nagrada“ baziran je na premisi da radni status pruža mogućnost napretka u poslu i samoeфикаsnosti, ali da su psihološke beneficije udružene i u recipročnoj vezi sa individualnim ulaganjem truda koji slede adekvatne nagrade (novac, napredak u karijeri i druge mogućnosti). Nedostatak reciprociteta, na primer, posao na kojem se čovek mnogo „troši“ i malo zaraduje, vodi emocionalnom distresu i poremećaju autonomnog nervnog sistema, što sve ostavlja posledice na zdravlje²⁻⁶. To je slučaj kod veoma zahtevnih i istovremeno nesigurnih poslova. Objasnjeno je da je ovaj model „trud-nagrada“ dosta primenljiv i često korišćen u službama i profesijama koje se bave radom sa ljudima, kao što je, na primer, lekarska profesija.

Burnout je stanje mentalne iscrpljenosti koje zahvata profesije koje se bave radom sa ljudima kao što su predavači, medicinske sestre, lekari i druge. Prvi put opisao ga je 1970. godine Frojdenberger, psihijatar koji je lično patio od tog sindroma.

Burnout sindrom (sindrom izgaranja, sagorevanja) je fenomen kome su podložne „pomagačke profesije“, a posebno stručnjaci koji rade na zaštiti i unapređenju mentalnog zdravlja. Upravo rad na očuvanju mentalnog zdravlja, u svakodnevnom kontaktu sa bolesnicima, zahteva jednu posebnu interpersonalnu dimenziju⁷⁻¹⁰.

U istraživanjima u svetu i kod nas, sprovedenim u poslednjih 20-tak godina, od kada se termin *burnout* sindrom i sreće u stručnoj literaturi¹¹⁻¹⁵, podaci pokazuju da tzv. sekundarna traumatizacija, odnosno problemi osoba koje rade na zbrinjavanju i psihološkoj podršci traumatizovanih, a posebno žrtava torture, nasilja i emocionalnog i fizičkog zlostavljanja, mogu voditi i ozbiljnijim psihopatološkim manifestacijama kao što su depresija, anksioznost, iritabilnost, nizak prag frustracione tolerancije i značajno smanjenje nivoa profesionalnog i opšteg životnog zadovoljstva.

Najznačajnije komponente *burnout* sindroma su osećanje emocionalne i fizičke iscrpljenosti, izmenjen odnos pre-

ma bolesnicima (depersonalizovanost), smanjeno lično zadovoljstvo poslom.

Burnout sindrom udružen je sa osećajem niskog zadovoljstva karijerom i smanjenim radnim performansama, što sve vodi nižem kvalitetu pružanja zdravstvenih usluga od strane profesionalaca – lekara koji su ugroženi ovim sindromom. U distribuciji stresora u ispitivanju 1 755 lekara u primarnom sektoru u Švajcarskoj¹⁶, najveći značaj imali su opšta preopterećenost, opterećenost u odnosu na zdravstveno osiguranje, teškoće da se uravnoteži profesionalni i privatni život, promena u sistemu zdravstvene zaštite i nesigurnost (pouzdanost) medicinskih usluga. Takođe, pronađeno je da je rizik od pojave sindroma bio viši kod muškaraca nego kod žena, i interesantno je da se *burnout* javljao u velikom broju i kod lekara koji rade u seoskim područjima.

Cilj ovog istraživanja bio je da se utvrdi nivo izloženosti lekara profesionalnom stresu, da se uporedi nivo stresa u grupi lekara opšte prakse sa nivoom stresa u grupi psihijatara i stepen rizika od nastanka *burnout* sindroma.

Metode

Ispitanike ove studije sačinjavalo je 30 lekara opšte prakse i 30 psihijatara, prosečne starosti 44 godine, od kojih su 48 bili ženskog, a 12 muškog pola. Ispitivanje je obavljeno u periodu od 15. 01. 2006. do 15. 04. 2006. u Zdravstvenom centru (ZC) „Dr Laza K. Lazarević“ u Šapcu i Institutu za psihijatriju Kliničkog centra Srbije (KCS) u Beogradu, kao opservaciona analitička – studija preseka, a ispitanici su izabrani metodom slučajnog izbora. Prilikom regrutovanja ispitanika poštovan je kriterijum da je opis radnog mesta gotovo identičan za sve u grupi lekara opšte prakse, svi zaposleni u ZC Šabac, kao i u grupi psihijatara, jedna polovina zaposlena u ZC Šabac, a druga u KCS. Ispitivanjem tendenciozno nisu obuhvaćeni psihijatri zaposleni u velikim psihijatrijskim bolnicama, jer se njihov opis radnog mesta razlikuje od kolega u gorenavedenim ustanovama.

Ispitanici su nakon detaljnog objašnjenja studije i po odobrenju direktora ustanove u kojoj su zaposleni, dobrovoljno popunjavali upitnike samoprocene koji su kasnije obrađeni u saradnji sa statističarem i psihologom.

Opšti zdravstveni upitnik (*General Health Questionnaire* – GHQ)¹⁷ meri osećaj napetosti, depresije, nesposobnosti za odbranu, nesanicu zasnovanu na anksioznosti, nedostatak samopouzdanja i samopoštovanja i druge simptome poremećaja psihičkog funkcionisanja. Postoje četiri varijante ovog upitnika, a varijanta GHQ-12, koja je korišćena u ovom istraživanju, preporučena je za merenje psihološkog distresa. Test sadrži 12 stavki (pitanja) na koja su ponuđena četiri gradirana odgovora (bolje nego obično, isto kao i obično, manje nego obično, mnogo manje nego obično). Prva dva odgovora (bolje nego obično, isto kao i obično) boduju se 0, a druga dva (manje nego obično, mnogo manje nego obično) boduju se 1 bodom. Maksimalni skor (broj bodova na testu) je 12, a mogući opseg 0–12. Skor od 4 i veći, znači moguće prisustvo psihičkog distresa, a skor od 8 i veći znači sigurno prisustvo različitih simptoma psihičkih poremećaja izazvanih stresom.

Masleč inventar izgaranja (*Maslach Burnout Inventory* – MBI)¹⁸ ima tri strukturne celine i meri: osećaj emocionalne iscrpljenosti i prenapregnutosti poslom, depersonalizaciju, odnosno osećaj neprijatnosti uzrokovan naporom i smanjeno lično zadovoljstvo poslom.

Test se sastoji od 22 stavke (tvrdnje) koje su gradirane (bodovane) u sedam kategorija od 0 do 6 (0 – nikada, 1 – nekoliko puta godišnje ili manje, 2 – jednom mesečno ili manje, 3 – nekoliko puta mesečno, 4 – jednom nedeljno, 5 – nekoliko puta nedeljno, 6 – svakog dana).

Stavke od 1 do 9 čine supskalu emotivne iscrpljenosti (EE). Stavke od 10 do 14 (5 stavki) čine supskalu depersonalizacije (DP). Stavke od 15 do 22 (8 stavki) čine supskalu lične ispunjenosti poslom (PA). Ukoliko je vrednost na testu za EE veća od 26, postoji visok rizik od nastanka *burnout* sindroma, i/ili ako je vrednost na testu za DP veća od 9, takođe postoji visok rizik od nastanka *burnout* sindroma. Vrednost manja i jednaka 18 na supskali EE predstavlja mali rizik, a vrednost od 19 do 26 srednji rizik od *burnout*-a. Što se

podataka, i neparametarska analiza varijanse za proporcije za neparametarske podatke. U analizi povezanosti korišćene su metode jednostruke i višestruke korelacije i regresije. U svim primenjenim analitičkim metodama nivo značajnosti bio je 0,05. Za pravljenje baze i obradu podataka upotrebljen je program Instituta i Katedre za medicinsku statistiku i informatiku Medicinskog fakulteta u Beogradu.

Rezultati

U strukturi grupa lekara prema polu, nije bilo razlike po grupama. Analiza ostalih obeležja pokazala je relativnu ujednačenost u pogledu osnovnih porodičnih karakteristika, kao i u pogledu zdravstvenih karakteristika. Razlika u zadovoljstvu kvalitetom života postojala je u korist lekara psihijata, ali nije bila statistički značajna. Jedina statistički značajna razlika bila je u konzumiranju alkohola, tj. psihijatri češće (umereno) konzumiraju alkoholno piće od lekara opšte prakse (tabela 1).

Tabela 1

Sociodemografski podaci o ispitanicima

Karakteristike ispitanika	Lekari opšte prakse n (%)	Lekari psihijatri n (%)	χ^2	<i>p</i>
Muški pol	6	24	0,000	1,000
Ženski pol	6	24	0,000	1,000
Oženjen/udata	22 (73)	18 (60)	3,269	0,195
Ima svoj stan	21 (70)	26 (87)	4,465	0,107
Živi u zajednici sa roditeljima	8 (27)	6 (20)	5,558	0,235
Sam izdržava članove porodičnog domaćinstva	23 (77)	29 (97)	5,264	0,072
Hronično oboljenje kod ispitanika	9 (30)	4 (13)	2,455	0,117
Hronično oboljenje kod člana porodičnog domaćinstva	7 (23)	3 (10)	1,920	0,166
Pije (umereno)	13 (43)	21 (70)	4,344	0,037*
Puši	7 (23)	12 (40)	1,953	0,377
Uzima sedative	7 (23)	8 (27)	1,840	0,398
Zadovoljan kvalitetom svog života	22 (73)	26 (87)	4,356	0,113

* statistički značajno

tiče PA supskale, mali rizik od *burnout*-a predstavlja skor veći i jednak 40, srednji rizik je od 39 do 34, a visok rizik označava skor manji i jednak 33, ali se generalni zaključak o prisustvu *burnout* sindroma ne može doneti izolovano posmatrajući supskalu PA, već relevantniji značaj imaju supskale EE i DP. Supskala PA relevantna je samo ukoliko je potvrđena sa EE ili DP skalom. Ukupan skor je moguć u opsegu 0 – 132.

U statističkoj obradi rezultata, u zavisnosti od prirode samih varijabli, korišćeni su Pirsonov χ^2 test, i to u obliku testova slaganja i tablica kontingencija, za poređenje razlike između učestalosti kod neparametarskih obeležja i to za jedno, odnosno dva obeležja. Kod numeričkih ograničenja tablice 2 puta 2 primenjen je Fišerov test tačne verovatnoće. Za poređenje prosečnih vrednosti parametarskih obeležja upotreбили smo Studentov *t*-test za dve grupe podataka. Kao neparametarske dopune kod nezavisnih uzoraka primenjen je test sume rangova, a kod zavisnih test ekvivalentnih parova. Kod poređenja tri ili više grupa podataka korišćena je Fišerova parametarska analiza varijanse (ANOVA) kod parametarskih

Analiza dobijenih rezultata na testu GHQ i MBI pokazala je da između grupa nije bilo statistički značajne razlike (tabela 2).

Masleč testom izgaranja (MBI), tačnije supskalom emocionalne istrošenosti (EE), dobili smo rezultate iznad granice za visok rizik od nastanka *burnout* sindroma kod većine lekara, i u grupi lekara opšte prakse i kod psihijata. Veći broj psihijata nego lekara opšte prakse imao je vrednosti iznad granice za visok rizik, ali razlika po grupama nije bila statistički značajna. Vrednosti dobijene supskalom depersonalizacije (DP), takođe, bile su iznad granice za visok rizik od nastanka *burnout* sindroma kod većeg broja ispitanika, dok je kod nešto manjeg broja bio prisutan srednji nivo rizika. Takođe, razlika po grupama nije bila statistički značajna, ali je i ovde bio veći ukupan broj psihijata kod kojih su bile prisutne visoke vrednosti, nego kod lekara opšte prakse.

Ukupni nivo psihičkog distresa meren testom GHQ u obe grupe lekara bio je jako nizak, što pokazuje da je ukupni uzorak lekara u ovom radu bio dobrog mentalnog zdravlja.

Tabela 2

Težina psihičkog distresa i rizik od nastanka burnout sindroma u grupi lekara opšte prakse i grupi psihijatarata

Test - upitnik	\bar{x}	SD	t test	p
GHQ			0,456	0,650
lekari opšte prakse	1,6333	2,2816		
psihijatri	1,3667	2,2512		
MBI-EE			-1,322	0,191
lekari opšte prakse	28,8333	6,0291		
psihijatri	29,1333	6,2749		
MBI-DP			-1,668	0,101
lekari opšte prakse	10,0667	5,7532		
psihijatri	12,2667	4,3702		
MBI-PA			1,148	0,256
lekari opšte praksa	24,0667	6,4001		
psihijatri	22,4000	4,7241		

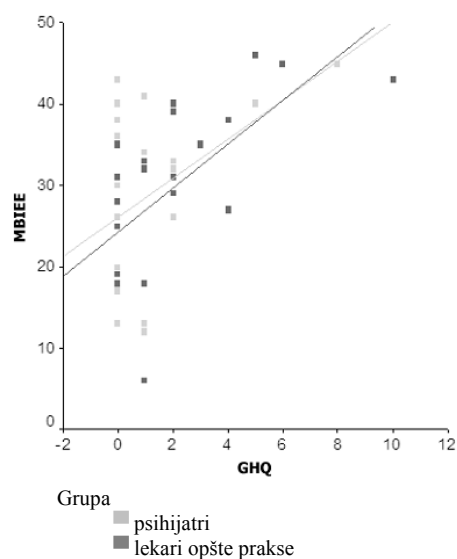
GHQ – Opšti zdravstveni upitnik (*General Health Questionnaire*); QL – test Kvalitet života (*Quality of life*); MBI – Masleč Inventar Izgaranja (*Maslach Burnout Inventory*); koji se sastoji od tri supskale: MBI-EE – supskala emocionalne iscrpljenosti; MBI-DP – supskala depersonalizacije (*Depersonalisation*); MBI-PA – supskala zadovoljstva poslom (*Personal Accomplishment*)

Dobijena razlika kod ukrštanja nalaza *burnout* rizika, na osnovu skora testa MBI kod obe grupe ispitanika (tabela 3), bila je statistički značajna ($\chi^2 = 4,286$; $p < 0,05$) samo kod supskale MBI-PA, a bila je posledica većeg broja lekara opšte prakse sa srednjim nivoom rizika od *burnout*-a (13,3% prema 0,0%). Međutim, očigledno je da je visokim rizikom od *burnout*-a ugroženo čak 35 lekara iz ukupnog uzorka, prema supskalama MBI-EE i MBI-DP, što pokazuje da su lekari u obe grupe veoma ugroženi rizikom od nastanka *burnout* sindroma.

Analiza povezanosti ukupnog (*total*) testa GHQ i testa MBI-EE u obe grupe ispitanika bila je statistički visokoznačajna ($r = 0,565$; $p < 0,01$), što znači da povećanje ukupnog skora na GHQ testu, tj. povećanje stepena psihičkog distresa, uslovljava i više skorove na testu MBI-EE, odnosno viši stepen emocionalne iscrpljenosti poslom (slika 1).

Diskusija

Dosadašnja istraživanja stresa pokazuju da je lekarska profesija u visokom riziku od obolevanja od psihičkih i somatskih poremećaja povezanih sa profesionalnim stresom,



Sl. 1 – Korelacija stepena psihičkog distresa na Opštem zdravstvenom upitniku (*General Health Questionnaire* – GHQ) i stepena rizika od *burnout*-a na testu Masleč inventar izgaranja (*Maslach Burnout Inventory*) – supskala emocionalne iscrpljenosti (*Emotional Exhaustion*) – MBI-EE

Tabela 3

Učestalosti stepena rizika od burnout sindroma na supskalama *Maslach Burnout Inventory* (MBI) kod grupe lekara opšte prakse i grupe psihijatarata

Grupe ispitanika	EE rizik (%)		
	mali i srednji <i>burnout</i> rizik		visok <i>burnout</i> rizik
lekari opšte prakse (n = 30; 100%)	37		63
psihijatri (n = 30; 100%)	47		53
Svega (n = 60; 100%)	42		58
Grupe ispitanika	MBI-DP rizik (%)		
	mali <i>burnout</i> rizik	srednji <i>burnout</i> rizik	visok <i>burnout</i> rizik
lekari opšte prakse (n = 30; 100%)	13	40	47
psihijatri (n = 30; 100%)	3	27	70
Svega (n = 60; 100%)	8	33	59
Grupe ispitanika	MBI-PA rizik (%)		
	mali <i>burnout</i> rizik	Srednji <i>burnout</i> rizik	
lekari opšte prakse (n = 30; 100%)	87	13	
psihijatri (n = 30; 100%)	100	0	
Svega (n = 60; 100%)	93	7	

MBI-EE: supskala emocionalne iscrpljenosti (*Emotional Exhaustion*) na testu Masleč inventar izgaranja (*Maslach Burnout Inventory*); MBI-DP: supskala depersonalizacije (*Depersonalisation*) na testu Masleč inventar izgaranja (*Maslach Burnout Inventory*); MBI-PA: supskala zadovoljstva poslom (*Personal Accomplishment*) na testu Masleč inventar izgaranja (*Maslach Burnout Inventory*)

što može voditi značajnom poremećaju ličnog, porodičnog i profesionalnog funkcionisanja¹⁹⁻²¹. Utvrđeno je da je u svakodnevnom susretu lekara sa bolešću, bolom, tugom, patnjom i ljudskom nesrećom potreban balans brojnih aspekata složene lekarske uloge, i da je sposobnost podnošenja stresnih situacija od posebnog značaja u ispunjavanju profesionalnih obaveza^{22, 23}.

Tradicionalno je poznato da su lekari opšte prakse na prvoj liniji kontakta sa bolesnikom. Bolesnici se prvo njima obraćaju za sve svoje zdravstvene probleme, najčešće očekujući previše, što je nerealno. Takođe, lekari opšte prakse imaju malu autonomiju u poslu, konstantan pritisak usled očekivanja nastavka stručnog usavršavanja, više rada „na papiru“, a niža primanja od specijalista.

Psihijatri, iako imaju veća primanja i profesionalno su više realizovani, sreću se sa specifičnom patologijom i specifičnom vrstom transfera i kontratransfera sa bolesnikom. Sa druge strane, psihijatri su na određen način edukovani kako da se bore protiv stresa, poseduju širi spektar odbrambenih mehanizama^{24, 25}.

Opštim zdravstvenim upitnikom (GHQ) prosečno je zabeležen niži skor od graničnih vrednosti koje bi ukazivale na prisustvo psihičkog distresa. Međutim, kod jednog broja ispitanika vrednosti su pokazale moguće prisustvo psihičkih poremećaja, a nekoliko ispitanika imalo je vrednosti koje su ukazivale na manifestne psihičke poremećaje. Učestalost ovih poremećaja odgovarala je podacima dobijenim u sličnim istraživanjima na Novom Zelandu i Velikoj Britaniji^{26, 27}.

Veliki broj studija u Engleskoj bavio se fenomenom psihološkog distresa na poslu kod doktora i ostalih zdravstvenih radnika. U okviru Nacionalne zdravstvene službe (NHS) obavljeno je više istraživanja^{28, 29}. U poređenju sa vrednostima testa GHQ u našoj studiji, kod lekara u Engleskoj zabeležen je značajno viši nivo psihičkog distresa, tj. prisustvo mentalnih poremećaja. Kod ispitanika u našoj studiji nije bilo uopšte manifestnih psihičkih poremećaja, ali bi, s obzirom na relativno mali uzorak, bilo prejudicirano zaključiti ili tvrditi da su lekari u našoj zemlji, i pored sličnog stepena opterećenja profesionalnim stresom, mentalno otporniji. Da li je to tako, i u kojoj meri su te razlike prisutne, mogla bi biti tema nekih budućih istraživanja.

U vezi sa stresorima kod lekara, treba istaći da je specifičnost kod lekara opšte prakse to što su oni, na prvoj liniji kontakta sa bolesnikom, često u nemogućnosti da izađu u susret svim bolesnikovim zahtevima, kao i da neretko postoji frustriranost nemogućnošću, ili bar neizvesnošću profesionalnog napretka, dok kod psihijatarata postoji objektivni problem svakodnevnog rada sa vrlo specifičnom psihopatologijom, sa ljudskim emocijama i duševnom patnjom. Takođe, jedna od razlika koja bi mogla da ima uticaja u ukupnoj percepciji profesionalnog stresa, jeste i visina prihoda, gde su psihijatri u prednosti. Na ovo ukazuju podaci dobijeni u više studija^{30, 31}.

Dovodenjem u vezu rezultata testa GHQ i supskale MBI-EE, uočena je pozitivna korelacija kod istih ispitanika, tj. povećanje stepena psihičkog distresa, uslovljava i više skorove na testu MBI-EE, odnosno viši stepen emocionalne iscrpljenosti poslom, što je takođe, bilo očekivano³².

Psihosocijalni izazovi sa kojima se suočavaju lekari današnjice razmatrani su, takođe, u Švedskoj. Jedan broj stresora u medicinskoj praksi predstavljaju suočavanja sa emocionalno napetim situacijama, sa ljudskom patnjom, sa strahom, sa seksualnošću, sa povredama i sa smrću^{33, 34}.

Ranije studije pronašle su da nivo distresa opada sa porastom iskustva kod lekara, odnosno starošću lekara. Rezultati jedne studije u Litvaniji pokazali su veći nivo psihološkog distresa i veće patnje na poslu kod starijih doktora konsultanata nego kod mladih porodičnih lekara. Mnoge promene u bolničkoj organizaciji kao i reforma bolnice odrazile su se na doktore konsultante, dok su mladi porodični lekari imali manji broj radnih sati. Sa druge strane, mladi porodični lekari imali su ukupno manji nivo zadovoljstva poslom i manju autonomiju u poslu, ali su bili zadovoljniji ukupnim brojem časova rada. Organizacija posla i raspoređivanje kadrova prema adekvatnim karakteristikama, čak i starosnim, značajno bi smanjila stres i povećala produktivnost na određenim radnim mestima. Ovo nam sugerise da bi doktori konsultanti mogli imati koristi od redukcije preopterećenosti poslom, dok bi mladi porodični lekari mogli imati koristi od veće autonomije. To bi u oba slučaja smanjilo nivo psihološkog distresa³⁵.

Najveća motivacija za studente koji su izabrali medicinsku profesiju na prvom mestu je želja da pomažu drugim ljudima. Preovladava mišljenje da će im rad sa bolesnicima doneti ličnu satisfakciju. Objektivno, potrebno je mnogo mentalne elastičnosti i samopregora pri suočavanju sa brojnim stresorima profesije, da bi usledila gratifikacija.

Ovo nam sugerise da bi u našoj zemlji mogli biti unapređeni programi informisanja i edukacije srednjoškolaca, za izbor budućeg fakulteta, tj. profesije. Poželjno je detaljno upoznavanje budućih lekara sa brojnim specifičnostima lekarskog posla.

Sva istraživanja profesionalnog stresa ukazuju na značaj organizacije posla, rasporeda i selekcije kadrova, programa obrazovanja lekara za prevenciju profesionalnog stresa, a sve u cilju veće produktivnosti i kvalitetnijeg pružanja zdravstvenih usluga, kao i zaštitu mentalnog zdravlja lekara, koji su pregaoci u izuzetno specifičnoj i humanoj profesiji³⁶.

Generalno, svi dobijeni rezultati u našem istraživanju ne odstupaju značajno od podataka iz svetske literature i u skladu su sa očekivanjima³⁷⁻⁴⁰.

Zaključak

Ovo istraživanje pokazalo je da postoji visok rizik od nastanka *burnout* sindroma i u grupi lekara opšte prakse i u grupi psihijatarata. Ni u jednoj grupi lekara nema prisutnih psihičkih poremećaja (anksioznosti, depresije, insomnije). Međutim, utvrđen je visok stepen osećaja emocionalne iscrpljenosti i prenapregnutosti poslom, takođe i konstantan osećaj neprijatnosti uzrokovan profesionalnim naporom, kao i smanjeno ukupno zadovoljstvo poslom. Nivo izloženosti profesionalnom stresu viši je u populaciji lekara opšte prakse, nego u populaciji psihijatarata. Dobijena razlika, iako prisutna, nije statistički značajna.

L I T E R A T U R A

1. *Siegrist J.* Work stress and beyond. *Eur J Public Health* 2000; 10(3): 233–4.
2. *Calnan M, Waimwright D, Almond S.* Job strain, effort-reward imbalance and mental distress: a study of occupations in general medical practice. *Work & Stress* 2000, 14: 297–311.
3. *Karasek R, Theorell T.* Healthy work: stress, productivity, and the reconstruction of working life. New York, NY: Basic Books; 1990. pp. 89–103.
4. *Kosović D.* Stress. Beograd: Savana; 1989.
5. *Hatcher S, House A.* Life events, difficulties and dilemmas in the onset of chronic fatigue syndrome: a case-control study. *Psychol Med* 2003; 33(7): 1185–92.
6. *Huby G, Gerry M, McKinstry B, Porter M, Shaw J, Wrate R.* Morale among general practitioners: qualitative study exploring relations between partnership arrangements, personal style, and workload. *BMJ* 2002; 325(7356): 140.
7. *Millon T, Davis R.* Personality disorders in modern life. New York: Wiley; 2000.
8. *Mumford DB, Naqir M, Jilani FU, Baig IY.* Stress and psychiatric disorder in the Hindu Kush: a community survey of mountain villages in Chitral, Pakistan. *Br J Psychiatry* 1996; 168(3): 299–307.
9. *Pearlin LI.* The sociological study of stress. *J Health Soc Behav* 1989; 130: 1241–56.
10. *Tully A.* Stress, sources of stress and ways of coping among psychiatric nursing students. *J Psychiatr Ment Health Nurs* 2004; 11(1): 43–7.
11. *Vesel J, Marić J.* Various problems in the diagnosis and treatment of patients with psychosomatic diseases. *Srp Arh Celok Lek* 1976; 104(10): 767–73. (Serbian)
12. *Schattner P.* Stress in general practice: how can GPs cope? *Aust Fam Physician* 1998; 27(11): 993–8.
13. *Schmoldt RA, Freeborn DK, Klevit HD.* Physician burnout: recommendations for HMO managers. *HMO Pract* 1994; 8(2): 58–63.
14. *Alshallah S.* Job satisfaction and motivation: how do we inspire employees? *Radiol Manage* 2004; 26(2): 47–51.
15. *Marmot M, Siegrist J, Theorell T, Feeney A.* Health and the psychosocial environment at work. In: *Marmot M, Wilkinson RG*, editors. Social determinants of health. Oxford, UK: Oxford University Press; 1999. p. 105–31.
16. *Goebbing C, Bouvier Gallacchi M, Künzi B, Bovier P.* Psychosocial and professional characteristics of burnout in Swiss primary care practitioners: a cross-sectional survey. *Swiss Med Wkly* 2005; 135: 101–8.
17. *Goldberg D, Williams P.* A user's guide to the General Health Questionnaire. Windsor, UK: NFER-Nelson; 1991.
18. *Maslach C, Jackson SE, Leiter M.* Maslach Burnout Inventory, Manual. Palo Alto, CA: Consulting Psychologists Press; 1996.
19. *Edwards N, Kornacki MJ, Silversin J.* Unhappy doctors: what are the causes and what can be done? *BMJ* 2002; 321: 110.
20. *Chambers R, Wall D, Campbell I.* Stresses, coping mechanisms and job satisfaction in general practitioner registrars. *Br J Gen Pract* 1996; 46(407): 343–8.
21. *Forde R, Aasland OG, Akre V.* General practitioners, community physicians and hospital physicians—how different are they? *Tidsskr Nor Lægeforen* 1996; 116(23): 2781–6. (Norwegian)
22. *Winefield H, Murrell T, Clifford J.* Sources of occupational stress for Australian GPs, and their implications for postgraduate training. *Fam Pract* 1994; 11(4): 413–7.
23. *Kagan J.* Three seductive ideas. Cambridge, MA: Harvard University Press; 1998.
24. *Kalićanin P, Lečić-Toševski D.* The book on stress. Belgrade: Medicinska knjiga; 1994. (Serbian)
25. *McEwen BS, Stellar E.* Stress and the individual. Mechanisms leading to disease. *Arch Int Med* 1993; 153: 2093–101.
26. *Sadock BJ, Sadock VA.* Kaplan and Sadock's Synopsis of Psychiatry. 9th ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2003. pp. 654.
27. *Cocco E, Gatti M, de Mendonça Lima CA, Camus V.* A comparative study of stress and burnout among staff caregivers in nursing homes and acute geriatric wards. *Int J Geriatr Psychiatry* 2003; 18(1): 78–85.
28. *Prosser D, Johnson S, Kuipers E, Szumukler G, Bebbington P, Thornicroft G.* Perceived sources of work stress and satisfaction among hospital and community mental health staff, and their relation to mental health, burnout and job satisfaction. *J Psychosom Res* 1997; 43(1): 51–9.
29. *Willcock SM, Daly MG, Tennant CC, Allard BJ.* Burnout and psychiatric morbidity in new medical graduates. *Med J Aust* 2004; 181(7): 357–60.
30. *McCue JD.* The effects of stress on physicians and their medical practice. *N Engl J Med* 1982; 306: 458–63.
31. *Sargent MC, Sotile W, Sotile MO, Rubash H, Barrack RL.* Stress and coping among orthopaedic surgery residents and faculty. *J Bone Joint Surg Am* 2004; 86-A(7): 1579–86.
32. *Arnetz BB.* Psychosocial challenges facing physicians of today. *Soc Sci Med* 2001; 52: 203–13.
33. *Lazarus RS.* Emotion and adaptation. New York: Oxford University Press; 1991.
34. *Egorov KN, Dubrova VP.* Psychological factors in general practice. *Klin Med (Mosk)*. 2003; 81(2): 62–6. (Russian)
35. *Eckman P, Davidson R.J.* The nature of emotion: fundamental questions New York: Oxford University Press; 1995. pp. 321–8.
36. *Ashworth M, Armstrong D.* Sources and implications of dissatisfaction among new GPs in the inner-city. *Fam Pract* 1999; 16(1): 18–22.
37. *Boultinghouse OW, Hammack GG, Vo AH, Dittmar ML.* Assessing physician job satisfaction and mental workload. *Telemed J E Health* 2007; 13(6): 715–8.
38. *Godlee F.* The role of the doctor. *BMJ* 2007; 335(7628): 1000.
39. *Sloan FA, Rattliff JR, Hall MA.* Effects of state managed care patient protection laws on physician satisfaction. *Med Care Res Rev* 2007; 64(5): 585–99.
40. *Perseus KI, Käver A, Ekdahl S, Asberg M, Samuelsson M.* Stress and burnout in psychiatric professionals when starting to use dialectical behavioural therapy in the work with young self-harming women showing borderline personality symptoms. *J Psychiatr Ment Health Nurs* 2007; 14(7): 635–43.

Primljen 3. VII 2009.

Revidiran 2. XI 2009.

Prihvaćen 23. XII 2009.



Significance of vascular endothelial growth factor expression in skin melanoma

Značaj ekspresije vaskularnog endotelnog faktora rasta kod melanoma kože

Vesna Gajanin*, Zdenka Krivokuća*, Kristina Kostić[†], Radoslav Gajanin[‡],
Igor Sladojević*

*School of Medicine, Institute for Anatomy, Banja Luka, Bosnia and Herzegovina;

[†]Military Medical Academy, Clinic for Skin Diseases, Belgrade, Serbia;

[‡]Clinical Center Banja Luka, Institute for Pathology, Banja Luka, Bosnia and Herzegovina

Abstract

Background/Aim. Melanoma is a heterogeneous disease of skin and mucous membranes which shows significant increase in incidence worldwide in the past decades. In the process of forming new blood vessels stimulators of angiogenesis participate. There is an increase production of vascular endothelial growth factor (VEGF-C and VEGF-D), which expression cause change of endothelial cells, and higher degree of tumor's aggressiveness. The aim of this research was to determine the level of VEGF expression in skin melanoma in different body regions and in different primary stages of the disease. **Methods.** The research was conducted on bioptic materials of skin in 39 patients. On excision-made materials a routine histological preparation was done and following parameters were determined: histological type, alteration thickness (according to Breslow), Clark level, TNM (Tumor Nodus Metastasis) stage (pT), alteration width, thickness of lymphocytic infiltration in the tumor, mitotic index, phase of the tumor growth, presence of ulcerations, cellular type of the tumor, localization and

level of VEGF expression. **Results.** Analysis confirmed that 61.54% of skin melanoma showed a high VEGF expression. Nodular and acral lentiginous melanomas showed more frequently a high level of VEGF expression, while superficial spreading melanoma showed a lower level of VEGF expression ($p = 0.032$, $p < 0.05$). A higher level of expression was present in thicker melanomas (higher in the Breslow stage; $p = 0.011$, $p < 0.05$). The width of the lesion did not have an influence on the level of VEGF expression in melanoma ($U = 142.000$, $p = 0.273$). **Conclusion.** Melanomas show a higher level of VEGF expression. Nodular and acral lentiginous types of melanoma show a high level of VEGF expression, while superficial spreading melanoma shows a lower level of VEGF expression. Melanomas in higher-stage disease (Breslow, Clark, pTNM) show a higher level of VEGF expression.

Key words:

melanoma; neoplasm staging; angiogenesis inducing agents; vascular endothelial growth factor; histological techniques.

Apstrakt

Uvod/Cilj. Melanom je heterogeno oboljenje kože i sluznica koje u posljednjim decenijama pokazuje izrazito povećanje incidencije u celom svetu. U procesu nastanka novih krvnih sudova učestvuju stimulatori angiogeneze. Povećava se produkcija vaskularnog endotelnog faktora rasta (VEGF-C i VEGF-D) čijom ekspresijom dolazi do promene endotelnih ćelija što za posledicu može imati veći stepen agresivnosti tumora. Cilj istraživanja bio je da se utvrdi stepen ekspresije VEGF u melanomima kože različitih regija u različitim primarnim stadijumima bolesti. **Metode.** Istraživanje je obuhvatalo biopsijske materijale kože 39 bolesnika. Na materijalima koji su dobijeni ekscizijom urađena je rutinska histološka obrada i određeni su sledeći parametri: histološki tip, debljina promene (Breslow), Clark nivo, TNM (tumor nodus metastaza) stadijum (pT), širina promene, gustina limfocitnog infiltrata u tumoru, mitotski indeks, faza rasta tumora, prisustvo ulceracije, ćelijski tip tumora, lokalizacija i ste-

pen ekspresije VEGF. **Rezultati.** Analizom je utvrđeno da 61,54% melanoma kože pokazuje visoku ekspresiju VEGF. Nodularni i akralni lentiginozni tip melanoma češće pokazuju visoki stepen ekspresije VEGF, a površinski šireći melanom češće niski stepen ekspresije VEGF ($p = 0,032$, $p < 0,05$). Viši stepen ekspresije prisutan je u melanomima koji su deblji (viši stadijum prema Breslow) ($p = 0,011$, $p < 0,05$). Širina lezije ne utiče na stepen ekspresije VEGF u melanomu ($U = 142,000$, $p = 0,273$). **Zaključak.** Melanomi pokazuju visok stepen ekspresije VEGF. Nodularni i akralni lentiginozni tip melanoma pokazuju visoku ekspresiju VEGF, a površinski šireći melanom pokazuje nisku ekspresiju VEGF. Melanomi u višem stadijumu bolesti (Breslow, Clark, pT) pokazuju veći stepen ekspresije VEGF.

Ključne reči:

melanom, maligni; neoplazme, određivanje stadijuma; angiogeneza, induktori; faktori rasta endotela krvnih sudova; histološke tehnike.

Introduction

Melanoma is a heterogeneous disease of the skin and mucous membranes which shows a significant increase in worldwide incidence in the past decades (from 2.7 to 6.0 on 100 000 residents per year in men and from 4.6 to 8.5 on 100 000 residents in women). The total incidence is the highest in Australia and between 1980 and 1990 it tripled^{1, 2}. Risk factors for the onset and development of melanoma are numerous, but the most frequently mentioned is exposure to sunlight^{3,4}.

Melanoma is more likely to occur on the head, neck and trunk in men and the lower leg in women^{5,6}. The two phases of tumor progression are described: radial and vertical phase of the melanoma growth. On the basis of clinical and biological characteristics the World Health Organization (WHO) has offered the classification of melanoma where are (because of the frequency) particularly described the superficial spreading melanoma, nodular and acral lentiginous melanoma⁷.

Angiogenesis implies the creation of new capillary blood vessels from the existing vascular network and is a very complex process that involves extravasation of proteins and plasma, decomposition of extracellular matrix, migration and proliferation of endothelial cells and forming of capillary tubes⁸. All processes that occur during this angiogenic cascade are regulated by various factors, stimulators and inhibitors whose balance limits the process⁹.

Stimulators of angiogenesis are: growth factor of endothelial cells of blood vessels (VEGF), basic and acidic fibroblast growth factors (b-FGF, aFGF, FGF-2, FGF-1), endothelial cell growth factor originating from platelets (PD-ECGF), angiopoietin-1 and others^{10,11}. VEGF is a soluble homodimeric glycoprotein that binds to the receptors with tyrosine kinase activity on endothelial cells^{12,13}. Five subtypes of VEGF with different molecular weight are described. Among them, VEGF-B (23 kd) and VEGF-C (34 kd) have a significant place^{13,14}. Angiogenesis in the skin is regularly associated with an increased expression of VEGF in epidermal keratinocytes¹⁵. Explanation of why melanoma spreads faster in lymphogenic than hematogenic pathway is given by the information about the increased production of factors VEGF-C and VEGF-D, whose expression changes endothelial cells in the lymph vessels and consequently there is an increase of the degree of tumor progression^{16,17}. VEGF is required in the process of angiogenesis because it represents a specific mitogen for endothelial cells, allows their migration and increases the permeability of blood vessels¹¹.

Data from the literature indicate a low level of expression of VEGF in benign melanocyte alterations (nevi). The authors suggest that increased expression of VEGF in dysplastic nevi may be an indicator of preneoplastic alterations in melanocyte lesions¹⁸. A group of authors stated that estimation of VEGF expression might help in differential diagnosis among dysplastic nevi and melanoma and that VEGF may be a "candidate for targeted treatment"¹⁹. Piscane and Risio²⁰ have found expression of VEGF and VEGFR-2 in benign and malignant melanocyte alterations. They have

found that cytoplasmatic and nuclear membrane expression of VEGFR-2 is associated with progression of melanocyte lesions to invasive melanoma.

Melanocyte alterations show expression of VEGF, regardless of clinical behavior: benign melanocyte alterations more often indicate a low level of VEGF expression and malignant melanocyte alterations more often show a high level of VEGF expression²¹.

Inhibitors of angiogenesis are thrombospondins (TSP), angiostatin, platelet factor 4 (PF 4), angiostatic steroids and some other substances²²⁻²⁴.

Numerous diseases in dermatology, including malignant neoplasms, have factors of stimulation or inhibition of angiogenesis as an important component, which could in the future enable the effective treatment of patients suffering from these diseases²⁵. Targeted treatment with angiogenesis inhibitors decreases the possibility of creating new blood vessels in tumor, and thus indirectly affects tumor cells and slows tumor growth and development²⁶.

Angiogenic factors exhibit their effects on endothelial cells directly or indirectly. Highly vascularized tumors have a higher metastatic potential compared to less vascularized tumors, and researches show that the number of metastases is directly proportional to the number of released tumor cells in circulation²⁷. Angiogenesis is a necessary step for the onset and for the end of the metastatic process. With vascularization of the primary tumor begins expansive growth and tumor gets metastatic potential²⁸⁻³⁰.

The aim of this study was to determine the level of VEGF expression in melanoma of the skin of different regions, and to determine the correlation between the level of VEGF expression and morphologic prognostic parameters (histological type, ulceration, inflammatory infiltrate density, mitotic index, stage of disease, stage of growth and cell type).

Methods

The research included bioptic materials of the skin of 39 patients, performed in the Clinical Center of Banja Luka in the period from 2004 to 2007. Histological analysis established the diagnosis of skin melanoma (primary skin melanoma).

In all subjects we determined: histological type by analysing of histological samples according to the WHO histological classification⁷; thickness change (Breslow), measured vertically in millimeters from the granular layer of the epidermis to the place of deepest invasion, or from the base of the defect to the place of deepest invasion; Clark level histologically and by the layers of tumor location (level I to level V)⁷; pTNM stage on the basis of histological analysis and insight into the history of the disease, according to the 7th pTNM classification^{29,30}; width of the lesion microscopically in millimeters, from one side edge of the alteration to the other side edge; tumor infiltration by lymphocytes (absent – no lymphocytes in the tumor stroma; rare infiltrate present – from 1 to 10 lymphocytes on one visual field in high magnification; medium dense infiltration pres-

ent – from 11 to 20 lymphocytes on one visual field in high magnification; dense infiltration present – more than 20 lymphocytes on one visual field in high magnification). Assessment was done in the stroma of the tumor and on the border of the tumor and surrounding tissue; mitotic index: the number of mitosis was determined in 10 visual fields in high magnification. The width of visual field was 1.4 mm. Visual fields which were quantified represent the peripheral parts of the tumor (to the surrounding tissue); estimation of growth phase: radial growth phase – present or absent (lentigo malignant, acral lentiginous, superficial spreading type); vertical growth phase – present or absent (expansive tumor clusters located in the papillary and / or reticular dermis)⁷; the presence of ulceration: assessed histologically based on the continuity of the epidermis above the lesion (present or absent ulceration); cell type of the tumor: epitheloid cells, spindle cells, mixed type (epitheloid + spindle cells); localization: alterations were classified according to localization into the following subgroups: head and neck, trunk, extremities; expression of VEGF: assessment of expression from 0 to 3.

Epitope demasking was performed by pretreatment in a microwave oven and by soaking of slides in Target Retrieval Solution pH 9.0 (Daco S2367). As the primary antigen we used commercial mouse monoclonal anti-human VEGF antibody (Daco M7273), the concentration of VG1 with 1:25 dilution. For visualization we used the LSAB + (Daco K0690) system and chromogen DAB Liquid (K3466).

The presence or absence of factors and the intensity of their presence was valued by a semiquantitative scale from 0 to 3, taking as an internal control level of immunostaining of keratinocytes.

Quantification was as follows: score 0 – no difference in immunostaining for VEGF between melanocytes and keratinocytes; score 1 to 3 – a higher level of VEGF expression in tumor cells compared to keratinocytes; score 1 – less than 25% tumor cells showed expression of higher intensity compared with the level of staining of keratinocytes; score 2 – 25 to 75% of tumor cells showed expression of higher intensity compared with the level of staining of keratinocytes; score 3 – more than 75% tumor cells showed expression of higher intensity compared with the level of staining of keratinocytes.

The results were analyzed by methods of descriptive and correlative statistics. Statistical analysis was performed using the SPSS software version 15.0, and the following tests were applied: χ^2 and the related methods of analysis of categorical variables (Fisher's exact test, Kendall's Tau test) and Mann Whitney U- test.

Results

Our research was done on bioptic materials of 39 patients (23 women and 16 men) performed in the Clinical Center of Banja Luka in the period from 2004 to 2007. Based on the analyzed materials a diagnosis of primary melanoma of the skin was established.

The youngest examinee was 18 years old and the oldest one 85 years. The average age of all examinees was 58.66

years. Melanomas in our material belonged to the following histological types: nodular type in 31 (79.49%) cases, superficial spreading melanoma of the in 6 (15.38%) cases and acral lentiginous type in 2 (5.13%) cases.

Characteristics of examinees are presented in Table 1.

The study found that a low level of expression of VEGF was present in 38.46% of the cases – level 0 and 1, while a high level of expression was present in 61.54% of the cases – level 2 and 3 (Table 2) (Figures 1 and 2). More often, a high expression of VEGF was verified (score 2 and 3 – $\chi^2 = 8.487$ with a df 3; $p = 0.037$, $p < 0.05$).

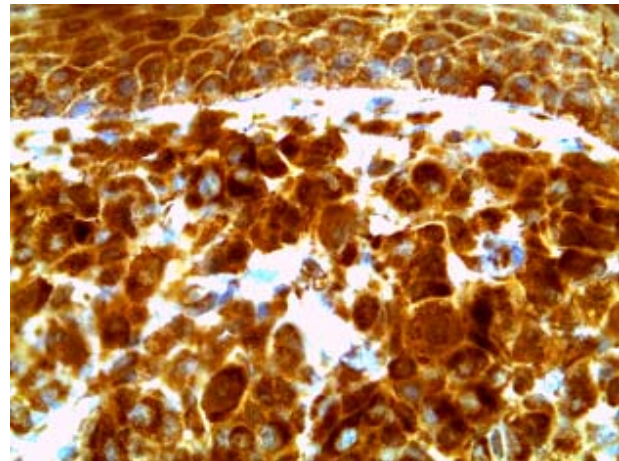


Fig. 1 – High level of VEGF expression in melanoma, score 2 (anti-VEGF; x400)

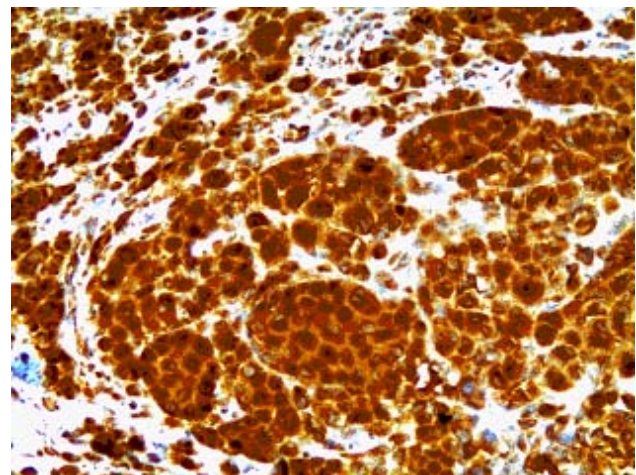


Fig. 2 – High level of VEGF expression in melanoma, score 3 (anti-VEGF; x200)

Table 2 presents the relationship between histologic type of melanoma and expression of VEGF in accordance with the WHO classification. There was a statistically significant difference in the level of VEGF expression in melanoma due to the histological type. Nodular and acral lentiginous type of melanoma more often showed a high level of expression of VEGF, while superficial spreading melanoma often showed a low level of VEGF expression ($\chi^2 = 6.858$ with a degree of freedom $df = 2$, $p = 0.032$, $p < 0.05$).

Table 1

Characteristics of the examinees		
Characteristics	Years	Number of examinees
Age	average 58.66	
Localization		13
head and neck		11
trunk		15
extremities		
Histologic type of melanoma		31
nodular		6
superficial spreading		2
acral lentiginous		
Ulceration		22
present		17
absent		
Mitotic activity /10HPV		15
0–5		11
6–10		13
>10		
Clark		0
I		5
II		8
III		14
IV		12
V		
Breslow		2
I (0–0.75 mm)		5
II (0.76–1.50 mm)		32
III (>1.50 mm)		
TNM		2
pT1a		1
pT1b		4
pT2a		2
pT2b		4
pT3a		6
pT3b		5
pT4a		15
pT4b		
Growth phase		1
radial		25
vertical		13
vertical and radial		
Level of VEGF expression		2
0		13
1		13
2		11
3		

TNM – Tumor Nodus Metastasis; VEGF – vascular endothelial growth factor

The presence of defects (ulcerations) in the epidermis was verified in 22 (56.41%) of the cases. Table 2 shows the relationship between VEGF expression and the presence or absence of ulcerations. There was a statistically significant difference in the level of VEGF expression and the presence of ulcerations – $\chi^2 = 4.545$ with a degree of freedom (df) 1 where $p = 0.033$ ($p < 0.05$). In the cases of verified ulcerations, the level of VEGF expression was mainly high score, 2 and 3.

The average value of Breslow level (thickness of lesion) in melanoma with the level of immunostaining 0 for VEGF was 4.25 mm, with the level 1 of immunostaining for VEGF was 5.37 mm, with the level 2 was 4.23 mm, and for melanomas with the level 3 of immunostaining for VEGF mean value of Breslow level was 14.51 mm (Table 3). Based on the analysis by χ^2 test we could conclude that

there was a statistically significant difference in the level of VEGF expression and thickness of the lesion in skin melanomas – $\chi^2 = 11.211$ with the degree of freedom $df = 3$ where $p = 0.011$ ($p < 0.05$). A higher level of expression was present in thicker melanomas (higher level according to Breslow).

In melanoma with level 0 of immunostaining of VEGF, level of invasion according to Clark was IV in one of the cases, and V in the other one. In melanomas with the level of immunostaining 1 for VEGF, the level of invasion according to Clark was II in 3 of the cases (23.07%), III in 4 of the cases (30.76%), IV in 3 of the cases (23.07%), and V in 3 cases (23.07%). In melanomas with level 2 of immunostaining for VEGF, the level of invasion according to Clark was II in 2 of the cases (15.38%), III in 4 of the cases (30.76%), IV in 5 of the cases (38.46%), and V in 2 of the cases (15.38%).

Table 2

Prognostic parameters in melanoma	Level of immunostaining for VEGF			
	0 2 (5.13%)	1 13 (33.33%)	2 13 (33.33%)	3 11 (28.21%)
Histologic type				
nodular	2 (6.45%)	8 (25.81%)	11 (35.48%)	10 (32.26%)
superficial spreading		5 (83.33%)	1 (16.67%)	
acral lentiginous			1 (50%)	1 (50%)
Presence of ulceration				
present	1 (4.54%)	5 (22.73%)	7 (31.82%)	9 (40.91%)
absent	1 (5.88%)	8 (47.06%)	6 (35.29%)	2 (11.77%)
TNM				
pT1a		2 (15.38%)		
pT1b		1 (7.69%)		
pT2a		2 (15.38%)	2 (15.38%)	
pT2b		1 (7.69%)	1 (7.69%)	
pT3a	1 (50%)		2 (15.38%)	1 (9.09%)
pT3b			5 (38.46%)	1 (9.09%)
pT4a		3 (23.07%)	1 (7.69%)	1 (9.09%)
pT4b	1 (50%)	4 (30.76%)	2 (15.38%)	8 (72.72%)
Density of lymphocytic infiltrate				
dense infiltrate	2 (8%)	12 (48%)	5 (20%)	6 (24%)
medius dense infiltrate		1 (12.5%)	4 (50%)	3 (37.5%)
rare infiltrate			3 (60%)	2 (40%)
Mitotic activity				
0–5/10HPF		8 (53.33%)	5 (33.33%)	2 (13.34%)
6–10/10HPF	1 (9.09%)	3 (27.27%)	4 (36.37%)	3 (27.27%)
> 10/10HPF	1 (7.96%)	2 (15.38%)	4 (30.77%)	6 (46.16%)
Growth phase				
radial	1 (4%)	6 (24%)	11 (44%)	7 (28%)
vertical		1 (100%)		
vertical and radial	1 (7.69%)	6 (46.16%)	2 (15.38%)	4 (30.77%)
Cell type				
epitheloid	1 (3.22%)	12 (38.71%)	10 (32.26%)	8 (25.81%)
spindle	1 (20%)	1 (20%)	1 (20%)	2 (40%)
mixed			2 (66.67%)	1 (33.33%)
Localization				
head and neck	1 (7.69%)	7 (53.85%)	3 (23.07%)	2 (15.39%)
trunk		5 (45.46%)	3 (27.27%)	3 (27.27%)
extremities	1 (6.67%)	1 (6.67%)	7 (46.66%)	6 (40%)

TNM – Tumor Nodus Metastasis; VEGF – vascular endothelial growth factor

Table 3

Relationship between the level of VEGF expression and average thickness and width of melanoma

Characteristics of melanoma	Level of immunostaining for VEGF			
	0	1	2	3
Average thickness (mm)	4.25	5.37	4.23	14.51
Average width (mm)	8.6	14	9.91	28.47

VEGF – vascular endothelial growth factor

In melanomas with the degree 3 of immunostaining for VEGF, the level of invasion according to Clark was IV in 6 of the cases (54.54%), and V in remaining 5 of the cases (45.45%). Based on the analysis by Kendall's tau b test, no statistically significant difference was found in the level of VEGF expression and level of invasion according to Clark (Kendall's tau $b = 0.244$, $p = 0.063$).

Table 2 presents the results of the level of expression of VEGF and the TNM (pT) stage of melanoma. A higher level of expression was present in melanoma in advanced stage of the disease. Statistical analysis using Kendall's tau c test

showed that there was a statistically significant difference in the level of expression of VEGF and pT stage of melanoma (Kendall's tau $c t = 0.259$, $p = 0.050$ and $p < 0.05$). Melanomas in higher pT stage of the disease showed a higher expression of VEGF (score 2 and 3).

The average value of width of lesion for melanomas with the level of immunostaining 0 for VEGF was 8.6 mm. The average width of melanoma lesion with the level 1 of immunostaining for VEGF was 14 mm, with level 2 mean lesion width was 9.91 mm, and in melanoma with the level 3 of immunostaining for VEGF average lesion width was

28.47 mm (Table 3). Based on statistical analysis using Mann-Whitney test, we concluded that there was no statistically significant difference in the level of expression of VEGF and width of lesions in melanomas ($U = 142.000$, $p = 0.273$).

In the analyzed material inflammation infiltrate was present in 38 (97.44%) cases. Inflammation infiltrate was generally dense (Table 2). In case of low expression of VEGF (score 0 and 1) there was usually dense inflammation infiltrate in 14 (93.33%) of the cases. Dense inflammation infiltrate was also present in most of the cases of high expression of VEGF (score 2 and 3), in 11 (47.83%) of the cases. On the basis of statistical analysis it was concluded that there was a statistically significant difference in the level of expression of VEGF and the density of lymphocyte infiltrates – $\chi^2 = 8.555$ with a degree of freedom (df) 2 where $p = 0.014$ ($p < 0.05$). The low level of expression of VEGF was more often verified in melanomas with dense lymphocyte infiltrate, and high level of expression was verified in melanomas with rare lymphocyte infiltrate.

In our research measuring of mitotic activity in 10 consecutive visual fields in high magnification was done. Regarding the mitotic activity, alterations were divided into three categories: 0 to 5/10HPF, from 6 to 10/10HPF, and 11 and over /10HPF. Relationship of VEGF expression and mitotic activity of tumor cells was shown in Table 2. Based on Kendall's tau-c test, we found that there was no statistically significant difference in the level of VEGF expression in relation to the level of mitotic activity (Kendall's tau $c t = 0.256$, $p = 0.060$).

Melanocyte malignant alterations (melanomas) in our material were in advanced stages, and in most cases were in vertical growth phase. Dominantly vertical growth phase was verified in 25 (64.1%) of the cases. The presence of vertical and radial growth phase was verified in 13 (33.33%) of the cases. In one of the cases (2.56%) only radial growth phase was verified. Table 2 shows the relationship between the level of VEGF expression and stage of tumor growth. On the basis of statistical analysis we concluded that there was a statistically significant difference in the level of VEGF expression and growth phase of melanoma. Melanomas with the present vertical growth phase showed a higher level of expression of VEGF – $\chi^2 = 4.840$ with a degree of freedom (df) 1 where $p = 0.028$ ($p < 0.05$).

The cells had an epithelioid appearance in 31 (79.49%) of the cases. Spindle cells were present in 5 (12.82%) of the cases and mixed type (epithelioid and spindle cells) were verified in 3 (7.69%) of the cases. Table 2 shows the relationship between the level of VEGF expression and cell type of melanoma. Analysis by χ^2 test showed a statistically significant difference in the level of VEGF expression and cell type of melanoma – $\chi^2 = 8.871$ with a degree of freedom (df) 3 where $p = 0.031$ ($p < 0.05$). A high level of VEGF expression was often verified in melanomas with epithelioid cells.

Melanoma in the examined material was mainly localized on extremities in 15 (38.46%) of the cases, followed by the field of head and neck in 13 (33.33%) of the cases and on the trunk in 11 (28.21%) of the cases. Relationship of VEGF

expression and localization of the melanoma is shown in table 2. Based on the analysis by χ^2 test, was a statistically significant difference in the level of VEGF expression and localization of the melanoma – $\chi^2 = 7.831$ with a degree of freedom (df) 3 where $p = 0.05$ ($p < 0.05$). Melanoma localized on the extremities showed a higher level of expression of VEGF (score 2 and 3), while melanoma localized on the head, neck and trunk showed a low level of expression of VEGF.

Discussion

This study included a total of 39 melanomas. A low level of expression of VEGF was present in 38.46% of the cases (score 0 and 1), while a high expression was present in 61.54% of the cases (score 2 and 3). Caraza and Peyri³¹ in their research state that the majority of melanomas show a lower level of expression (score 0 and 1), which is different compared with our results. A logical explanation of this difference is that these authors have studied a selected group of melanomas (“thin melanoma”, *ie* Breslow less than 1 mm), while in our research we studied the unselected group of melanomas. As an alternative, two different research groups describe alternative mechanisms for traditional angiogenesis which melanoma cells use to reach the vascular circulation: Leeners tells about “vascular co-option” or that melanoma uses the blood vessels that existed earlier in the animal model of cerebral metastatic melanoma, and Folberg describes “vasculogenic mimicry”, which primary cutaneous melanoma use to create three-dimensional structures that function as blood vessels, without a real angiogenesis^{32,33}.

In our research nodular and acral lentiginous types of melanoma more often showed a high level of expression of VEGF, and superficial spreading melanoma more often had a low level of expression of VEGF. The results are in line with the literature data³¹.

In our research there was a statistically significant difference in level of VEGF expression and the presence of ulceration and thickness according to Breslow. Boone et al.³⁴ in their study did not manage to prove a positive correlation between expression of VEGF-C factor and the presence of ulceration, tumor thickness according to Breslow, and the level of invasion according to Clark.

In our material there were malignant alterations in Clark level I. A higher number of melanoma cases showed a high expression of VEGF (score 2 and 3) in 24 (61.54%) of the cases. Cases with higher degree of expression are generally in higher Clark level. Based on the analysis by Kendall's tau-b test, there was no statistically significant difference in the level of VEGF expression and level of invasion according to Clark. Salven et al.¹⁴ also failed to find differences in manifestation of VEGF measured by immunohistochemical methods between smaller and larger primary melanomas. However, this is not what all authors agree about: Redondo et al.³⁵ believe that the more the Clark's or Breslow's level increases, the percentage of positive immunostaining for VEGF also increases, linking it with the development of the primary tumor, but no prognostic research was done.

Melanocyte malignant alterations (melanoma) in our material were in advanced stages, and in most of the cases were in the vertical growth phase. Dominantly vertical growth phase was verified in 25 (64.1%) of the cases. On the basis of statistical analysis, there was a significant difference in the level of VEGF expression and growth phase of melanoma. Melanoma with a vertical growth phase showed a higher level of VEGF expression. Looking at the value of immunostaining of VEGF against the Breslow level, a very important item was found: melanomas in radial stage changing to the malignant eclipse manifested less VEGF, which was significantly different measured by the precise Fisher test ($p = 0.002$) compared to already penetrated melanomas³⁶. Erhard et al.²⁷ describe the same findings: larger angiogenesis in the vertical phase compared to the radial one and higher manifestation of VEGF. Later, Bayer-Garner et al.³⁷ found a less manifestation of VEGF measured by immunohistochemical methods in melanomas in radial phase compared to melanomas in vertical phase found. VEGF was not the only angiogenic factor for which these data were observed. Bachelot et al.²², using *in situ* hybridization, showed low manifestation of bFGF-a7 in melanomas *in situ*, compared with its higher manifestation in invasive melanomas. In this way, both studies support the importance of these factors in transition of melanoma from radial to vertical growth phase. Also it should be emphasized that bFGF and VEGF act synergically as activators in angiogenic process³⁸. VEGF would thus often been absent or could be manifested minimally in skin melanoma in radial stage. These melano-

mas are indolent and their extirpation assumes the probability of healing of almost 100%. The reason is their inability to form metastases. At a time when neoplastic cells manage to manifest angiogenic factor, this will provide them with a favorable microambient by increasing vascular permeability in melanoma as a necessary precondition for the development of the tumor. In addition, a factor directly stimulates angiogenesis and the arrival of multiple macromolecules essential for the metastatic cascade due to the increase of permeability. Even hypothetically speaking, VEGF could even more stimulate autocrine growth of melanoma cells if they exhibit kdr receptor, a phenomenon that was previously described in medical literature (specifically, in A375P line of melanoma in humans and its derivatives A375MM)³⁹.

Conclusion

Melanomas show a high level of VEGF expression.

Nodular and acral lentiginous types of melanoma show a high expression of VEGF, and superficial spreading melanoma shows a low expression of VEGF. Melanomas with ulceration, with rare inflammation infiltrate in the stroma, high mitotic index, and melanomas in a higher stage of disease (Breslow, Clark, pTNM) show a higher level of expression of VEGF.

Melanomas in radial phase of growth show a low level of expression of VEGF and melanomas in vertical growth phase showed a high level of expression of VEGF. Epithelial-cellular melanomas and melanomas localized on extremities show a higher level of VEGF expression.

R E F E R E N C E S

1. *Czarnecki D, Meehan CJ*. Is the incidence of malignant melanoma decreasing in young Australians? *J Am Acad Dermatol* 2000; 42(4): 672–4.
2. *Boniol M, Armstrong BK, Doré JF*. Variation in incidence and fatality of melanoma by season of diagnosis in new South Wales, Australia. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2006; 15(3): 524–6.
3. *Rogers RS 3rd*. Malignant melanoma in the 21st century. *Int J Dermatol* 2000; 39(3): 178–9.
4. *Cattaruzza MS*. Does sunlamp use increase the risk of cutaneous malignant melanoma? *Arch Dermatol* 2000; 136(3): 389–90.
5. *Cho E, Rosner BA, Colditz GA*. Risk factors for melanoma by body site. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2005; 14(5): 1241–4.
6. *Hemmings DE, Johnson DS, Tominaga GT, Wong JH*. Cutaneous melanoma in a multiethnic population: is this a different disease? *Arch Surg* 2004; 139(9): 968–72.
7. *Weedon D, LeBoit P, Burg G, Sarasin A*. WHO Classification of tumours pathology and genetics of tumours of the skin. 3rd ed. Berlin: Springer, 2006.
8. *Pluda JM*. Tumor-associated angiogenesis: mechanisms, clinical implications, and therapeutic strategies. *Semin Oncol* 1997; 24(2): 203–18.
9. *Choi KS, Bae MK, Jeong JW, Moon HE, Kim KW*. Hypoxia-induced angiogenesis during carcinogenesis. *J Biochem Mol Biol* 2003; 36(1): 120–7.
10. *Robinson CJ, Stringer SE*. The splice variants of vascular endothelial growth factor (VEGF) and their receptors. *J Cell Sci* 2001; 114(Pt 5): 853–65.
11. *Küsters B, Leenders WP, Wesseling P, Smits D, Verrijp K, Ruiter DJ, et al*. Vascular endothelial growth factor - A(165) induces progression of melanoma brain metastases without induction of sprouting angiogenesis. *Cancer Res* 2002; 62(2): 341–5.
12. *Yu JL, Rak JW, Klement G, Kerbel RS*. Vascular endothelial growth factor isoform expression as a determinant of blood vessel patterning in human melanoma xenografts. *Cancer Res* 2002; 62(6): 1838–8.
13. *McMahon G*. VEGF receptor signaling in tumor angiogenesis. *Oncologist* 2000; 5 Suppl 1: 3–10.
14. *Salven P, Lymboussaki A, Heikkilä P, Jääskela-Saari H, Enholm B, Aase K, et al*. Vascular endothelial growth factors VEGF-B and VEGF-C are expressed in human tumors. *Am J Pathol* 1998; 153(1): 103–8.
15. *Dvorak HF, Brown LF, Detmar M, Dvorak AM*. Vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor, microvascular hyperpermeability, and angiogenesis. *Am J Pathol* 1995; 146(5): 1029–39.
16. *Jüttner S, Wissmann C, Jöns T, Vieth M, Hertel J, Gretschel S, et al*. Vascular endothelial growth factor-D and its receptor VEGFR-3: two novel independent prognostic markers in gastric adenocarcinoma. *J Clin Oncol* 2006; 24(2): 228–40.
17. *Goydos JS, Gorski DH*. Vascular endothelial growth factor C mRNA expression correlates with stage of progression in patients with melanoma. *Clin Cancer Res* 2003; 9(16 Pt 1): 5962–7.
18. *Einspahr JG, Thomas TL, Saboda K, Nickolof BJ, Warneke J, Curjel-Lewandrowski C, et al*. Expression of vascular endothelial growth factor in early cutaneous melanocytic lesion progression. *Cancer* 2007; 110(11): 2519–27.

19. *Stefanou D, Batistatou A, Zioga A, Arkoumani E, Papachristou DJ, Agnantis NJ.* Immunohistochemical expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) and C-KIT in cutaneous melanocytic lesions. *Int J Surg Pathol* 2004; 12(2): 133–8.
20. *Pisacane AM, Risio M.* VEGF and VEGFR-2 immunohistochemistry in human melanocytic naevi and cutaneous melanomas. *Melanoma Res* 2005; 15(1): 39–43.
21. *Gajanić V.* Vascularisation and angiogenesis cutaneous melanocytic lesion - clinical significance [thesis]. Banja Luka: University Banja Luka; 2009.
22. *Bachelot T, Jouanneau E, Blay JY.* Clinical development of anti-angiogenic agents in 2002. *Bull Cancer* 2003; 90(1): 19–23. (French)
23. *Chen HX, Gore-Langton RE, Cheson BD.* Clinical trials referral resource: current clinical trials of the anti-VEGF monoclonal antibody bevacizumab. *Oncology (Williston Park)* 2001; 15(8): 1023–6.
24. *Davis DW, McConkey DJ, Abbruzzese JL, Herbst RS.* Surrogate markers in antiangiogenesis clinical trials. *Br J Cancer* 2003; 89(1): 8–14.
25. *Karadagić Đ.* Dermatovenerology. 1st ed. Belgrade: Vojnoizdavački zavod; 2000. p. 761–7. (Serbian)
26. *Siemann DW, Bibby MC, Dark GG, Dicker AP, Eskens FA, Horsman MR, et al.* Differentiation and definition of vascular-targeted therapies. *Clin Cancer Res* 2005; 11(2 Pt 1): 416–20.
27. *Erhard H, Rietveld FJ, van Altena MC, Brückner EB, Ruiter DJ, de Waal RM.* Transition of horizontal to vertical growth phase melanoma is accompanied by induction of vascular endothelial growth factor expression and angiogenesis. *Melanoma Res* 1997; (7 Suppl 2): S19–26.
28. *Fenjvesi A.* Prognostic significance of tumor-induced angiogenesis in colorectal carcinoma. *Med Pregl* 2003; 56(5–6): 263–8. (Serbian)
29. *Edge SB, Byrd DR, Compton CC, Fritz AG, Greene FL, Trioti A.* AJCC cancer staging manual. 7th ed. New York: Springer-Verlag; 2009. p. 103–15.
30. *Lester SC.* Manual of surgical pathology 2nd ed. Philadelphia: Elsevier Churchill Livingstone; 2006. p. 347–54.
31. *Carazo AM, Peyri RJ.* Angiogenesis in malignant melanoma. [PhD thesis]. Barcelona: University of the Bellvitge 2004. (Spanish)
32. *Folberg R, Hendrix MJC, Maniotis AJ.* Vasculogenic mimicry and tumor angiogenesis. *Am J Pathol* 2000; 156(2): 361–81.
33. *Leenders WPJ, Küsters B, de Waal RMW.* Vessel co-option: How tumors obtain blood supply in the absence of sprouting angiogenesis. *Endothelium* 2002; 9(2): 83–7.
34. *Boone B, Blokx W, De Bacquer D, Lambert J, Ruiter D, Brochez L.* The role of VEGF-C staining in predicting regional metastasis in melanoma. *Virchows Arch* 2008; 453(3): 257–65.
35. *Redondo P, Sanchez-Carpintero I, Bauza A, Idoate M, Solano T, Mihm MC Jr.* Immunologic escape and angiogenesis in human malignant melanoma. *J Am Acad Dermatol* 2003; 49(2): 255–63.
36. *Marcoval J, Moreno A, Graells J, Vidal A, Escribà JM, Garcia-Ramirez M, et al.* Angiogenesis and malignant melanoma. Angiogenesis is related to the development of vertical (tumorigenic) growth phase. *J Cutan Pathol* 1997; 24(4): 212–8.
37. *Bayer-Garner IB, Hough AJ, Smoller MD.* Vascular endothelial growth factor expression in malignant melanoma: prognostic versus diagnostic usefulness. *Mod Pathol* 1999; 12(8): 770–4.
38. *Bhushan M, Young HS, Brenchley PEC, Griffiths CEM.* Recent advances in cutaneous angiogenesis. *Br J Dermatol* 2002; 147(3): 418–25.
39. *Liu W, Reinmuth N, Stoeltzing O, Parikh AA, Fan F, Ahmad SA, et al.* Antiangiogenic therapy targeting factors that enhance endothelial cell survival. *Semin Oncol* 2002; 29(3 Suppl 11): 96–103.

Received on July 10, 2009.

Revised on March 24, 2010.

Accepted on March 25, 2010.



Procena terapijskog efekta lasera male snage i interferentnih struja kod bolesnika sa kompleksnim regionalnim bolnim sindromom primenom infracrvene termovizijske kamere

Evaluation of low level laser and interferential current in the therapy of complex regional pain syndrome by infrared thermographic camera

Mirjana Kocić*, Milica Lazović*, Irena Dimitrijević†, Dragan Mančić‡, Anita Stanković*

*Klinički centar Niš, Klinika za fizikalnu medicinu, rehabilitaciju i protetiku, Niš, Srbija; †Institut za lečenje i rehabilitaciju „Niška Banja“, Odeljenje opšte fizikalne medicine i rehabilitacije, Niška Banja, Srbija; ‡Elektronski fakultet, Niš, Srbija

Apstrakt

Uvod/Cilj. Kompleksni regionalni bolni sindrom tipa I (CRPS I) karakteriše kontinuirani regionalni bol, disproporcionalan po trajanju i intenzitetu, vrsti traume ili druge lezije koja ga je izazvala. Cilj rada bio je da se primenom termovizije proceni i uporedi terapijski efekat lasera male snage i interferentnih struja u lečenju CRPS I. **Metode.** Prospektivno randomizirano kontrolisano kliničko ispitivanje obuhvatilo je 45 bolesnika sa unilateralnim CRPS I, nakon frakture u nivou ručnog ili skočnog zgloba, lečenih u Kliničkom centru Niš od 2004. do 2007. godine. U grupi A (20 bolesnika), primenjen je laser male snage i kineziterapija, a u grupi B (25 bolesnika), primenjene su interferentne struje i kineziterapija. Termovizijskom kamerom snimane su obotranog regije od interesa, pre i nakon sprovedenih 20 terapijskih procedura. Zatim je urađena kvantitativna analiza i komparacija termograma pre i posle sprovedene terapije. **Rezultati.** Komparacijom termograma, utvrđeno je statistički značajno sniženje prosečne maksimalne temperaturne razlike obolelog i kontralateralnog ekstremiteta nakon terapije u odnosu na stanje pre terapije i kod bolesnika grupe A ($p < 0,001$) i kod onih iz grupe B ($p < 0,001$). Ovo sniženje bilo je statistički značajno veće u grupi A nego u grupi B ($p < 0,05$). **Zaključak.** Primenom infracrvene termovizije pokazali smo da su obe fizikalne procedure efikasne u lečenju CRPS I, ali da je efikasnost terapije laserom statistički značajno veća nego efikasnost terapije interferentnim strujama.

Ključne reči:

refleksna simpatička distrofija; lečenje, laserom male snage; elektroterapija; infracrveni zraci; lečenje, ishod.

Abstract

Background/Aim. Complex regional pain syndrome type I (CRPS I) is characterised by continuous regional pain, disproportional according to duration and intensity and to the sort of trauma or other lesion it was caused by. The aim of the study was to evaluate and compare, by using thermovision, the effects of low level laser therapy and therapy with interferential current in treatment of CRPS I. **Methods.** The prospective randomized controlled clinical study included 45 patients with unilateral CRPS I, after a fracture of the distal end of the radius, of the tibia and/or the fibula, treated in the Clinical Centre in Nis from 2004 to 2007. The group A consisted of 20 patients treated by low level laser therapy and kinesy-therapy, while the patients in the group B ($n = 25$) were treated by interferential current and kinesy-therapy. The regions of interest were filmed by a thermovision camera on both sides, before and after the 20 therapeutic procedures had been applied. Afterwards, the quantitative analysis and the comparing of thermograms taken before and after the applied therapy were performed. **Results.** There was statistically significant decrease of the mean maximum temperature difference between the injured and the contralateral extremity after the therapy in comparison to the status before the therapy, with the patients of the group A ($p < 0.001$) as well as those of the group B ($p < 0.001$). The decrease was statistically significantly higher in the group A than in the group B ($p < 0.05$). **Conclusions.** By the use of the infrared thermovision we showed that in the treatment of CRPS I both physical medicine methods were effective, but the effectiveness of laser therapy was statistically significantly higher compared to that of the interferential current therapy.

Key words:

reflex sympathetic dystrophy; laser therapy, low-level; electric stimulation therapy; infrared rays; treatment outcome.

Uvod

Kompleksni regionalni bolni sindrom tipa I (CRPS I) je novi naziv za refleksnu simpatičku distrofiju, prema nomenklaturi koju je usvojio Komitet za klasifikaciju hroničnog bola Internacionalne asocijacije za ispitivanje bola. Ovaj sindrom karakteriše kontinuirani regionalni bol, koji nije ograničen na dermatom ili perifernu nervnu distribuciju. Bol nastaje nakon inicijalnog oštećenja, ali je disproportionalan po trajanju i intenzitetu u odnosu na vrstu traume ili druge lezije. Pored bola, CRPS I karakterišu patološke senzorne, motorne, sudomotorne, vazomotorne i/ili trofične promene. Ukoliko se ovaj sindrom razvije usled oštećenja nerva radi se o CRPS II, koji je ranije bio poznat kao kauzalgijski¹.

Kod CRPS, usled patofiziološkog mehanizma simpatičke disfunkcije, dolazi do vaskularnih promena, koje dovode do abnormalne promene temperature kože zahvaćenog dela ekstremiteta. Na taj način nastaje temperaturna razlika između obolelog i kontralateralnog ekstremiteta, koja se može detektovati infracrvenim (IC) termovizijskim snimanjem. Kvantitativnom analizom temperaturne razlike između simetričnih delova ekstremiteta (homolognih područja) potvrđuje se klinička dijagnoza CRPS^{2,3}. Zahvaljujući mogućnosti arhiviranja termograma savremenih termovizijskih kamera, moguće je njihovo poređenje pre i posle sprovedene terapije, čime ove kamere mogu poslužiti u proceni efikasnosti primenjenih terapijskih procedura⁴⁻⁶.

Ne postoji jedinstveni tretman, koji dovodi do izlječenja CRPS⁷. Cilj terapije za ovaj sindrom je prevashodno smanjenje bola i otoka, kao i uspostavljanje pune pokretljivosti i snage mišića, poboljšanje funkcije zahvaćenog dela ekstremiteta i, konačno, socijalizacija bolesnika⁸. Naša zapažanja su da se prilikom primene laseroterapije subjektivne tegobe brže povlače nego pri primeni drugih fizikalnih procedura, što smo želeli da proverimo korišćenjem IC termovizije.

Cilj ovog rada bio je da se primenom IC termovizije proceni i uporedi terapijski efekat lasera male snage i interferentnih struja u lečenju bolesnika sa CRPS I.

Metode

U prospektivno randomizirano kontrolisano kliničko istraživanje bilo je uključeno 45 bolesnika sa unilateralnim CRPS I. Svi bolesnici lečeni su na Klinici za fizikalnu medicinu i rehabilitaciju Kliničkog centra u Nišu, u periodu od decembra 2004. do januara 2007. godine. Kod ispitivanih bolesnika dijagnoza unilateralnog CRPS I postavljena je klinički, na osnovu kriterijuma koje je definisala Internacionalna asocijacija za ispitivanje bola¹ i potvrđena pomoću IC termovizije.

Kriterijumi za uključivanje u studiju podrazumevali su postojanje prvog stadijuma unilateralnog CRPS I, nakon frakture u nivou ručnog ili skočnog zgloba. Stadijum je određivan na osnovu dužine trajanja bolesti. S obzirom na to da razlike u temperaturi kože mogu biti prisutne kod neuropatskih abnormalnosti, fokalne inflamacije, vaskularnih bolesti i dr, iz studije su isključeni svi bolesnici kod kojih su anamnestički ili klinički pokazatelji ukazivali da boluju od: inflamacij-

skih bolesti zglobova, malignih bolesti, infektivnih bolesti, varikoziteta, tromboflebitisa, opstruktivne angiopatije, Raynaudovog fenomena i sindroma karpalnog tunela.

Metodom slučajnog izbora ispitivani bolesnici bili su podeljeni u dve eksperimentalne grupe: grupu A i grupu B. Grupa A obuhvatala je 20 bolesnika, koji su u terapijskom protokolu imali primenu lasera male snage i kineziterapije. Korišćen je poluprovodnički GaAs laser male snage od 70 mW, talasne dužine 810 nm, frekvencije 1–2500 Hz. Tretirane su tačke u predelu linije zgloba i bolne tačke u zahvaćenom području, dozom 1,5 J/cm². Ukupna količina energije po jednom tretmanu iznosila je 25–30 J. Grupa B obuhvatala je 25 bolesnika, koji su u terapijskom protokolu imali primenu interferentnih struja (IFS) i kineziterapije. Primenjivane su bipolarne IFS, frekvencije 90 Hz u trajanju od 15 min, tako da su elektrode plasirane lokalno na bolni i otečeni deo. Bolesnici obe grupe imali su prvih 10 terapija svakodnevno, 5 dana u nedelji (2 nedelje), a nakon toga sledećih 10 terapija na drugi dan. Kod bolesnika obe grupe primenjivana je individualna kineziterapija (aktivne i aktivnopotpomognute vežbe, strogo dozirane do granice bola), 30 minuta, dva puta dnevno. Svi bolesnici pismeno su potvrdili da pristaju na predloženu dijagnostičku metodu i terapijsku proceduru.

Ispitivani bolesnici snimani su IC termovizijskom kamerom na početku ispitivanja i nakon sprovedenih 20 terapijskih procedura. Zatim je urađena kvantitativna analiza i komparacija termograma pre i posle sprovedene terapije.

Uslovi snimanja bili su jednaki za sve bolesnike, s obzirom na to da na temperaturu kože utiču bazalni metabolizam i metabolizam uzrokovan mišićnom aktivnošću i da na emitovanje toplote utiču faktori okoline⁹. Temperatura prostorije za snimanje bila je 22–24 °C. Najmanje 1 sat pre snimanja, bolesnici nisu konzumirali obilne obroke, tople napitke, alkohol, čaj ili kafu, nisu pušili, niti koristili kozmetičke preparate. Fizičke aktivnosti su redukovali na minimum. Fizičke procedure nisu sprovedene najmanje 4–6 sati pre snimanja. Deo tela označen kao regija od interesa (ROI), bio je bez odeće najmanje 15 minuta pre snimanja. Ručni/skočni zglob i dorzalna strana šaka/stopala, postavljeni paralelno, tako da im se palčevi ne dodiruju, predstavljali su ROI gornjeg/donjeg ekstremiteta. Termovizijskom kamerom *Varioscan high resolution 3021* („Jenoptik“, Dresden, Nemačka) snimane su obostrano ROI. Za obradu termograma korišćen je IRIBIS – grafički orijentisan softverski paket.

Kvantitativnom analizom dobijenih termograma verifikovane su maksimalne (max) vrednosti temperature ROI, izražene u Celzijusovim stepenima. Kod svakog bolesnika izračunata je razlika max vrednosti temperatura pre i nakon terapije, između ROI obolelog i kontralateralnog ekstremiteta, po formuli: $\Delta T_{\max} = \text{max temperatura ROI obolelog} - \text{max temperatura ROI kontralateralnog ekstremiteta}$. Na kraju ispitivanja, za obe grupe za svakog ispitanika izračunata je razlika vrednosti ΔT_{\max} pre i nakon sprovedene terapije, po formuli: $\Delta T_{\max \text{ diff}} = \Delta T_{\max} \text{ pre terapije} - \Delta T_{\max} \text{ posle terapije}$.

Nakon ispitivanja dobijeni rezultati su statistički obrađeni u SPSS 10.0 paketu (*Statistical Package for the Social Sciences Program* – version 10) za statističku obradu podataka. Za statističku analizu podataka primenjena je srednja

vrednost, standardna devijacija, χ^2 test, zavisni i nezavisni Studentov t test za male uzorke. Pre utvrđivanja vrednosti Studentovog t testa nezavisnih uzoraka ispitivana je jednakost varijansi Leavenovim testom. Vrednost $p < 0,05$ smatrana je statistički značajnom.

Rezultati

Demografske i bazične karakteristike bolesnika date su u tabeli 1. Ispitivane grupe bile su komparabilne u odnosu na

Studentovim t -testom zavisnih uzoraka, utvrđeno je statistički značajno smanjenje prosečne vrednosti ΔT_{\max} nakon sprovedene terapije, kako kod bolesnika grupe A ($t = 6,269$, $p < 0,001$), tako i kod bolesnika grupe B ($t = 8,827$, $p < 0,001$) (tabela 2). Poredeći prosečne vrednosti temperaturnih razlika između obolelog i kontralateralnog ekstremiteta pre i nakon terapije, Studentovim t testom nezavisnih uzoraka, utvrđeno je da je smanjenje tih temperaturnih razlika statistički značajno veće u grupi A nego u grupi B ($t = 2,759$, $p < 0,05$).

Tabela 1

Demografske i bazične karakteristike bolesnika					
Karakteristika bolesnika	Grupa A	Grupa B	t	χ^2	p
Starost (god), $\bar{x} \pm SD$ (min-max)	53,90 \pm 13,36 (23–77)	57,80 \pm 10,75 (23–77)	1,08		> 0,05
Pol (broj), ženski / muški	12/8	17/8		0,31	> 0,05
Trajanje bolesti (dani), $\bar{x} \pm SD$ (min-max)	33,75 \pm 8,44 (20–44)	31,64 \pm 7,79 (20–44)	0,87		> 0,05
Lokalizacija CRPS I* (broj) gornji/ donji ekstremitet	7/13	14/11		1,97	> 0,05

* kompleksni regionalni bolni sindrom tipa I

pol, starost, trajanje bolesti i zahvaćenost gornjih/donjih ekstremiteta. Kvantitativnom analizom termograma pre i nakon terapije, verifikovana je prosečna vrednost T_{\max} ROI ($\bar{x} \pm SD$) i opseg (min-max) T_{\max} kod bolesnika grupe A i grupe B (tabela 2). Razlika max temperature između obolelog i zdravog ekstremiteta (ΔT_{\max}), pre terapije, kod ispitivanih bolesnika kretala se u opsegu od 1,0 °C do 2,81 °C, čime je potvrđena dijagnoza CRPS I.

Pre početka terapije nije postojala statistički značajna razlika u prosečnim max temperaturama obolelih ekstremiteta između ispitivanih grupa A i B ($t = 1,462$; $p > 0,05$), niti u prosečnim max temperaturama zdravih ekstremiteta ($t = 0,377$; $p > 0,05$), kao ni u vrednostima razlike max temperatura obolelog i kontralateralnog ekstremiteta (ΔT_{\max}) ($t = 1,911$; $p > 0,05$) (tabela 2).

Termogrami dva bolesnika grupe A pre i nakon terapije sa određenim maksimalnim vrednostima temperature, prikazani su na slikama 1 i 2.

Diskusija

Postavljanje dijagnoze i započinjanje terapije CRPS I u početnom stadijumu, značajno je u cilju zaustavljanja progresije bolesti u smislu razvoja atrofije mišića, kontraktura susednih zglobova i disfunkcije zahvaćenog ekstremiteta. Mi smo koristili IC termovizijsku kameru pre početka fizikalne terapije za potvrđivanje dijagnoze CRPS, kao i nakon sprovedene terapije za procenu terapijskog efekta lasera male snage i IFS.

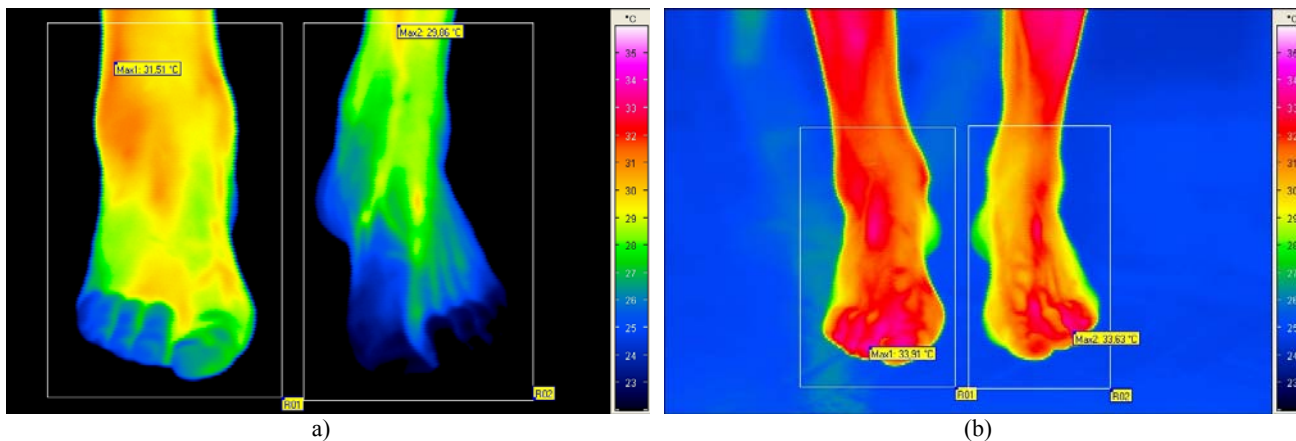
Tabela 2

Temperaturni parametri (T_{\max} regije od interesa; ΔT_{\max} i ΔT_{\max} diff) pre i nakon terapije					
Parametar	Ekstremitet	Grupa A		Grupa B	
		pre terapije	posle terapije	pre terapije	posle terapije
T_{\max} (°C) $\bar{x} \pm SD$ (min-max)	bolestan	33,49 \pm 1,48* (30,99–36,34)	32,66 \pm 1,00* (30,86–34,32)	32,77 \pm 1,75 (27,46–35,42)	32,27 \pm 1,83 (27,53–35,80)
	kontralateralan	31,69 \pm 1,42* (28,90–35,16)	31,96 \pm 1,11* (29,79–33,96)	31,51 \pm 1,79 (26,67–33,77)	31,61 \pm 1,95 (26,74–34,55)
ΔT_{\max} (°C), $\bar{x} \pm SD$		1,79 \pm 1,04	0,64 \pm 0,83†	1,26 \pm 0,77	0,65 \pm 0,67†
ΔT_{\max} diff (°C), $\bar{x} \pm SD$		1,15 \pm 0,82‡		0,61 \pm 0,35	

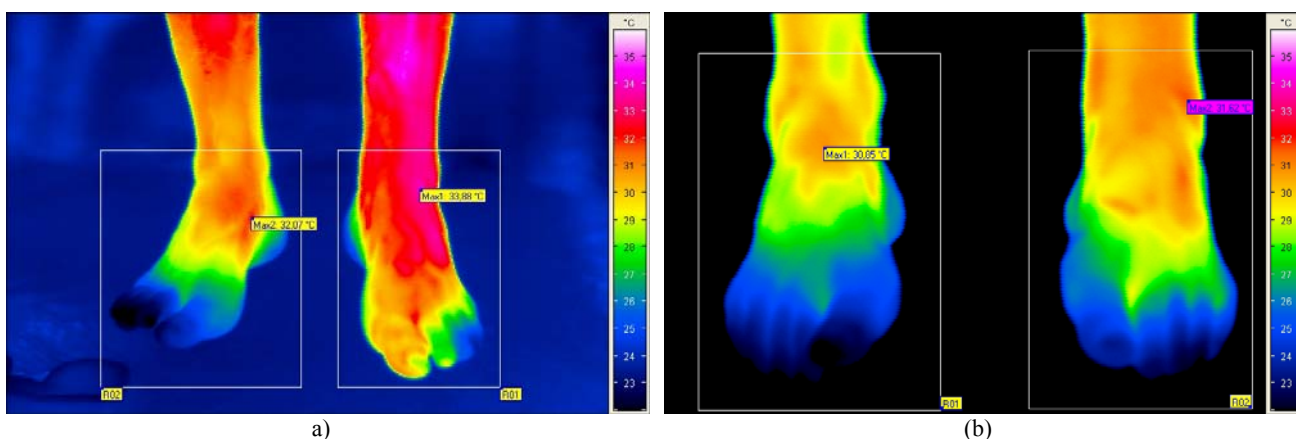
T_{\max} = maksimalna vrednost temperatura regije od interesa; ΔT_{\max} = razlika maksimalnih vrednosti temperatura regije od interesa obolelog i kontralateralnog ekstremiteta; ΔT_{\max} diff = razlika $\overline{\Delta T_{\max}}$ pre terapije i $\overline{\Delta T_{\max}}$ nakon terapije; * – $p > 0,05$ (između grupa A i B), † – $p < 0,001$ statistički značajna razlika posle terapije; ‡ – $p < 0,05$ statistički značajna razlika između grupa A i B.

Nakon sprovedene terapije, prosečna vrednost ΔT_{\max} kod bolesnika grupe A iznosila je 0,64 \pm 0,83 °C, a kod bolesnika grupe B 0,65 \pm 0,67 °C (tabela 2). Komparativnom analizom termograma dobijenih pre i nakon terapije,

Pošto su etiologija i patofiziološki mehanizmi CRPS još uvek sporni, razumljivo je što ni nakon dve održane konferencije Internacionalne asocijacije za ispitivanje bola posvećene ovom oboljenju, još uvek nije usvojen terapijski proto-



Sl. 1 – Termogram bolesnika sa CRPS I desnog stopala pre (a) i nakon (b) terapije



Sl. 2 – Termogram bolesnika sa CRPS I levog stopala pre (a) i nakon (b) terapije

kol^{7, 10–12}. S obzirom na kompleksnost ovog sindroma, preporučuje se multidisciplinarni pristup u lečenju, u kome je najznačajnija fizikalna terapija primenjena u početnom stadijumu^{13–17}. Međutim, ni primena multidisciplinarnog pristupa nije dala očekivane rezultate, jer nakon sprovedene terapije kod velikog procenta bolesnika zaostaje disfunkcija zahvaćenog ekstremiteta^{11, 12}. Američka asocijacija za fizikalnu terapiju ukazuje da fizikalna terapija može poboljšati funkciju kod 80% bolesnika⁷. Važno je da fizikalna terapija bude individualno prilagođena u odnosu na ispoljenu kliničku sliku¹⁸.

Mi smo primenjivali dve fizikalne procedure (laseroterapiju i IFS) u lečenju bolesnika sa CRPS I u ranom stadijumu, uz individualno doziranu kineziterapiju. Poznati terapijski efekti ovih fizikalnih procedura su analgetski, antiedematozni, kao i stimulacija osteogeneze^{19, 20}. S obzirom na to da je cilj terapije u ranom stadijumu prevashodno smanjenje bola i otoka, izbor fizikalnih procedura baziran je na analgetskom i antiedematoznom dejstvu IFS i lasera male snage. Nikolova²¹, u studiji koja je obuhvatala 400 bolesnika sa CRPS I, upoređujući efekte terapije interferentnim strujama, ultrazvukom i diadinamičnim strujama, ističe da se najbolji rezultati u lečenju postižu primenom IFS u prvom stadijumu.

Za procenu i poredenje efekta navedenih fizikalnih procedura, koristili smo IC termovizijsku kameru *Varioscan*

high resolution 3021. Termovizijska kamera detektuje emitovane IC zrake sa površine tela, zatim ih fokusira i usmerava pomoću specijalnih sočiva ka fotosenzoru, koji energiju detektovanih emitovanih IC zraka pretvara u električne impulse, a zatim transformiše u vidljiv snimak – termogram. Na ovaj način, emitovana temperatura sa kože vizuelizuje se na ekranu spektrom boja²². Zahvaljujući razvoju informacionih tehnologija, redukovani su nedostaci subjektivne procene intenziteta prebojenosti na termogramu, jer savremene termovizijske kamere, temperaturne razlike površine tela prikazuju u vidu visokokvalitetne termovizijske slike što omogućava njihovu kvantitativnu analizu i arhiviranje^{4, 23}. Termovizijskim praćenjem bolesti tokom primene terapije, postoji mogućnost da se proceni i uporedi efikasnost pojedinih terapijskih procedura. Zbog ovoga se termovizija smatra objektivnim vodičem za izbor terapijskih procedura^{5, 6}.

Niehof i sar.²⁴ pokazali su da postoji dobra korelacija između temperature kože i simpatičke aktivnosti kože. Termovizijska kamera, detektujući promenu temperature kože, može pomoći u dijagnostici bolesti koje direktno ili indirektno utiču na vaskularni tonus mikrocirkulacije koji je regulisan autonomnim nervnim sistemom⁵. Smatra se da procenom neurovaskularne disfunkcije, termovizija ima mogućnost dijagnoze CRPS I u ranom stadijumu i praćenje njegove progresije^{5, 24}.

Postoje studije u kojima se termovizijom procenjuje terapijski efekat pojedinih fizikalnih procedura kod različitih bolesti. Hakgüder i sar.²⁵ ispitivali su termovizijom efekat lasera male snage kod bolesnika sa miofascijalnim bolom i uočili statistički značajno veće poboljšanje ispitivanih parametara u grupi u kojoj je primenjena terapija laserom uz kineziterapiju, nego u grupi u kojoj je primenjivana samo kineziterapija.²⁵ Chin-Li Wu i sar.²⁶ vršeci procenu efekata manualne masaže u kombinaciji sa kratkotalasnom diatermijom, kod bolesnika sa koksigodinijom, istakli su prednost termovizije kao objektivne metode za praćenje dinamike bolesti, nad subjektivnom procenom bola. Takođe, pokazano je da termovizija može poslužiti u vizuelizaciji efekata tradicionalne i laserske akupunkture.²⁷

Postoji studija u kojoj su termovizijom ispitivani efekti primene modulirane vidljive svetlosti niskog intenziteta kod bolesnika sa CRPS I i kod zdravih osoba. U ovoj studiji, nakon sprovedene terapije, utvrđeno je statistički značajno veće smanjenje temperature kože, kod bolesnika sa CRPS, nego kod zdravih osoba. Navedena studija pokazala je da se termovizijom obezbeđuju objektivni podaci o fiziološkim promenama u regionalnoj perfuziji obolelog ekstremiteta, kao i da se može kvantifikovati odgovor na terapijske modalitete, što može poslužiti u izboru terapijskog protokola.²⁸

U dostupnoj literaturi nismo našli studije koje se odnose na procenu i upoređivanje efekata laseroterapije i IFS u lečenju CRPS I. U našoj studiji pokazano je da između ispitivanih grupa pre terapije nije postojala statistički značajna razlika u prosečnoj maksimalnoj temperaturi ni obolelih, niti

kontralateralnih ekstremiteta, a što je najvažnije, nije postojala statistički značajna razlika u odnosu na prosečnu vrednost razlike maksimalnih temperatura obolelih i kontralateralnih ekstremiteta (ΔT_{max}). Nakon sprovedene terapije, postignuto statistički značajno smanjenje temperature obolelih ekstremiteta, odnosno statistički značajno smanjenje razlike maksimalnih temperatura obolelih i kontralateralnih ekstremiteta u obe grupe, ukazalo je na povoljno dejstvo obe procedure u terapiji CRPS I. Statističko poređenje između grupa pokazalo je da je to smanjenje statistički značajno veće u grupi A nego u grupi B, što daje prednost primeni laseroterapije u lečenje CRPS.

Povoljan efekat ovih procedura CRPS sugeriše da one, delujući analgetski i antiedematozno, deluju regulatorno na vaskularni tonus mikrocirkulacije kože, s tim što bi dejstvo lasera u ovom smislu bilo izraženo od dejstva IFS.

Zaključak

Primenom IC termovizije pokazali smo da su obe fizikalne procedure, i laser male snage i IFS, efikasne u lečenju CRPS I, ali da je efikasnost terapije laserom statistički značajno veća od terapije IFS. Ovaj rezultat navodi na uključivanje lasera male snage, kao značajne fizikalne procedure u lečenje bolesnika sa CRPS I. Takođe, pokazali smo da IC termovizijsko snimanje može služiti u proceni i komparaciji efekata različitih fizikalnih procedura u terapiji CRPS I, kao i da može doprineti objektivnijem izboru fizikalnih procedura za njegov tretman.

L I T E R A T U R A

- Harden RN, Bruhl SP. Diagnostic criteria: The statistical derivation of the four criterion factors. In: *Wilson PR, Stanton-Hicks M, Harden RN*, editors. CRPS: current diagnosis and therapy progress in pain research and management. Seattle, WA: IAPS Press; 2005. pp. 45–58.
- Wasner G, Baron R. Vasomotor changes-pathophysiology and measurement. In: *Wilson PR, Stanton-Hicks M, Harden RN*, editors. CRPS: current diagnosis and therapy progress in pain research and management. Seattle, WA: IAPS Press; 2005. pp. 81–106.
- Rommel O, Häbler HJ, Schürmann M. Laboratory tests for complex regional pain syndrome. In: *Wilson PR, Stanton-Hicks M, Harden RN*, editors. CRPS: Current diagnosis and therapy progress in pain research and management. Seattle, WA: IAPS Press; 2005. pp. 139–59.
- Herry CL, Frizze M. Quantitative assessment of pain-related thermal dysfunction through clinical digital infrared thermal imaging. *Bio Med Eng Online* 2004 June [cited 2004 June 28]. Available from: <http://www.biomedical-engineering-online.com/content/3/1/19>
- Hooshmand H, Hashmi M, Phillips EM. Infrared thermal imaging as a tool in pain management - an 11 year study. Part I of II. *Thermol Int* 2001; 11(2): 53–65.
- O'Young BJ, Cohen JM. The role of thermography in the diagnosis and management of complex regional pain syndrome. In: *Lee MHM, Cohen JM*, editors. Rehabilitation medicine and thermography. Wilsonville, Morrisville: Impress Publications; 2008. p. 45–66.
- Dommerholt J. Complex regional pain syndrome-2: physical therapy management. *J Bodyw Mov Ther* 2004; 8: 241–8.
- Bengston K. Physical modalities of complex regional pain syndrome. *Hand Clin* 1997; 13: 443–54.
- Ring EFJ, Ammer K. The technique of infrared imaging in medicine. *Thermol Int* 2000; 10(1): 7–14.
- Forouzanfar T, Koke AJ, van Kleef M, Weber WE. Treatment of complex regional pain syndrome type I. *Eur J Pain* 2002; 6(2): 105–22.
- Subbarao J, Stillwell GK. Reflex sympathetic dystrophy syndrome of the upper extremity: analysis of total outcome of management of 125 cases. *Arch Phys Med Rehabil* 1981; 62(11): 549–54.
- Wilder RT, Berde CB, Wolohan M, Vieyra MA, Masek BJ, Micheli LJ. Reflex sympathetic dystrophy in children. Clinical characteristics and follow-up of seventy patients. *J Bone Joint Surg Am* 1992; 74(6): 910–9.
- Kemler MA, Rijks CP, de Vet HC. Which patients with chronic reflex sympathetic dystrophy are most likely to benefit from physical therapy? *J Manipulative Physiol Ther* 2001; 24(4): 272–8.
- Lee KJ, Kirchner JS. Complex regional pain syndrome and chronic pain management in the lower extremity. *Foot Ankle Clin* 2002; 7(2): 409–19.
- Stanton-Hicks M, Baron R, Boas R, Gordb T, Harden N, Hendler N et al. Complex regional pain syndromes: guidelines for therapy. *Clin J Pain* 1998; 14(2): 155–66.
- Rbo RH, Brewer RP, Lamer TJ, Wilson PR. Complex regional pain syndrome. *Mayo Clinic Proc* 2002; 77(2): 174–80.
- Wasner G, Schattschneider J, Binder A, Baron R. Complex regional pain syndrome – diagnostic, mechanisms, CNS involvement and therapy. *Spinal Cord* 2003; 41: 61–75.

18. *Eccleston C, Crombez G, Aldrich S, Stannard C.* Worry and chronic pain patients: a description and analysis of individual differences. *Eur J Pain* 2001; 5(3): 309–18.
19. *Lazović M.* Laser therapy. Beograd: Evropski centar za mir i razvoj (ECPD); 1997. (Serbian)
20. *Mihajlović V.* Physical therapy. 3rd ed. Rijeka Crnojevića: Obodsko slovo; 2002. p. 190–201. (Serbian)
21. *Nikolova L.* Treatment with interferential current. Edinburgh, London, Melbourne, New York: Churchill Livingstone; 1987.
22. *Sarquent GR.* The use of thermography in clinical thoracolumbar disease in dachshunds. [thesis]. Departent of Clinical Sciences College of Veterinary Medicine, Kansas: 2008.
23. *Uematsu S, Edwin D, Jankel W, Kozickowski J, Trattner M.* Quantification of thermal asymmetry. Part 1: Normal values and reproducibility. *J Neurosurg* 1988; 69: 552–5.
24. *Niebof SP, Huygen F, van der Weerd RWP, Westra M, Zijlstra FJ.* Thermography imaging during static and controlled thermoregulation in complex regional pain syndrome type 1: diagnostic value and involvement of the central sympathetic system. *Bio Med Eng Online* 2006 May [cited 2006 May 12]. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1479347>
25. *Hakgüder A, Birtane M, Gürçan S, Kokino S, Turan FN.* Efficacy of low level laser therapy in myofascial pain syndrome: an algometric and thermographic evaluation. *Lasers Surg Med* 2003; 33(5): 339–43.
26. *Wu CL, Yu KL, Chuang HY, Huang MH, Chen TW, Chen CH.* The application of infrared thermography in the assessment of patients with coccygodynia before and after manual therapy combined with diathermy. *J Manipulative Physiol Ther* 2009; 32(4): 287–93.
27. *Litscher G, Wang L.* Thermographic visualization of changes in peripheral perfusion during acupuncture. *Biomed Tech* 1999; 44(5): 129–34.
28. *Gardiner A, Florin RE, Haber C.* Complex regional pain syndrome: a new approach to therapy. In: *Waynant R, Tata DB*, editors. Proceedings of light-activated tissue regeneration and therapy Symposium, Engineering Conferences International, 2007 June 24–29; Tomar, Portugal. London, New York: Springer; 2008. p. 283–92.

Primljen 21. VII 2009.

Revidiran 11. I 2010.

Prihvaćen 3. III 2010.



Comparison between auditory steady-state responses and pure-tone audiometry

Poređenje metode određivanja *steady-state* auditivnih evociranih potencijala i tonalne liminarne audiometrije

Zoran Komazec*, Slobodanka Lemajić-Komazec*, Rajko Jović*,
Čongor Nadj†, Ljiljana Jovančević*, Slobodan Savović*

Clinical Center of Vojvodina, *Clinic for Ear, Nose and Throat Diseases;
†Institute for Neurology, Novi Sad, Serbia

Abstract

Background/Aim. A more recent method, the auditory steady-state response (ASSR), has become more and more important test method due to difference that was found in previous investigations between hearing thresholds determined by the ASSR and the pure-tone audiometry (PTA). The aim of this study was to evaluate the reliability of the ASSR in determining the frequency specific hearing thresholds by establishing a correlation between the thresholds determined by PTA, as well as to evaluate the reliability of ASSR in determining the hearing threshold with respect to the level of hearing loss and the configuration of the PTA findings. **Methods.** The prospective study included 46 subjects (92 ears) which were assigned to groups based on their level of hearing loss and audiometric configuration. All the subjects underwent determination of hearing thresholds by PTA and ASSR without insight into their previously obtained PTA results. **Results.** The overall sample differences between the ASSR and PTA thresholds were 4.1, 2.5, 4.4, and 4.2 dB at 0.5, 1, 2, and 4 kHz, respectively. A high level of correlation was achieved in groups with different configurations of PTA findings. The correlation coefficients between the hearing thresholds determined by ASSR and PTA were significant in subjects with all levels of hearing loss. The differences between hearing thresholds determined by ASSR and PTA were less than 10 dB in 85% of subjects (ranging from 4 dB for moderately severe hearing loss to 7.2 dB for normal hearing). **Conclusion.** The ASSR is an excellent complementary method for the determination of hearing thresholds at the 4 carrier frequencies, as well as determination of the level of hearing loss and the audiometric configuration.

Key words:

audiometry; hearing loss; audiometry, evoked response; evoked potentials, auditory, brain stem; acoustic impedance, tests; diagnosis.

Apstrakt

Uvod/Cilj. Metoda određivanja *steady-state* audiovinih evociranih potencijala (ASSR), postaje sve važnija test metoda zbog razlike u pragu sluha koja je nađena u ranijim istraživanjima merenjem pomoću ASSR i tonalne liminarne audiometrije (TA). Cilj ove studije bio je procena pouzdanosti ASSR u određivanju frekventno specifičnog praga sluha određivanjem korelacije između ASSR i TA, kao i procena pouzdanosti ASSR u određivanju praga sluha u odnosu na prag sluha i konfiguraciju nalaza TA. **Metode.** U prospektivnu studiju bilo je uključeno 46 ispitanika (92 uva) koji su bili podeljeni u grupe prema stepenu slušnog oštećenja i konfiguraciji audiometrijskog nalaza. Svim ispitanicima načinjena je TA i ASSR bez prethodnog uvida u nalaz tonalne audiometrije. **Rezultati.** U ukupnom uzorku razlika između ASSR i PTA iznosila je 4,1; 2,5; 4,4 i 4,2 dB na 0,5; 1,2 i 4 kHz, respektivno. Visok nivo korelacije postignut je u grupi sa različitim konfiguracijama audiometrijskog nalaza. Koeficijent korelacije između praga sluha određenog ASSR i TA bio je značajan kod ispitanika svih nivoa slušnog oštećenja. Razlika između praga sluha određenog ASSR i TA iznosila je manje od 10 dB kod 85% ispitanika. **Zaključak.** ASSR je odlična komplementarna metoda za objektivno određivanje praga sluha na četiri noseće frekvencije, i zajedno sa drugim dijagnostičkim metodama predstavlja korisno oruđe za preciznije određivanje praga sluha.

Ključne reči:

audiometrija; sluh, parcijalni gubitak; audiometrija, evocirana reakcija; evocirani potencijal imoždanoz stabilna, audiotorni; akustička impedanca, testovi; dijagnoza.

Introduction

Although objective diagnostic methods tend to dominate modern medical science, behavioral pure-tone audiometry (PTA) remains the golden standard for identifying hearing threshold levels. With all other objective audiological methods, the main goal – reconstruction of tonal audiometry findings and identification of frequency specific hearing thresholds – is achieved with more or less success. Since the 1980's, high quality identification of hearing thresholds within the range of speech frequencies has been achieved by various methods of auditory evoked potentials. Since then, determination of hearing thresholds has been made much easier in patients by which valid tonal audiometry could not have been previously performed, such as infants and those unable or unwilling to participate in traditional behavioral tests.

The most commonly used clinical method is auditory brainstem response (ABR) characterized by high wave reproducibility and responses that do not depend on state of consciousness. The main limitation of click-evoked ABR is inability to determine the frequency specific hearing thresholds which are required in most of the cases. The ABR hearing threshold determination is based on average hearing threshold estimation within 2–4 kHz range, i.e. determining one spot on the audiogram without the possibility of PTA configuration reconstruction. In infants, the determination of hearing thresholds up to 2 kHz is mainly based on behavioral estimation of their remaining hearing range. Attempts to compensate for this ABR shortcoming by the use of tone-evoked ABR has never been established in everyday clinical practice because it has unfamiliar waveform morphology, it is time consuming and there are no responses in cases of severe and profound hearing loss¹. Some studies also questioned the frequency, specificity and reliability of threshold estimation in the low frequency tone pip range²⁻⁴.

A more recent method, the auditory steady-state response (ASSR) has become more and more important as an alternative to objective audiometry. In contrast to ABR in which stimuli are broadband clicks or tone bursts, the ASSR is evoked by using continuous amplitude modulated and frequency modulated tone. Due to stimuli characteristics, ASSR is performed binaurally at 4 frequencies: 0.5, 1, 2, and 4 kHz, simultaneously. The obtained response after being processed by an objective, sophisticated, statistically based mathematical detection algorithm gives us information on the hearing threshold at the 4 given frequencies.

During the last couple of years, several studies investigated clinical application of ASSR as an objective audiometry method. Most studies agree that there is a significant correlation between hearing thresholds determined by the ASSR and the PTA, but the difference was found to be between 4–34 decibel (dB)^{5,6}. The greatest difference in hearing thresholds is found in patients with normal hearing, while it was significantly smaller in patients with sensorineural hearing loss.

In the light of this discrepancy, the aim of this study was to evaluate correlations between the hearing thresholds

determined by ASSR and PTA in subjects with different level of hearing loss as well as with different audiometric finding configurations.

Methods

The study protocol was approved by the local Ethics Committee. Informed consent was required for every subject before they could participate.

The study group comprised of 46 subjects (92 ears), aged 15–75 (mean age 48 years): 26 females and 20 males. All subjects underwent an otoscopic examination, a tympanometry, a PTA, and an ASSR.

Only the subjects with normal otoscopic and tympanometric findings were included in the study. Patients with conductive and mixed hearing loss were excluded from further study.

Audiologic examinations were conducted in double sound isolation booths. Clinical audiometer Madsen OB 822 was used for the PTA. Pure-tone air conduction stimuli were presented to the test ear via a set of TDH-50P headphones. The B71 bone-conductor was used for presentation to the mastoid process. Tonal audiometry was used to measure the air conduction threshold at the octave frequencies between 125 and 12 000 Hz in 5 dB steps, using a standard procedure. Bone-conduction thresholds were measured at 500–4 000 Hz using the same procedure. In accordance with the level of their hearing loss, subjects were classified into the following groups: normal, with hearing level (HL) loss (< 15 dB HL) – 32 ears, slight (16–25 dB HL) – 18 ears, mild (26–40 dB HL) – 16 ears, moderate (41–55 dB HL) – 11 ears, moderately severe (56–70 dB HL) – 14 ears, and severe (71–90 dB HL) – 1 ear. The sample comprised of 24 ears with low frequency loss, 26 ears with high frequency loss and 42 ears with flat PTA configuration.

The ASSR measurements were conducted using an Interacoustics ASSR device. During the examination, subjects were supine and a stimulus was presented via inserted earphones calibrated at hearing level. Stimuli were 0.5, 1, 2, and 4 kHz modulated tones with 40 kHz modulation rate. This modulation rate has been chosen because in 2002, Cone-Weston et al.^{2,7}, showed that the best results are obtained in adults using this modulation rate. Registration electrodes were placed on both mastoids (Reference), at the hair-line (Active), and on the low forehead (Ground). Impedance for all electrodes was 3 kOhm, or less.

The investigator who performed ASSR had no insight into hearing threshold determined by means of PTA, so the measurement was undertaken using the intensity higher than the anticipated one, followed by intensification at 5 dB increments. The lowest stimulus intensity at which ASSR response was registered for the given frequency was accepted as an ASSR hearing threshold.

After the PTA and the ASSR measurement, the results for each subject were compared and statistically evaluated. Following the statistical analysis, the results were considered to be significant when *p* value was less than 0.05.

Results

Table 1 demonstrates mean values for the entire sample by 0.5, 1, 2, and 4 kHz frequencies. It is found that the difference in mean PTA and ASSR values is lowest at 1 kHz frequency (2.5 dB), while at the other three frequencies, the difference is approximately 4 dB.

In 24 ears characterized by low frequency loss, Pearson coefficient was between 0.86 (4 kHz) and 0.97 (2 kHz). In 26 ears with high frequency loss, the correlation coefficient was between 0.88 (0.5 kHz) and 0.97 (2 kHz). However, in 42 ears with the flat PTA configuration, it was between 0.91 (0.5 kHz) and 0.95 (1 and 2 kHz). There was no statistically significant difference among correlation coefficients for the whole sample.

Table 1
Mean pure tone audiometry (PTA) and auditory steady-state response (ASSR) values (in decibels) on a hearing loss scale for the assessed frequencies

Method	0.5 kHz	1 kHz	2 kHz	4 kHz
	$\bar{x} \pm SD$	$\bar{x} \pm SD$	$\bar{x} \pm SD$	$\bar{x} \pm SD$
Behavioral (PTA)	29.8 ± 21.1	26.2 ± 22.6	28.4 ± 25.2	32.5 ± 25.7
ASSR	33.9 ± 22.9	28.7 ± 21.5	32.8 ± 21.9	36.7 ± 26.2
Difference	4.1 ± 7.1	2.5 ± 5.2	4.4 ± 6.1	4.2 ± 6.9

High standard deviation (SD) values were due to the fact that the sample comprised subjects with variable hearing threshold, ranging from normal hearing to severe hearing loss.

In the whole group of 92 analyzed ears, a correlation between hearing thresholds determined by the ASSR and the PTA was found at all 4 frequencies.

Figure 1 shows linear regression analysis of the relation between PTA and ASSR thresholds.

Figure 2 shows the correlation coefficient for the PTA and the ASSR hearing threshold level with respect to the level of hearing loss.

The results show that the strongest correlation between the PTA and the ASSR hearing thresholds exist for moderate hearing loss, while the greatest deviation exists for the normal hearing and slight hearing loss. Severe hearing loss was found on one examined ear, and it was therefore excluded from the statistical analysis.

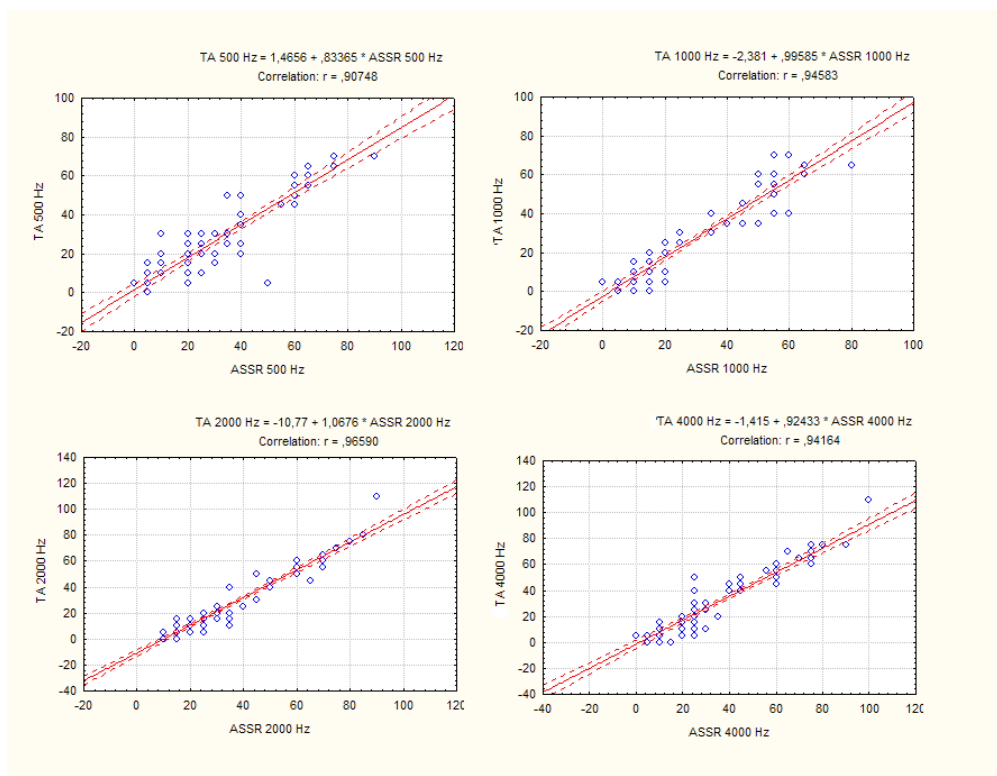


Fig. 1 – Linear regression analysis of the relation between pure tone audiometry (PTA) and auditory steady-state response (ASSR) thresholds

At all the 4 examined frequencies, the correlation coefficient was greater than 0.9. The high correlation coefficient level between ASSR and PTA thresholds was also found in groups with different tonal audiometry configurations.

We had to determine the specific hearing thresholds by examined frequencies, as statistically significant correlation was not sufficient for PTA threshold estimation. Therefore, the differences between the mean PTA and the ASSR hearing

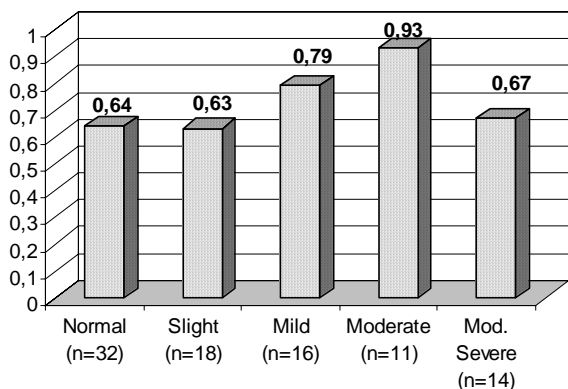


Fig. 2 – Correlation coefficient for pure tone audiometry and auditory steady-state response hearing threshold level with respect to the level of hearing loss

thresholds were analyzed for every individual subject. The results shown in Figure 3 demonstrate that in as many as 85% of subjects, the difference between the mean PTA and the ASSR hearing level was within the tolerable range for the clinical hearing threshold evaluation – less than 10 dB. Individually, the examined differences were within range of 0–45 dB. The biggest difference was found in a subject with normal hearing threshold, at the two examined frequencies.

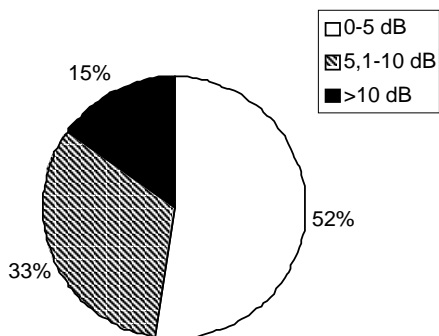


Fig. 3 – Difference between mean hearing thresholds determined by pure tone audiometry and auditory steady-state response (in decibels - dB)

The difference between mean hearing thresholds determined by the PTA at 0.5, 1, 2, and 4 kHz, and by the ASSR, with respect to the level of hearing loss is shown in Figure 4.

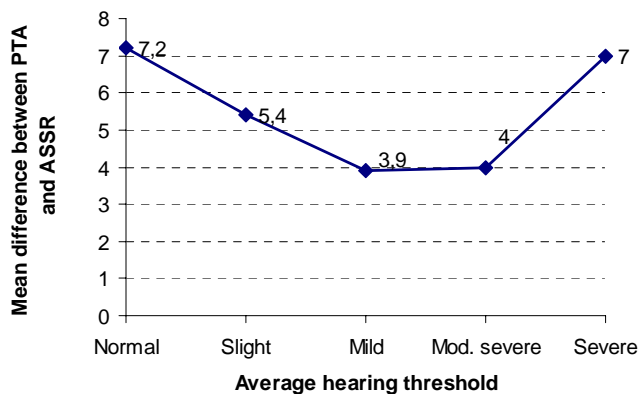


Fig. 4 – Mean difference between pure tone audiometry (PTA) and auditory steady-state response (ASSR) with respect to the level of hearing loss (in decibels – dB)

Normal: < 15 dB; slight: 16–25 dB; mild: 26–40 dB; moderate-severe: 41–70 dB; severe: 71–90 dB

A slight difference was found for mild and moderately severe hearing loss, 3.9 and 4.0 dB, respectively, while at normal hearing threshold the difference between the examined parameters was greatest – 7.2 dB on average.

Discussion

The limitations of the objective diagnostic methods, especially the lack of ability to evaluate the frequency specific hearing thresholds will most probably become overridden by the use of the ASSR.

For the entire sample, this comprised subjects with normal hearing as well as those with different levels of hearing loss. The difference between hearing thresholds determined by PTA and ASSR ranged from 2.5 dB at 1 kHz to 4.4 dB at 2 kHz. Swanepoel et al.⁸, who analyzed 12 ears with moderate hearing loss, found the slightest difference of 2 dB at 1 kHz, and greatest difference at 500 Hz. The results from other studies also confirmed that the difference between the hearing thresholds ranged from 3–14 dB.

This study confirms a very high level of correlation between hearing thresholds determined by the ASSR and the PTA. Correlations found for all of the examined frequencies (0.5, 1, 2, 4 kHz) were greater than 90%. This high level of correlation was also confirmed by other recent studies^{9,10}. Attias et al.⁴ found the mean correlation coefficient of approximately 0.95 regardless of a carrier frequency (ranging from 0.86 at 0.5 kHz to 0.94 at 2 kHz). Certain studies demonstrated a significant lower level of correlation at 500 Hz compared with other frequencies. This difference is most commonly found in subjects with normal hearing threshold in which the variation between hearing thresholds determined by the ASSR and the PTA is the highest.

Sample stratification by an audiometric configuration revealed no statistically significant differences between flat type, low frequency and high frequency hearing loss. In all three groups, a high level of correlation between the ASSR and the PTA thresholds was found. A strong correlation between the different audiometric configurations was also found by other authors^{11,12}. These findings confirm hypothesis that the ASSR examination may predict configuration of audiometric findings with a very high level of cer-

tainty, which cannot be achieved by other audiological methods.

The obtained correlation coefficients with respect to the level of hearing loss showed that they were the lowest in subjects with normal hearing (0.64) and slight hearing loss (0.63), and the greatest in subjects with moderate hearing loss (0.93). The similar results were described by other authors^{8,13,14}. By implementing otoacoustic emissions (OAE) into the objective audiometry diagnostic algorithm this ASSR limitation is easily removed.

A clinically tolerable error in hearing threshold evaluation especially when making a hearing aid plan is approximately 10 dB. In our study, more than half of examined subjects had deviation less than 5 dB, while one third had deviation of 10 dB. A deviation greater than 15 dB was observed in only 15% of the subjects, and it ranged up to 45 dB in two subjects with normal hearing threshold. With respect to the level of hearing loss, the difference larger than 10 dB was observed in as many as 10 of 32 subjects with normal hearing (31.25%), one subject from slight hearing loss group (5.5%), and in one subject from moderately severe hearing loss group (7.4%). In the group with mild hearing loss, the difference between the ASSR and the PTA thresholds was within 10 dB range in all 16 subjects. These results are consistent with the results reported by other authors which also demonstrate that the largest differences between the exam-

ined thresholds are found precisely in the group with subjects who had a normal hearing threshold^{8,9,12}.

Conclusion

In the group with mild and moderate hearing loss, the ASSR method determines hearing thresholds at 4 major frequencies with great accuracy. In this group of patients the ASSR objectively predicts the configuration of an audiogram making it a much more reliable method that can be used for the prediction of frequency specific auditory thresholds rather than using the ABR.

The ASSR is not an optimal diagnostic method for determining the hearing threshold in the group of normal-hearing subjects which cannot be evaluated with behavioral PTA. More simple objective method – OAE can determine the normal hearing or deviation of approximately 35 dB HL in these subjects. On the other hand, subjects in which reproducible OAE response is not achieved should undergo auditory evoked potential testing in order to evaluate the level of their hearing loss.

In conclusion, the ASSR can be excellent complementary method which together with other diagnostic methods represents valuable tool in more precise determination of hearing thresholds.

R E F E R E N C E S

1. Canale A, Lacilla M, Cavalot AL, Albera R. Auditory steady-state responses and clinical applications. *Eur Arch Otorhinolaryngol* 2006; 263(6): 499–503.
2. Cone-Wesson B, Dowell RC, Tomlin D, Rance G, Ming WJ. The auditory steady-state response: comparisons with the auditory brainstem response. *J Am Acad Audiol* 2002; 13: 173–87.
3. Laukli E, Fjermedal O, Mair IW. Low-frequency auditory brainstem response threshold. *Scand Audiol* 1988; 17: 171–8.
4. Attias J, Buller N, Rubel Y, Raveh E. Multiple auditory steady-state responses in children and adults with normal hearing, sensorineural hearing loss, or auditory neuropathy. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 2006; 115: 268–76.
5. Picton TW, Dimitrijevic A, Perez-Abalo MC, Van Roon P. Estimating audiometric thresholds using auditory steady-state responses. *J Am Acad Audiol* 2005; 16(3): 140–56.
6. Dimitrijevic A, John MS, Van Roon P, Purvell DW, Adamonist J, Ostroff J, et al. Estimating the audiogram using multiple auditory steady-state responses. *J Am Acad Audiol* 2002; 13: 205–24.
7. Yeung KNK, Wong LLN. Prediction of hearing thresholds: comparison of cortical evoked response audiometry and auditory steady state response audiometry techniques. *Int J Audiol* 2007; 46: 17–25.
8. Swanepoel D, Hugo R, Roode R. Auditory steady-state responses for children with severe to profound hearing loss. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 2004; 130(5): 531–5.
9. Lin YH, Ho HC, Wu HP. Comparison of auditory steady-state responses and auditory brainstem responses in audiometric assessment of adults with sensorineural hearing loss. *Auris Nasus Larynx* 2009; 36(2): 140–5.
10. Ahn JH, Lee HS, Kim YJ, Yoon TH, Chung JW. Comparing pure-tone audiometry and auditory steady-state response for the measurement of hearing loss. *Otolaryngol Head Neck Surg* 2007; 136(6): 966–71.
11. Ballay C, Tonini R, Waninger T, Yoon C, Manolidis S. Steady-state response audiometry in a group of patients with steeply sloping sensorineural hearing loss. *Laryngoscope* 2005; 115(7): 1243–6.
12. Vander Werff KR, Brown CJ. Effects of audiometric configuration on threshold and suprathreshold auditory steady-state responses. *Ear Hear* 2005; 26(3): 310–26.
13. Swanepoel D, Hugo R, Roode R. Auditory steady-state responses for children with severe to profound hearing loss. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 2004; 130(5): 531–5.
14. Scherf F, Brokx J, Wuyts FL, Van de Heyning PH. The ASSR: Clinical application in normal-hearing and hearing-impaired infants and adults, comparison with the click-evoked ABR and pure-tone audiometry. *Int J Audiol* 2006; 45:281–6.

Received on August 11, 2009.

Revised on March 31, 2009.

Accepted on April 19, 2009.



Infekcija kandidom albicans kod bolesnika sa oralnim planocelularnim karcinomom

Candida albicans infection in patients with oral squamous cell carcinoma

Miloš Čanković, Marija Bokor-Bratić

Univerzitet u Novom Sadu, Medicinski fakultet, Klinika za stomatologiju,
Novi Sad, Srbija

Apstrakt

Uvod/Cilj. Kandidijaza zbog rezistencije na terapiju predstavlja značajan problem u jedinicama intenzivne nege. Tokom zračne terapije oboleli od karcinoma glave i vrata imaju povišen rizik od razvoja oralne kandidijaze koja je češća kod onih bolesnika sa prethodnom gljivičnom kolonizacijom. Otkrivanje faktora koji povećavaju sklonost ka gljivičnoj infekciji olakšava i njenu eliminaciju zbog čega je cilj ispitivanja bio da se utvrdi prisustvo gljiva roda *Candida* na tumorskoj leziji kod bolesnika sa primarnim planocelularnim karcinomom usne duplje i uporedi sa nalazom kod bolesnika sa benignim promenama oralne sluzokože (kontrolna grupa). **Metode.** Prospektivnom studijom obuhvaćeno je 30 bolesnika (24 muškarca i 6 žena), prosečne starosti 61,47 godine (od 41 do 81 godine) kod kojih je klinički i histološki dijagnostikovani planocelularni karcinom usne duplje. Kontrolnu grupu činilo je 30 ispitanika (16 muškaraca i 14 žena), prosečne starosti 54,53 godine (od 16 do 83 godine) sa klinički vidljivom i histološki potvrđenom benignom promenom sluzokože usne duplje. Redosled ispitanika obe grupe određen je redosledom dolaska na lečenje. Materijal za mikološko ispitivanje uzet je brisom sa površine karcinoma, dok je kod ispitanika kontrolne grupe bris uzet sa klinički benigne

promene. Za identifikaciju gljiva korišćen je Mackenzie test germinacije. **Rezultati.** Utvrđeno je statistički značajno veće prisustvo gljiva kod bolesnika sa oralnim karcinomom nego kod ispitanika kontrolne grupe ($\chi^2 = 5,455$, $p = 0,020$). U grupi bolesnika sa oralnim karcinomom gljive roda *Candida* nađene su na 9 od 30 površina karcinoma – kod 5 bolesnika (16,7%) izolovana je *non-albicans Candida*, a kod 4 (13,3%) *Candida albicans*. U kontrolnoj grupi, kod 2 ispitanika (6,7%) izolovana je samo *Candida albicans*. Nije utvrđena statistički značajna razlika u prisustvu gljiva u odnosu na pol, uzrast, pušenje cigareta, konzumiranje alkohola, nošenje zubnih proteza i lokalizaciju karcinoma. **Zaključak.** Značajno prisustvo gljiva na površini karcinoma ukazuje na potrebu njihove eliminacije pre nego što se pristupi terapiji oralnog karcinoma. Pol, uzrast, pušenje cigarete, konzumiranje alkohola, nošenje zubnih proteza i lokalizacija karcinoma ne utiču na prisustvo gljiva kod bolesnika sa oralnim karcinomom.

Ključne reči:

usta, neoplazme; karcinomi, planocelularni; kandidijaza, oralna; candida; candida albicans; dijagnoza; mikrobiologija; gljivice; lečenje; faktori rizika.

Abstract

Background/Aim. Systemic candidiasis in intensive care units remains an important problem due to antifungal resistance. Patients undergoing radiotherapy for head and neck cancer are at increased risk of developing oral candidiasis and they more frequent have prior fungi colonization. Due to identification of specific risk factors predisposing to fungal infection in order to threat such patients the aim of this study was to determine the presence of *Candida* species in patients with oral squamous cell carcinoma and compare it to the control subjects (patients with benign oral mucosal lesions). **Methods.** A total number of 30 consecutive oral cancer examined patients were included in this prospective study (24 men and 6 women

with a mean age of 61.47 years, range 41-81 years). The control group consisted of 30 consecutive patients with histologically proven benign oral mucosal lesions (16 men and 14 women with a mean age of 54.53 years, range 16–83 years). The samples for mycological examination were obtained by using sterile cotton swabs from the cancer lesion surface and in the patients of the control group from the benign mucosal lesion surface. Samples were inoculated in Sabouraud' dextrose agar. For identification purposes, Mackenzie germ tube test was performed on all isolates. **Results.** The prevalence of *Candida* was significantly higher in oral cancer patients than in control subjects ($\chi^2 = 5.455$, $p = 0.020$). *Candida* was found on nine of the 30 cancer surfaces; 5 (16.7%) were identified as *non-albicans Candida* and 4 (13.3%) as *Candida albicans*.

In the control group, only *Candida albicans* was isolated from 2 (6.7%) patients. In this study, no statistically significant differences in the presence of *Candida* species was found with respect to gender, age, smoking, alcohol consumption, wearing of dental prostheses and the site of cancer lesion. **Conclusion.** The increased prevalence of yeasts on the surfaces of oral carcinoma indicates a need for their suppression before any cancer treatment. There was no

evidence for an association between gender, age, smoking, alcohol consumption, wearing of dental prostheses, the site of cancer lesion and the yeast presence.

Key words:

mouth neoplasms; carcinoma squamous cell; candidiasis, oral; candida; candida albicans; diagnosis; microbiology; yeasts; therapeutics; risk factors.

Uvod

Gljive roda *Candida* čine deo normalne mikrobne flore usne duplje kod 40% ljudi. *Candida albicans* je dominantna vrsta koja se može izolovati iz usne duplje, dok su ostale *non-albicans Candida* vrste mnogo manje zastupljene. Prevalencija oralne kandidijaze uzrokovane *non-albicans Candida* vrstama je u porastu poslednjih godina zbog povećanog broja imunokompromitovanih bolesnika¹. Oralna kandidijaza često nastaje zbog kserostomije², kod starih osoba^{3,4}, bolesnika u terminalnoj fazi karcinoma^{5,6} i bolesnika na zračnoj terapiji glave i vrata^{7,8}. U literaturi se nalazi vrlo malo podataka o prisustvu gljiva u usnoj duplji bolesnika sa oralnim karcinomom. Barrett i sar.⁹ histološkom *periodic acid-Schiff* (PAS) metodom otkrili su prisustvo hifa u značajnom broju preparata sa epitelnom displazijom i planocelularnim karcinomom usne duplje. Međutim, McCullough i sar.¹ iznose da PAS metoda nije precizna i zbog toga je ne preporučuje za otkrivanje gljiva. Nagy i sar.¹⁰ mikološkim ispitivanjem utvrdili su prisustvo gljive *Candida albicans* na površini oralnog karcinoma kod 38% bolesnika. Zbog moguće kontaminacije operativnog polja, pre hirurške terapije oralnog karcinoma preporučuje se lokalna primena antimikotika¹⁰. S obzirom na to da je većina *non-albicans Candida* vrsta neosetljiva na azolne antimikotike indikovana je primena nistatina⁶.

Cilj rada bio je da se utvrdi prisustvo gljiva roda *Candida* na tumorskoj leziji kod bolesnika sa primarnim planocelularnim karcinomom usne duplje i uporedi sa nalazom u kontrolnoj grupi bolesnika sa oralnim lezijama benignog tipa.

Metode

U prospektivnoj studiji u Klinici za maksilofacijalnu hirurgiju Kliničkog centra Vojvodine u Novom Sadu, u periodu od juna 2007. do avgusta 2008. godine ispitano je 30 bolesnika (24 osobe muškog i šest ženskog pola), prosečne starosti 61,47 godine (41–81 godina) kojima je klinički i histološki dijagnostikovani planocelularni karcinom usne duplje. Kontrolnu grupu činilo je 30 ispitanika (16 muškog i 14 ženskog pola), prosečne starosti 54,53 godine (16–83 godine) sa klinički vidljivim i histološki potvrđenim benignim promenama sluzokože usne duplje. Njihove dijagnoze bile su sledeće: *Sialoadenitis chronica nonspecifica* (dva bolesnika), *Haemangioma capillare mucosae* (tri bolesnika), *Granuloma pyogenicum* (četiri bolesnika), *Fibroma mucosae* (osam bolesnika), *Papiloma mucosae* (dva bolesnika), *Mucocoelae mucosae* (četiri bolesnika), *Polypus mucosae* (tri bolesnika), *Cystis retentionis* (dva bolesnika) i *Inflammatio subacuta non*

specifica (jedan bolesnik). U grupi bolesnika sa karcinomom bilo je 24 osobe koje su pušile cigarete, 20 osoba koji su svakodnevno konzumirale alkoholna pića i devet bolesnika sa totalnom protezom (tri osobe su samo pušile cigarete, jedna samo pila alkohol, jedna samo nosila totalnu protezu, 13 su bili pušači i pili alkohol, dvoje su bili pušači i nosili totalnu protezu, a njih šest bili su pušači, konzumirali su alkohol i nosili totalnu protezu). U kontrolnoj grupi bilo je sedam pušača, šest bolesnika koji su svakodnevno pili alkohol i 12 bolesnika sa totalnom protezom (četiri – samo pušači, jedan – samo konzumirao alkohol, pet – samo nosili totalnu protezu, dva – pušači i nosili totalnu protezu, četiri – konzumirali alkohol i nosili totalnu protezu i jedan – pušač, konzumirao alkohol i nosio totalnu protezu). Redosled ispitanika obe grupe određen je redosledom dolaska na lečenje. Bolesnicima su u pisanoj formi predočene informacije o sadržaju istraživanja i nameni dobijenih rezultata i nakon upoznavanja sa procedurom ispitivanja od njih je dobijena potpisana saglasnost za učestvovanje u ovoj studiji. Istraživanje je odobreno od Etičke komisije Medicinskog fakulteta u Novom Sadu.

Materijal za mikološko ispitivanje uziman je brisom sa površine karcinoma dok je kod ispitanika kontrolne grupe bris uziman sa makroskopski benigne promene. Brisevi su u roku od dva sata transportovani do Zavoda za mikrobiologiju Instituta za javno zdravlje Vojvodine u Novom Sadu, gde su odmah zasejavani na Sabouraud dekstrozni agar i inkubirani u aerobnim uslovima na 37 °C tokom 48 sati, a zatim na sobnoj temperaturi još 24 sata. Za identifikaciju gljiva korišćen je Mackenzie test germinacije. Za statističku obradu podataka korišćen je komercijalni statistički program SPSS 14 for Windows. Podaci za atributivna obeležja prikazani su u obliku apsolutnih i relativnih brojeva, a za numerička putem srednjih vrednosti i mera varijabiliteta. Za testiranje razlika između dve grupe korišćen je Studentov *t* test, za numerička obeležja, odnosno χ^2 test ili χ^2 test sa Jeitsovom korekcijom za atributivna obeležja. Vrednost $p < 0,05$ smatrana je statistički značajnom.

Rezultati

U grupi bolesnika sa karcinomom bilo je četiri puta više osoba muškog od osoba ženskog pola, dok su u kontrolnoj grupi polovi bili skoro podjednako zastupljeni. Razlika u polnoj zastupljenosti između grupa bila je statistički značajna ($\chi^2 = 4,800$, $p = 0,028$). Međutim, nije postojala statistički značajna razlika u prosečnoj starosti bolesnika sa oralnim karcinomom i onih iz kontrolne grupe (Studentov *t* test, $p = 0,068$).

Podaci prezentovani u tabeli 1 pokazuju da je karcinom najčešće bio lokalizovan na podu usne duplje (33,3%), gin-

vida *albicans*. U kontrolnoj grupi kod svih 6,7% ispitanika izolovana je samo vrsta *Candida albicans* (tabela 2). U obe

Tabela 1
Lokalizacija promena oralne sluzokože kod bolesnika sa oralnim karcinomom i bolesnika sa benignim lezijama usne duplje (kontrolna grupa)

Lokalizacija promene	Grupe ispitanika			
	karcinom usne duplje		benigne lezije usne duplje	
	n	%	n	%
Jezik	4	13,3	13	43,3
Obraz	2	6,7	3	10
Donja usna	1	3,3	10	33,3
Gornja usna	0	0	1	3,3
Meko i tvrdo nepce	2	6,7	1	3,3
Gingiva mandibule	6	20	1	3,3
Pterigomandibularna regija	2	6,7	1	3,3
Pod usne duplje	10	33,3	0	0
Orofarinks	3	10	0	0
Ukupno	30	100	30	100

givi mandibule (20,0%) i jeziku (13,3%). U kontrolnoj grupi lezije su najčešće bile lokalizovane na jeziku (43,3%) i donjoj usni (33,3%).

Pozitivan nalaz brisa na gljive utvrđen je kod 30% bolesnika sa oralnim karcinomom i kod 6,7% ispitanika kontrolne grupe. Utvrđeno je statistički značajno veće prisustvo gljiva kod bolesnika sa oralnim karcinomom nego u kontrolnoj grupi ($\chi^2 = 5,455$, $p = 0,020$). U grupi bolesnika sa oralnim karcinomom, kod 16,7% osoba sa pozitivnim nalazom izolovane su *non-albicans Candida* vrste, a kod 13,3% *Can-*

grupe ispitanika primenom χ^2 test (Jejtsova korekcija) nije utvrđena statistički značajna veza između prisustva gljive *Candida* i pola (grupa sa karcinomom: $p = 1,000$; kontrolna grupa: $p = 0,525$), lokalizacije (grupa sa karcinomom: $p = 0,725$; kontrolna grupa: $p = 1,000$) pušenja cigareta (grupa sa karcinomom: $p = 1,000$; kontrolna grupa: $p = 1,000$), konzumiranja alkohola (grupa sa karcinomom: $p = 0,673$; kontrolna grupa: $p = 0,855$) i nošenja totalne proteze (grupa sa karcinomom: $p = 1,000$; kontrolna grupa: $p = 0,296$) (tabela 3).

Tabela 2
Zastupljenost vrsta izolovanih gljiva u grupi bolesnika sa karcinomom usne duplje i kontrolnoj grupi ispitanika sa benignim lezijama

Izolovane gljive	Grupe ispitanika				Ukupno	
	karcinom usne duplje		benigne lezije usne duplje		n	%
	n	%	n	%	n	%
Gljive nisu izolovane	21	70	28	93,3	49	81,7
<i>Candida albicans</i>	4	13,3	2	6,7	6	10
<i>Candida spp.</i>	5	16,7	0	0	5	8,3
Ukupno	30	100	30	100	60	100

Tabela 3
Predisponirajući faktori kod ispitanika sa pozitivnim nalazom brisa na gljive

Grupe ispitanika (redni broj)	Ispitivani faktori rizika od nastanka gljiva					
	životno doba (god.)	pol	lokalizacija lezije	pušenje	alkohol	totalna proteza
Karcinom usne duplje						
1	65	m	jezik	- + *	++ §	- ††
2	68	m	obraz	- +	- **	-
3	64	ž	jezik	+ †	-	-
4	65	ž	gingiva mandibule	+	-	+ ††
5	56	m	tonzilarna regija	+	++	+
6	71	m	nepce	+	++	+
7	56	m	gingiva mandibule	+	++	-
8	69	m	pod usta	+	-	-
9	59	m	pterigomandibularna regija	+	++	-
Benigne lezije usne duplje						
1	55	ž	jezik	- ‡	-	+
2	76	ž	donja usna	-	+ ¶	+

*pušač do otkrivanja tumora; †aktuelno pušač – više od 20 cigareta dnevno; ‡nepušač; ¶0–20 g/ alkohola dan (do 2 čašice od 0,3 dL žestokog pića, 1 čaše vina ili 1 pivo od 0,5 L); §više od 20 g/ alkohola dan; **ne pije alkohol; †ne nosi totalnu protezu; †† nosi totalnu protezu; m – muški pol; ž – ženski pol

Diskusija

Dijagnoza oralne kandidijaze postavlja se na osnovu kliničkih simptoma i znakova i pozitivnog rezultata mikrobiološkog ispitivanja. U tu svrhu materijal za analizu je bris uzet sa vidljive promene oralne sluzokože¹¹. Materijal se može uzeti i tehnikom otiska i ispirkom usne duplje, ali se ove dve tehnike koriste za utvrđivanje kolonizacije usne duplje^{12, 13}.

Primenom tehnike brisa sa površine karcinoma, u ovom istraživanju utvrđeno je statistički značajno veće prisustvo gljiva kod bolesnika sa oralnim karcinomom (30%) nego u kontrolnoj grupi ispitanika sa benignim lezijama oralne sluznice. Od značaja je da je u dve ranije publikovane studije takođe primenjena metoda uzimanja brisa i da su dobijeni slični rezultati. Tako su Nagy i sar.¹⁰ utvrdili prisustvo gljiva na površini karcinoma kod osam od 21 (38%) bolesnika sa oralnim karcinomom. Davies i sar.⁵ utvrdili su oralnu kandidijazu kod 36 od ukupno 120 (30%) bolesnika sa uznapredovalim karcinomom različite lokalizacije (bronha, prostate, dojke, rektuma).

Na značaj ispitivanja gljivične kolonizacije usne duplje bolesnika sa karcinomom u predelu glave i vrata upućuju rezultati studija u kojima je utvrđeno da kod bolesnika sa pret hodnom kolonizacijom mnogo češće nastaje oralna kandidijaza tokom zračne terapije^{7, 8}. Neke studije¹ iznose da se kolonizacija usne duplje može dokazati kod značajnog broja bolesnika sa histološki dijagnostikovanim oralnom epitelnom displazijom i oralnim karcinomom, i da je stepen displazije u korelaciji sa brojem gljiva.

Iako je dokazano da histološka metoda identifikacije gljiva nema klinički značaj¹, Barrett i sar.⁹ ipak navode da identifikacija PAS pozitivnih hifa može biti značajna za kliničara jer ukazuje na to da se u tkivu odvija težak patološki proces.

U odnosu na zastupljenost pojedinih vrsta gljive *Candida* na površini karcinoma Nagy i sar.¹⁰ identifikovali su samo *Candida albicans*. Međutim, u našem istraživanju *Candida albicans* nađena je kod 45,5% osoba sa pozitivnom nalazom, a u nešto više od polovine (55,5%) utvrđena je *non-albicans Candida*. Sličan odnos vrste *Candida* utvrđen je u usnoj duplji bolesnika sa uznapredovanim tumorom različitih organa^{2, 6-8, 14}. Posebno treba naglasiti da je u našoj studiji *non-albicans Candida* izolovana samo sa površine karcinoma usne duplje.

Prilikom mikrobiološke analize, u ovom ispitivanju primenjena je samo metoda identifikacije *Candida albicans*, te stoga nismo bili u mogućnosti da identifikujemo ostale izolovane *non-albicans Candida* vrste. Različite studije su, uz identifikaciju *non-albicans Candida* do nivoa vrste, pokazale da su najzastupljenije *Candida glabrata*, *Candida tropicalis*, *Candida parapsilosis* i *Candida dubliniensis*^{2, 6-8, 14}. Identifikacija pojedinačnih vrsta *Candida* ima klinički značaj koji se odnosi na sprovođenje adekvatne terapije, jer većina

non-albicans vrsta ima smanjenu osetljivost na azolne antimikotike kao što su flukonazol i itrakonazol⁶.

Zbog pojave rezistencije, bolničke infekcije izazvane gljivama roda *Candida* predstavljaju značajan medicinski problem, naročito u jedinicama intenzivne nege¹⁵. Novija istraživanja u našoj zemlji pokazala su da su *Candida spp.* uzročnici 4,1% bolničkih infekcija krvi¹⁶, i da čine 3,5% flore izolovane sa vrha centralnog venskog katetera¹⁷.

Naše ispitivanje je pokazalo da ne postoji značajna veza između prisutva gljive *Candida* i pola, uzrasta, pušenja cigareta i konzumiranja alkohola. Davies i sar.¹⁴ utvrdili su da pol i uzrast ne utiče na gljivičnu kolonizaciju usne duplje bolesnika sa uznapredovalim karcinomom. Nasuprot tome, istraživanja zdrave odrasle populacije pokazala su da je kolonizacija usne duplje gljivom *Candida albicans* češća kod muškaraca¹⁸. Kod osoba starije životne dobi kolonizacija usne duplje prisutna je kod 30–75% osoba^{4, 19}, a kod više od 50% osoba identifikovana je *non-albicans Candida*³. Neke studije ukazuju na to da pušenje cigareta značajno utiče na gljivičnu kolonizaciju usne duplje osoba zdrave odrasle populacije^{18, 20}.

Dobro je poznato da su zubne proteze najznačajniji predisponirajući faktor za nastanak oralne kandidijaze^{4, 21}. Kolonizacije usne duplje *non-albicans Candida* vrstama prisutna je kod 70–84% osoba starije životne dobi koje nose zubne proteze^{3, 22, 23}. U našem ispitivanju nije dokazana veza između nošenja zubnih proteza i prisutva gljive *Candida* na površini karcinoma. Isti rezultat saopšavaju Bagg i sar.⁶ kod bolesnika sa karcinomom u terminalnoj fazi. Međutim, Davies i sar.¹⁴ ukazuju na to da nošenje zubnih proteza značajno utiče na kolonizaciju usne duplje bolesnika sa karcinomom različitih organa.

U okviru kolonizacije usne duplje utvrđeno je da se gljive najčešće i u najvećem broju mogu izolovati sa zadnje trećine dorzalne površine jezika²⁴. Međutim, potrebno je naglasiti da je u našem ispitivanju, od 13 osoba kontrolne grupe sa promenom na jeziku, samo kod jedne osobe izolovana *Candida albicans*. Osim toga, od ukupno četiri bolesnika, kod dva izolovana je gljiva sa površine karcinoma lokalizovanih na jeziku. Dobijeni rezultati ukazuju na to da lokalizacija karcinoma usne duplje nema uticaja na prisustvo gljiva.

U literaturi nema podataka o uticaju pola, uzrasta, pušenja cigarete, konzumiranja alkohola i nošenja zubnih proteza na prisustvo gljiva kod bolesnika sa oralnim karcinomom. Zbog toga se nameće potreba za istraživanjem na većem uzorku obolelih koji će potvrditi naše rezultate.

Zaključak

Značajno prisustvo gljiva na površini karcinoma ukazuje na potrebu njihove eliminacije pre nego što se pristupi terapiji oralnog karcinoma. Pol, uzrast, pušenje cigarete, konzumiranje alkohola, nošenje zubnih proteza i lokalizacija karcinoma ne utiču na prisustvo gljiva kod bolesnika sa oralnim karcinomom.

L I T E R A T U R A

1. *McCullough M, Jaber M, Barrett AW, Bain L, Speight PM, Porter SR.* Oral yeast carriage correlates with presence of oral epithelial dysplasia. *Oral Oncol* 2002; 38(4): 391–3.
2. *Sweeney MP, Bagg J, Baxter WP, Aitchison TC.* Oral disease in terminally ill cancer patients with xerostomia. *Oral Oncol* 1998; 34(2): 123–6.
3. *Resende MA, Sousa LVNF, Oliveira RCBW, Koga-Ito CY, Lyon JP.* Prevalence and antifungal susceptibility of yeasts obtained from the oral cavity of elderly individuals. *Mycopathol* 2006; 162: 39–44.
4. *Fanello S, Bouchara JP, Jousset N, Delbos V, LeFlobic AM.* Nosocomial *Candida albicans* acquisition in a geriatric unit: epidemiology and evidence for person-to person transmission. *J Hosp Infect* 2001; 47: 46–52.
5. *Davies AN, Brailsford SR, Beighton D.* Oral candidosis in patients with advanced cancer. *Oral Oncol* 2006; 42(7): 698–702.
6. *Bagg J, Sweeney MP, Lewis MAO, Jackson MS, Coleman D, Al Mosaid A, et al.* High prevalence of non-albicans yeasts and detection of anti-fungal resistance in the oral flora of patients with advanced cancer. *Palliat Med* 2003; 17: 477–81.
7. *Redding SW, Zellars RC, Kirkpatrick WR, McAtee RK, Caceres MA, Fothergill AW, et al.* Epidemiology of oropharyngeal *Candida* colonization and infection in patients receiving radiation for head and neck cancer. *J Clin Microbiol* 1999; 37: 3896–900.
8. *Jham BC, Franca EC, Oliveira RR, Santos VR, Kowalski LP, Freire AR, et al.* *Candida* oral colonization and infection in Brazilian patients undergoing head and neck radiotherapy: a pilot study. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2007; 103: 355–8.
9. *Barrett AW, Kingsmill VJ, Speight PM.* The frequency of fungal infection in biopsies of oral mucosal lesions. *Oral Dis* 1998; 4: 26–31.
10. *Nagy KN, Sonkodi I, Szöke I, Nagy E, Newman HN.* The microflora associated with human oral carcinomas. *Oral Oncol* 1998; 34(4): 304–8.
11. *Skoglund A, Sunzel B, Lerner UH.* Comparison of three test methods used for the diagnosis of candidiasis. *Scand J Dent Res* 1994; 102: 295–8.
12. *Arendorf TM, Walker DM.* Oral candidal populations in health and disease. *Br Dent J* 1979; 147: 267–72.
13. *Samaranayake LP, MacFarlane TW, Lamey PJ, Ferguson MM.* A comparison of oral rinse and imprint sampling techniques for the detection of yeast, coliform and *Staphylococcus aureus* carriage in the oral cavity. *J Oral Pathol* 1986; 15: 386–8.
14. *Davies AN, Brailsford S, Broadley K, Beighton D.* Oral yeast carriage in patients with advanced cancer. *Oral Microbiol Immunol* 2002; 17: 79–84.
15. *Weber DJ, Raasch R, Rutala WA.* Nosocomial infections in the intensive care unit: the growing importance of antibiotic resistant pathogens. *Chest* 1999; 115: 34S–41S.
16. *Šuljagić V, Mirović V.* Epidemiological characteristics of nosocomial bloodstream infections and their causes. *Vojnosanit Pregl* 2006; 63(3): 124–31. (Serbian)
17. *Miošević V, Šuljagić V, Jovanović B, Gligorijević J, Jovanović S, Mazzić N.* Risk factors for the appearance of central venous catheters colonisation. *Vojnosanit Pregl* 2007; 64(11): 760–4. (Serbian)
18. *Moalić E, Gestalin A, Quinio D, Gest PE, Zerili A, Le Flobic AM.* The extent of oral fungal flora in 353 students and possible relationships with dental caries. *Caries Res* 2001; 35: 149–55.
19. *Närhi T, Ainamo THE, Meurman J.* Salivary yeasts and mucous oral in the elderly salivates. *J Dent Res* 1993; 72: 1009–14.
20. *Shin ES, Chung SC, Kim YK, Lee SW, Kho HS.* The relationship between oral *Candida* carriage and the secretor status of blood group antigens in saliva. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2003; 96: 48–53.
21. *Kulak-Ozkan Y, Kazazoglu E, Arikan A.* Oral hygiene habits, denture cleanliness, presence of yeasts and stomatitis in elderly people. *J Oral Rehabil* 2002; 29(3): 300–4.
22. *Blair Y, Bagg J, MacFarlane TW, Chestnutt I.* Microbiological assessment of denture hygiene among patients in longstay and daycare community places. *Community Dent Oral Epidemiol* 1995; 23: 100–3.
23. *Grimoud AM, Marty N, Bocquet H, Andrieu S, Lodter JP, Chabanon G.* Colonization of the oral cavity by *Candida* species: risk factors in long-term geriatric care. *J Oral Sci* 2003; 45: 51–5.
24. *Arendorf TM, Walker DM.* The prevalence and intraoral distribution of *Candida albicans* in man. *Arch Oral Biol* 1980; 25: 1–10.

Primljen 13. VIII 2009.
Revidiran 10. XII 1009.
Prihvaćen 15. I 2010.



Ljudska prava i medicina

Human rights and medicine

Svetozar Čiplić*, Milutin Djuričić*, Ivan Bulatović*, Dušan Spasojević†

Vlada Republike Srbije, *Ministarstvo za ljudska i manjinska prava, †Ministarstvo odbrane,
Beograd, Srbija

Ključne reči:

medicina; zdravlje u svetu; ljudska prava;
zakonodavstvo; etika, medicinska; organizacija
ujedinjenih nacija.

Key words:

medicine; world health; human rights; jurisprudence;
ethics, medical; united nations.

Uvod

U savremenom svetu brojna pitanja posvećuju se shvaćanjima odnosa prema medicini i ostvarivanju čovekovog prava na zdravlje i zdravstvenu zaštitu. Društvene, moralne i pravne norme koje uređuju zdravstvenu delatnost svojim instrumentalnim karakterom ostvaruju socijalne ciljeve, obezbeđuju nesmetan rad javnih službi i zdravstvenih organizacija, kao i pojedinaca u njima. U široj društvenoj zajednici, pa tako i u zdravstvu, suočeni smo sa raznim dilemama i različitim situacijama koje uslovljavaju različita rešenja. Postoji stalna težnja za napretkom, ali se stvaraju i opasnosti od sukoba pojedinačnih interesa sa širim društvenim interesima, što se naročito može ispoljiti u oblasti medicine koja se temelji na najvišim naučnim, humanim i tehničkim saznanjima i vrednostima. To se posebno ogleda na polju alternativne – tradicionalne terapije. Otvaraju se brojna pitanja iz oblasti prava i dužnosti, odgovornosti, samovolje, altruizma i sebičnosti, humanizma i otuđenosti. Ova i druga pitanja zahtevaju da se zajedno sa zdravstvenim radnicima tim pitanjima bave i biolozi, filozofi, teolozi, pravnici, genetičari, humanisti kako bi se pronašlo najbolje rešenje, poštujući pri tome pravo i dostojanstvo bolesnika i uvažavajući odgovornost i sposobnost zdravstvenog radnika.

Pravne norme iz oblasti medicine spadaju u najstarije, ali se naročito brzo razvijaju i komplikuju sa napretkom medicine i društvenih odnosa u zdravstvu kao i odnosa i odgovornosti zdravstvenih službi i zdravstvenog osoblja.

Pravo na zdravlje kao osnovno i neotuđivo ljudsko pravo zajemčeno je od strane Generalne skupštine Organizacije ujedinjenih nacija (OUN) koja je izrazila svoje opredeljenje kroz mnogobrojne aktivnosti i kroz Univerzalnu deklaraciju o ljudskim pravima (usvojena 10. decembra 1948. godine, posle Drugog svetskog rata u kome su zabeležene masovne

povrede ljudskih prava). Članom 25 pomenute deklaracije pored ostalog uređeno je: „Svako ima pravo na standard života koji obezbeđuje zdravlje i blagostanje njegovo i njegove porodice, uključujući hranu, odeću, stan i lekarsku negu i potrebe socijalne službe...“¹. Preambulom pomenute deklaracije o ljudskim pravima ističe se potreba da zajedničke standarde koje ona propisuje treba da podstiču svi narodi i sve nacije da bi svaki pojedinac i svaki organ društva, imajući ovu deklaraciju stalno na umu, težio ostvarenju ovih prava i sloboda.

Ljudska prava i medicinska etika

Kraj prethodnog, 20. veka, i početak novog milenijuma karakteriše značajan napredak u ostvarivanju i učvršćivanju osnovnih prava ljudi, ali se to ne može reći i za prava pacijenata. Ona još nisu potpuno definisana, a njima se malo bave i brojne novostvorene organizacije (kod nas i u svetu) koje tretiraju raznovrsna prava u oblasti zaštite ljudi.

Može se reći da su osnovne vrednosti zaštite ljudskih prava utvrđene kao „prirodna prava“ (tradicionalna ljudska prava, jer važe za sve ljude, u svim situacijama). Osnove ovih prava sadržane su u pravnoj regulativi svih sistema pozitivnog prava, tj. imaju značaj da su iznad „pisanog prava“. Osnovna ljudska prava (čl. 23–81 Ustava Republike, Službeni glasnik Republike Srbije, br. 98, od 10. novembra 2006), u svojoj suštini su moralna prava, tj. prirodna prava čoveka. Njihova zaštita i pravna uređenost pokazuju kvalitet pozitivnog pravnog sistema određene države. Ujedno, osnovna ljudska prava su i univerzalna prava čoveka, odnosno trebalo bi da budu.

Brojne su rasprave o odnosima pojedinca i društva, tj. sukobima interesa između njih. Primera radi, upotreba pojedinca izvan njega samoga ne dolazi u obzir, tj. pojedinac se

ne može žrtvovati za ostvarivanje društvenih ciljeva. Ovaj princip naročito se jasno sagledava kroz zabranu eksperimentiranja ljudskim bićem radi ostvarivanja koristi za druge društvene ciljeve što nije moralno opravdano, naročito protiv volje i pristanka tog pojedinca, kako je navedeno u Helsinškoj deklaraciji iz 1964. godine. Znači, čovek pojedinac je mera svega, tj. sebi cilj i ne može biti sredstvo za postizanje socijalnih ciljeva.

U prethodnom delu teksta pomenuta je Deklaracija o pravima čoveka i za neko idealno društvo takva dokumenta (deklaracije, preporuke) bila bi dovoljna za uređenje društvenih odnosa. Nažalost, živimo u vremenu i svetu koji sve manje prihvata moralne standarde, poštovanje etike iznad prava i tehnologije, a ljudi iznad stvari, odnosno duha iznad materije.

Postoje brojni zakonski propisi² koji obavezuju lekare da prisustvuju izvršenju smrtnih kazni ili raznih vrsta torture nad čovekom sve do uključivanja – isključivanja aparata za održavanje života, čak i u situacijama kada život gubi smisao. Skoro su nesagledive tehnološke mogućnosti održavanja života, što kod lekara stvara nesigurnost u oslobađanju odgovornosti prema umirućem bolesniku, posebno njegovoj porodici. Česti su slučajevi produžavanja procesa umiranja agresivnim medicinskim tretmanima u vremenu sveopšte ekonomske i druge krize kada su medicinska sredstva nedovoljna za sve bolesnike.

Za bolesnika, često i njegovu porodicu, lekar u procesu lečenja je poput boga. Osim toga često lekarskom samozadovoljstvu pomaže i stanovište zastupano u zdravstvenim udruženjima da medicinska etika mora ostati u rukama zdravstvenih radnika, oslobođena od svih verskih, političkih ili bilo kojih drugih uticaja. Pravo na uvid u medicinsku praksu, smatra se, trebalo bi da imaju isključivo zdravstveni radnici – lekari.

Iako nepopularno, mora se postaviti pitanje da li se važna društvena oblast, kao što je medicina, može prepustiti zdravstvenim radnicima.

Osnovna prava na lečenje i prava pacijenata

Bolesnik je u osetljivom položaju zbog bolesti i u takvom psihičkom stanju da se njegov odnos prema zdravstvenom radniku po pravilu ne zasniva na principu ravnopravnosti, tj. jednakosti. U principu, bolesnik traži pomoć za svoju bolest – stanje, pa u takvom psihičkom stanju može prihvatiti ili odbiti određene medicinske zahteve i tretmane. Bolesnikova prava su ograničena i mnogobrojnim javnim zdravstvenopravnim normama (liste lekova, pomagala, overene knjžice i sl).

Ako su bolesnici maloletni ili su duševni bolesnici, o njima odlučuju roditelji ili staratelji, pa njihova volja ne dolazi do izražaja. Slično je stanje kod senilnih osoba, bolesti zavisnosti i slično, odnosno u svim slučajevima kada bolesnik ne može da izrazi svoju volju za lečenjem, pa se pravnim normama nastoji da se ostvare pretpostavke za lečenje i takvih bolesnika (po ugledu na skandinavske zemlje i Srbija je uvela ombudsmansku u zaštiti prava bolesnika).

Svakako da je nužno vršiti naučna istraživanja i na ljudima, uključujući i zdrave dobrovoljce, a ne samo bolesnike, što u sebi nosi posebne etičke dileme i probleme. Neophodno je kontrolisati inovacije u tretmanu ili dijagnostici pri kliničkom radu, što se čini preko etičkih komiteta kao stručnih tela koja razmatraju postupke i protokole za naučnoistraživački rad. U suštini, sve zakonodavne inicijative koje pokušavaju da zaštite prava bolesnika pravnim normama i omogućuće zdravstvenom radniku adekvatno postupanje, svode se na povećanje i naglašavanje humanog pristupa lečenju.

Treba, međutim, naglasiti da nijedan etički kodeks ne priznaje izričito pravo bolesne osobe. Hipokratova zakletva odnosi se na pravo lekara da se služi sopstvenom odlukom ili procenom da bi služio bolesniku, a ne da ne bi kršio njegova prava. Praktično, lekar razmatra posledice, a ne prava bolesnika jer to je pravno individualisano, tj. postavljeno pragmatično, a svodi se na praktičnu vrednost i korist za život, što država uređuje propisima.

Nasuprot predhodnom svatanju ističemo utilitarizam kao filozofsko učenje, što podrazumeva da sve što je korisno za čoveka istovremeno je i moralno, a to znači da se vodi računa o dobrobiti za najveći broj ljudi, pa, shodno tome, zdravstvena politika treba da se odvija u tom cilju.

Treće stanovište svodi se na etiku prava i obaveza utemeljenih na ljudskim pravima što podrazumeva odnos uzajamnih prava sa jedne i nosioca obaveza sa druge strane. Praktično, pravo na zdravstvenu zaštitu podrazumeva obavezu državnih organa da obezbede i sprovedu zaštitu zdravlja stanovništva.

Zdravlje i ljudska prava

Zdravlje i ljudska prava tesno su povezani. Njihove dodirne tačke odnose se na nasilje, mučenje, ropstvo, diskriminaciju, uslove stanovanja i dr.³ Obaveze poštovanja ljudskog prava propisane su Univerzalnom deklaracijom o ljudskim pravima (ICESCR), koju je usvojilo 1948. godine 48 zemalja, a danas prihvatila 191 država i koja je postala međunarodno običajno pravo, kao i Međunarodnim paktom o građanskim i političkim pravima (ICCPR).

Kriterijumi na osnovu kojih se vrednuje ostvarivanje prava na zdravlje ljudi mogli bi se klasifikovati u četiri grupe i to:

1. Dostupnost kao kriterijum uključuje efikasnu infrastrukturu i usluge javnog zdravlja kao i dostupnu kvalitetnu zdravstvenu zaštitu.
2. Pristupačnost podrazumeva nediskriminaciju, fizičku pristupačnost, pristupačne cene i informacije.
3. Prihvatljivost podrazumeva poštovanje načela lekarske etike, osetljivosti za različita životna doba i zdravstvene institucije, u cilju poboljšanja zdravlja i zdravstvenog stanja svih korisnika.
4. Kvalitet podrazumeva kompletnu zdravstvenu infrastrukturu, koja bi trebalo da bude naučno i medicinski kvalitetna.

Pomenuta i druga prava utvrđena su međunarodnim pravom država koje su ta akta prihvatile i obavezale se da obezbede uslove za ostvarivanje tih prava. Vladine komisije,

ombudsmeni i nevladine organizacije treba da nadgledaju ispunjavanje državnih obaveza u ostvarivanju prava na zdravlje. Naravno, države mogu u slučaju potrebe (npr. zbog epidemije) uvesti i neke restriktivne mere zbog opšteg dobra – značaja, kao što je ograničenje kretanja stanovništva i sl.

Zdravlje stanovništva mora se sagledavati kao pojam koji obuhvata široke potrebe društva, s jedne strane, i stanje pojedinaca, s druge strane. U preambuli Statuta Svetske zdravstvene organizacije, zdravlje se definiše kao „stanje potpunog fizičkog, psihičkog i društvenog blagostanja, a ne samo odsustvo bolesti“. Navedena definicija upućuje na potrebu razvijanja svesti kod građana o širokom obimu pojma zdravlja, koji prevazilazi odsustvo bolesti: razvijati samosvest kod ljudi u vezi sa ljudskim pravom na zdravlje, pojam zdravlja tretirati kao osnovnu ljudsku i društvenu potrebu, povezivati zdravlje sa osnovnim ljudskim pravima.

Smatramo da je potrebno da navedemo hronologiju posebnih prava na zdravlje iz međunarodnih dokumenata o ljudskim pravima⁴:

1946 – osnivanje Svetske zdravstvene organizacije,

1966 – usvajanje Međunarodnog pakta ekonomskih, socijalnih i kulturnih prava,

1975 – Deklaracija o potrebi naučnog i tehnološkog napretka u interesu mira za dobrobit čovečanstva,

1975 – Deklaracija o pravima osoba sa posebnim potrebama,

1978 – Deklaracija iz Alma Ate,

1991 – Načela za zaštitu mentalno bolesnih osoba i poboljšanje zaštite mentalnog zdravlja,

1991 – Načela UN o starim osobama,

1992 – Konferencija UN o okolini i razvoju (UNCED),

1993 – Deklaracija o ukidanju nasilja nad ženama,

1994 – Međunarodna konferencija o stanovništvu i razvoju (ICPD),

1995 – Četvrta svetska konferencija o ženama (FWCW),

1997 – Opšta deklaracija o ljudskom genomu i ljudskim pravima,

1998 – Deklaracija o pravima i odgovornostima pojedinačnih grupa i društvenih tela u promovisanju i zaštiti opštepriznatih ljudskih prava i osnovnih sloboda,

1998 – Smernice o premeštaju lica u državi,

2002 – Svetski sastanak na vrhu o održivom razvoju,

2002 – imenovanje posebnog izvestioca o pravu na zdravlje.

Hronologija međunarodnopravnih dokumenata koja se odnose na zaštitu zdravlja kao osnovnog ljudskog prava ukazuje na potrebu međunarodne zajednice da po završetku Drugog svetskog rata, kada su zabeležene višemilionske žrtve i stradanja izazvana nasiljem, obezbedi postradalom stanovništvu zaštitu prava i sloboda.

Srbija je prihvatila sva međunarodnopravna dokumenta koja regulišu zaštitu osnovnih prava građana. Ipak, posle oružanih sukoba na području bivše SFRJ usledio je ogroman dolazak izbeglica i „raseljenih lica“ koja su tražila zaštitu od rata, pa je pravo na život postalo ključna reč za pravo na zdravlje. U takvim uslovima teško je bilo obezbediti pravo na bezbedan život, a time i pravo na zdravlje. Svakako, u takvim prilikama ljudska prava su višestruko ugrožena i po tome ćemo, pored ostalog, pamtili kraj prošlog milenijuma, ali većini ljudi ostaće u sećanju i pozitivni primeri i nadčovečni naponi zdravstvenih radnika da pruže nužnu medicinsku pomoć i negu bolesnima i postradalima, bez obzira na nacionalne i druge razlike.

Zaključak

Pravo na zdravlje kao osnovno ljudsko pravo predstavlja složen skup raznih pitanja iz oblasti života. Zaštitu prava na zdravlje regulišu međunarodnopravna dokumenta koja obuhvataju zaštitu prava i slobodu ljudi. Najveći broj zemalja članica OUN prihvatile su pravnu regulativu tih dokumenata, pa se izводи zaključak da ukoliko se narušava neko pravo građana, onda to povlači za sobom široku lepezu narušavanja svih prava.

Širom analizom napred navedenih međunarodnih pravnih dokumenata vidi se da su zdravlje i ljudsko blagostanje sinonimi, tj. podrazumevaju zadovoljenje svih ljudskih potreba, pa država mora činiti sve da obezbedi zajemčena prava kroz stalno praćenje i stvaranje uslova za potpuno ostvarenje tog prava. Naša država je potpisnik svih pomenutih međunarodnih akata, pa shodno čl. 16 Ustava Republike Srbije ovi propisi čine „sastavni deo pravnog poretka Republike Srbije i neposredno se primenjuju“.

L I T E R A T U R A

1. *Symoniders J, Volodin V.* A Guide to Human Rights, Institutions, Standards, Procedures. Paris: UNESCO; 2001.
2. *Hanski R, Suksi M.* An Introduction to the International protection of human rights abo. Finland: Institute for Human Rights. Abo Academy University; 1999. p. 12–31.
3. *Eide A, Krause C, Rosas A.* Economic, Social and Cultural Rights: A Textbook. 2nd ed. Haag: Kluwer Law; 2001. p. 32–48.
4. *Maddex RL.* International Encyclopedia of Human Rights: Freedoms, Abuses, and Remedies. Washington, DC: CQ Press; 2000.

Primljen 20. VII 2010.

Prihvaćen 2. VIII 2010.



Ethics and deontology in forensic medicine

Etika i deontologija u sudskoj medicini

Suzana Matejić*, Vujadin Otašević†

*University of Priština, School of Medicine, Kosovska Mitrovica, Serbia;

†University of Niš, School of Medicine, Niš, Serbia

Key words:

forensic medicine; ethics medical; ethical theory; legislation; morale; war.

Ključne reči:

medicina, sudska; etika, medicinska; zakonodavstvo; moral; rat, građanski.

Introduction

The origins of medical expertise and medical doctors' responsibility can be found in some of the oldest annals, religious books and laws. In the ancient times of human history, medicine and law were united under the auspices of the Priest-Sorcerer, who guarded "God's laws" and passed judgment for the transgression of these laws. The Code of Laws of the Babylonian king Hammurabi (2200 B.C.) sets the foundations of the relationship between law and medicine and was the first to define the concept of criminal and material responsibility of a medical doctor for mistakes made during treatment. Clear regulations regarding forensic experts can be found in the legislation of the ancient Chinese civilization, as well as Rome, Greece, India, Persia, etc. The founder of medical ethics, Hippocrates (460-370 B.C.), in his voluminous written works and in the Oath itself, clearly emphasized the obligations and rights of medical doctors; he also personally testified as a forensic expert in a paternity case. Thus, throughout human history, and especially since forensic medicine emerged as a defined professional scientific-medical discipline in the 19th century, opinions provided by medical experts were deemed necessary and applied in various forms for specific needs in the domain of public life. In addition, particular attention was given to the rights and obligations of medical doctors, including their liability, in the process of treating patients. These were at times enforced through drastic penalties.

Ethics expertise

Ethics expertise cannot be separated from medical and general ethics, even though it has its own unique characteristics. These unique characteristics come from the specific content, goal and work environment of forensic medicine,

which do not fall outside the bounds of medical ethics. If ethics is separated from medical ethics, this would deny that forensics is a part of medicine. The professional and ethical duty of doctors-forensic experts is to determine medical facts, which they then interpret in order to formulate a truth, determined through expertise, which is useful for the resolution of a given legal question¹. Determination of a medical fact, *ie* a truth determined through expertise, is used in the service of justice, which has been the subject of human aspiration from the beginning of humankind. This gives rise to the fundamental moral and ethical question of forensic experts. Forensic experts would have to possess a high level of ethics and professional morality, which includes being conscious of their own responsibility and self-criticism when accepting to act as a forensic expert, as well as remaining in control when faced with various pressures, threats and even insults etc., guarding control over their own emotions, and keeping the dignity of their profession². They have to be conscious that moral integrity, personal freedom, type and length of punishment of the accused, as well as the livelihood of his family, all depend on the truthfulness of their testimony. A precondition for the correct execution of the duties of forensic experts and for their own clear conscience is that forensic experts have both the necessary personal characteristics (strong character, high level of morality, ethics, courage) and medical knowledge, an understanding of the basic principles of acting as a forensic expert and legal concepts, as well as the ability to express themselves in a clear and understandable way³. Vanity and corruption are in deep collision with the personality of real forensic experts. They have to be aware of the fact that the damaged party might be undergoing rent neurosis, obsessed by the desire to aggravate the position of the person that caused him harm etc., so that this situation calls for patience and an ethical manner of understanding and behavior, but that this should

never affect the correctness of the conclusion of the expert opinion⁴. It can be concluded, directly or indirectly, by looking at the entire history of forensic expertise, that ethical and legal norms determined the profile of medical experts to be one of strong, just, character, and a stable moral-ethical personality. It is not surprising that a commonly asked question is: What kind of person should be someone who practices forensic medicine? This difficult, extremely responsible profession, which is always under scrutiny by different conflicting interests and in which various dramatic events collide, affecting human destinies, depends mostly on the just character traits of forensic experts and on their moral-ethical stability. Forensic experts will only be humanists, aware of ethical needs of their profession, in as much as they work on developing these traits. This kind of aspiration towards justice is in harmony with a righteous stance towards life and ethics⁵. Life demands truth because of itself, and it demands justice for itself, so that we are always searching for truth while at the same time longing for justice. Love of truth, as one of the imperative characteristics of a forensic expert, demands a conscious investigation in each individual case of the forensic expert's work because of each case's uniqueness and many unknowns. Thus, the battle for the truth determined through expertise is of an investigative character, and it can be reached more quickly if investigation is constructed on correct bases in a just manner. Forensic experts persistently look for the truth, exerting in this task great effort and diligent work, to form a realistic picture, founded on integrity, morals and ethics. Honorable forensic experts state the truth clearly, without hesitation or disdain. They are honorable, even though they do not put down other forensic experts and if they admit their own mistakes. When forensic experts, in front of the court and parties to a dispute, behave arrogantly, conceitedly, artificially, and when they speak about themselves, trying to impose their own professional authority and in this, through general cliché phrases, negate the opinion and degrade other forensic experts, they are breaking the foundations of medical ethics and human honor. It should be understood that true forensic experts correct, through determined medical facts, the mistakes made by previous experts consciously or unconsciously; however, this should be done in a healthy collegial spirit and within the moral ethical principles of the profession. To negate the opinion of a previous forensic expert because of envy, self promotion, and especially materialistic reasons or protectionism, means to commit one of the biggest sins and to put oneself among the lowest sorts of humankind. Self promotion, through which forensic experts emphasize that they come from a larger forensic medicine institution and a larger urban center, by which they are trying to impose their own professional inviolability, only shows their professional inferiority or a conscious lack of objectivity. Forensic medicine institutions in large centers offer privileges and grater opportunities for access to scientific information and professional training, but this is no guarantee that each such medical expert will be superior in all respects compared to another one who comes from outside of such a center. It is clear that no scientific or urban center can give forensic ex-

perts the characteristics which they must possess on a personal level; they must bring these characteristics with themselves to school, which then provides them with technical knowledge. It is difficult to find an example of a sin, injustice or another human vice more grave than the abuse (or use for personal ends) of human suffering. The conscious and purposeful abuse of a forensic expert's work out of material advantage and protectionism, no matter on which side, gravely undermines the legal, social and moral integrity of one of the parties in a dispute, while it makes the expert's actions equal to crime and serious immorality. Forensic experts perform a job which often permeates human destinies, so that grave mistakes, especially those committed consciously or out of carelessness, help injustice and aggravate the suffering of people who are already in a difficult situation. In such circumstances of life's misfortunes, succumbing to bribes, protectionism and envy, means treading over other people's pain and human lives.

Ethics role of the forensic expert

Forensic medicine is utilized by legal institutions in the process of determining the legal truth, but at the same time it illuminates, for health institutions, the existing problems in the domain of the public health care. This necessary link between forensic and curative medicine is most commonly established through medical documentation used in expertise. It seems as though the accuracy and completeness of medical documentation is of an increasingly weaker quality, despite contemporary epochal accomplishments in the domains of medical science and medical technique. An expert needs documentation, which contains data from the anamnesis, objective finding, laboratory procedures, clinical diagnosis and therapy. Because such complete documentation is more unusual than superficial and incomplete documentation, the forensic expert must not resort to improvisation and assumptions; he must instead demand additional documentation or an examination of the damaged party and he must present conclusions conditional on available medical facts. Through the advancement of medical science and the acquisition of new knowledge, the professional obligations of medical doctors are becoming much greater, while medical and social tasks are becoming more complicated⁶. For this reason, a medical doctor in the role of a forensic expert, who does not keep up with the latest knowledge and possibilities, becomes trapped in professional inertia, which causes him to make mistakes towards people and his profession. The concept of deontology combines both ethics and professionalism, and this symbiosis ensures that the humane principles of medicine are guarded. For this reason, medical forensic experts, who neglect to keep educating themselves in their profession, while performing the tasks of forensic medicine, can never get past the threshold of morality and ethics, and can never stand on the platform of justice and law, no matter what their self-promotional skills, current position or title⁷.

In matters of forensic medicine expertise, one often hears about investigations of the scene of the crime, which, at least in the area of the Balkans, are not treated with ade-

quate importance. It is clear that it is the job of the investigative judge to organize and implement the investigation at the scene of the crime, and that all participants work according to the judge's instructions and permission. Forensic medicine specialists should be understood as assistants, or consultants, to the investigative judge. They work in agreement, with the permission, and under the leadership of the judge, helping the judge in the discovery, recording and gathering of traces and other evidence⁸. They call the judge's attention to all the particularities of the specific case related to the domain of the forensic profession; they provide the necessary clarifications with respect to the value of certain observations. Even though the help of medical doctors to the investigative judge during the investigation of the crime scene often plays a significant role in the investigative phase of the process, their role should not be overstated. Medical doctors at the investigation of the crime scene must not behave arrogantly, with too much self-confidence, and imposingly, if they wish to stay within the moral-ethical bounds of their profession⁹. In the same way that the primary obligation of police officers is to ensure that the crime scene remains intact, and that of investigative judges is to organize the investigation of the crime scene, the primary obligation of medical doctors is the procedural and moral-ethical obligation to help the judges in gathering evidence important for the subsequent investigative procedure, and to do this using their professional knowledge in a correct and responsible way.

This topic (ethics and deontology in forensic medicine) should not be closed without commenting on forensic medicine in conflict situations, and especially post-conflict environments, in which the morality, ethics, and humanity of forensic experts are put to the greatest test¹⁰. Wars leave human bodies in pieces, body parts, mass graves, human bones mixed up in piles, micro-traces of burnt human bodies, etc. It happens that families spend months and years waiting for their missing members, hoping, even when there is no more hope, that they will come back. After the wars in the Balkans, the discovery of mass and individual graves has been difficult and slow; these are being hidden, so that forensic experts, together with anthropologists, geologists, stomatologists, criminologists, and other members of the team, come across the remains of human bones mixed up together, mak-

ing it necessary to separate, differentiate and identify them. There is no subject of forensic expertise, in the field of forensic medicine, with so many enigmas, as these types of corpse remains, which the family of the deceased awaits with sorrow. In these cases, forensic medical experts have in front of them the remains of human bodies, and, without asking which warring party, religion, or race they belonged to, they reconstruct the skeleton, determine the cause of death and identity of the deceased. There is no alternative to a diligent investigation and professional integrity of forensic experts in such situations; only in this way can this complex and human job, which resolves long-lasting suffering and uncertainty for the family of the deceased, be done correctly. In this way, forensic medical doctors, who are being looked to for answers and who are the subject of hope and expectations, undoubtedly perform the most human deed, and confirm themselves as highly moral and professional people¹¹. Any superficiality, rashness, improvisation or similar act in this job, would lead to great sin in front of God and people, and would throw forensic experts into a professional, moral, and ethical abyss.

Conclusion

Professional and ethical duty of doctors, forensic experts is to determine medical facts, which they then interpret in order to formulate a truth, determined through expertise, which is useful for the resolution of a given legal question. The determination of a medical fact, *ie* a truth determined through expertise, is used in the service of justice, which has been the subject of human aspiration from the beginning of humankind. This gives rise to the fundamental moral and ethical question of forensic experts. This topic (ethics and deontology in forensic medicine) should not be closed without commenting on forensic medicine in conflict situations, and especially post-conflict environments, in which the morality, ethics, and humanity of forensic experts are put to the greatest test. In this way, forensic medical doctors, who are being looked to for answers and who are the subject of hope and expectations, undoubtedly perform the highest human deed, and confirm themselves as highly moral and professional people.

R E F E R E N C E S

1. *Dolenc A.* Medical ethics and deontology I. Ljubljana: Mihelač; 1995. (Slovenian)
2. *Dolenc A.* Medical ethics and deontology II. Ljubljana: Mihelač; 1997. (Slovenian)
3. *Knight B.* Simpson's forensic medicine. 10th ed. London: Edward Arnold; 1993.
4. *Otašević V.* Forensic expert on the crossroads. Niš: Prosveta; 1997. (Serbian)
5. *Zečević D.* Forensic medicine and deontology. 4th ed. Zagreb: Medicinska naklada; 2004. (Croatian)
6. *Otašević V.* Forensic medicine. Niš: Prosveta; 2002. (Serbian)
7. *Otašević V, Pejaković S.* Medical ethics and deontology. Niš: Prosveta; 2001. (Serbian)
8. *Pejaković S, Otašević V.* Development of ethical customs and moral behavior. Niš: Prosveta, 1999. (Serbian)
9. *Pejaković S.* The customs of forensic expertise and customs of criminal law. Beograd: Naučna knjiga; 1973. (Serbian)
10. *Dobričanin S, Matejić S, Milošević M, Jakšić V.* Case Račak – forensic medicine in charge of politics. Praxis Medica 2001; 28: 71–6. (Serbian)
11. *Plueckhahn VD, Corder SM.* Ethics, legal medicine and forensic pathology. 2nd ed. Melbourne: University Press; 1991.

Received on December 24, 2008.

Revised on April 19, 2010.

Accepted on May 4, 2010.



Sudskomedicinsko tumačenje preloma tubera gornje vilice nastalog prilikom vađenja zuba

Forensic interpretation of the maxillary tuberosity fracture caused by tooth extraction

Dragana Puzović*, Snježana Čolić†

Univerzitet u Beogradu, Stomatološki fakultet, *Institut za sudsku medicinu,

†Klinika za oralnu hirurgiju, Beograd, Srbija

Apstrakt

Uvod. Prelom tubera gornje vilice jedna je od komplikacija koje se dešavaju prilikom vađenja zuba. Cilj ovog rada je prikaz bolesnika sa prelomom tubera gornje vilice, nastalim prilikom vađenja zuba, koji je bio predmet sudskomedicinske ekspertize. **Prikaz bolesnika.** Prelom tubera gornje vilice koji je nastao u toku vađenja gornjeg kutnjaka nije blagovremeno, niti na adekvatan način bio zbrinut od strane lekara koji je započeo vađenje zuba. Nakon završenog lečenja u specijalističkoj ustanovi, bolesnik je tužio lekara za krivično delo nesavesnog lečenja. Zadatak veštaka bio je da stručno odgovori na pitanje da li je lekar koji je u toku ekstrakcije zuba izazvao prelom tubera gornje vilice nesavesno postupio i primenio nepodoban način lečenja. **Zaključak.** Prelom tubera gornje vilice u toku vađenja kutnjaka predstavlja komplikaciju ove intervencije i ako se blagovremeno dijagnostikuje i odmah i na adekvatan način zbrine, nema elemenata za pokretanje sudskomedicinskog veštačenja.

Ključne reči:

zub, ekstrakcija; maksila, prelomi; lečenje, ishod; intraoperativne komplikacije; stomatologija, sudska.

Abstract

Background. Maxillary tuberosity during teeth extraction can occur in dental practice. The aim of this paper was to present a case of the maxillary tuberosity fracture occurred during tooth extraction, which was the subject of the forensic expertise. **Case report.** The maxillary tuberosity fracture created during the extraction of the upper molar was neither timely nor adequately managed by the doctor who started extraction. After the treatment at the specialist institution, the patient sued the doctor for the criminal offense of negligent treatment. The task of the expert was to give a professional answer to the question whether the doctor, who caused a maxillary tuberosity fracture during the tooth extraction, acted negligently and applied inadequate treatment. **Conclusion.** The maxillary tuberosity fracture during molar extraction may be its complication. If it is diagnosed promptly, immediately and adequately managed, there is no possibility for negligence action.

Key words:

tooth extraction; maxillary fractures; treatment outcome; intraoperative complications; forensic dentistry.

Uvod

Prilikom vađenja kutnjaka iz gornje vilice moguće su mnogobrojne komplikacije, a jedna od teških je prelom tubera gornje vilice^{1,2}. Povećan rizik od nastanka ove povrede postoji kod bolesnika sa jako pneumatizovanim maksilarnim sinusom³, prilikom vađenja usamljenih kutnjaka (najčešće drugog kutnjaka ili umnjaka), u slučajevima ekstrakcije zuba sa izrazito divergentnim i hiperementotičnim korenovima kao i kod starijih osoba zbog smanjene elastičnosti koštanog tkiva⁴⁻⁸. Takođe, primena prekomerne, nekontrolisane sile, kao i upotreba neodgovarajućih instrumenata u toku ekstrakcije zuba predstavlja dodatni rizik od nastanka ove komplikacije.

Ukoliko se posle pažljivog pregleda i analize radiograma predvidi mogućnost nastanka preloma tubera u toku vađenja zuba, profesionalna je dužnost i obaveza lekara da bolesniku pre intervencije ukaže na tu mogućnost, a pažljivijim pristupom spreči njen nastanak. Ako u toku vađenja zuba ipak dođe do preloma tubera gornje vilice, neophodno je da lekar blagovremeno dijagnostikuje povredu, obavesti bolesnika o nastaloj komplikaciji i primeni adekvatne mere zbrinjavanja. U suprotnom, može se postaviti pitanje krivičnog dela nesavesnog lečenja sa posledičnim sudskim epilogom. U takvim slučajevima sud zahteva izvođenje sudskomedicinske ekspertize kako bi se dao stručni odgovor na pitanje da li nastala povreda predstavlja samo komplikaciju oralnihirur-

ške intervencije ili u sebi sadrži elemente krivičnog dela nesavesnog lečenja.

Cilj rada bio je da prikaže kako nesavesno postupanje doktora stomatologije u zbrinjavanju bolesnika sa prelomom tubera nastalog u toku vađenja zuba može da bude predmet sudskomedicinske ekspertize.

Prikaz bolesnika

Bolesnik u dobi od 36 godina, obratio se stomatologu zbog jakih bolova u predelu drugog gornjeg desnog kutnjaka. Posle obavljenog kliničkog pregleda napravljen je radiogram tog zuba (slika 1) i postavljena indikacija za njegovo vađenje sa čime se bolesnik složio. Po postizanju anestezije započeto je vađenje zuba koje je bilo bezbolno do momenta kada je bolesnik izne-

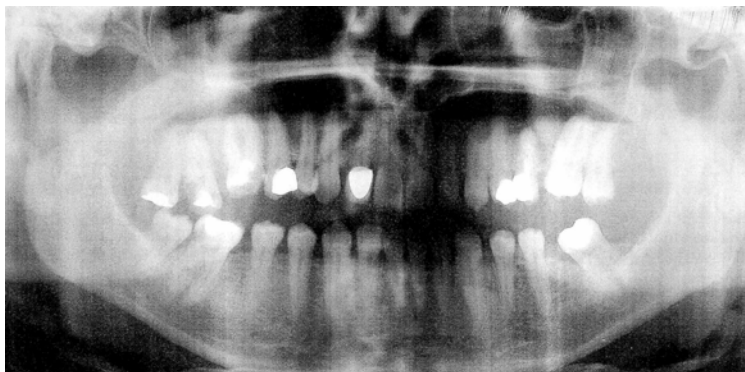


Sl. 1 – Radiogram gornjeg drugog kutnjaka sa desne strane na osnovu kojeg je postavljena indikacija za vađenje ovog zuba

nada osetio jak bol u gornjoj vilici. Intervencija je obustavljena i napravljen je kontrolni radiogram. Doktor je prokomentarisao da se na snimku vidi „da su korenovi zuba spojeni“. Potom je, u prisustvu bolesnika, obavio telefonski razgovor sa kolegom rekavši mu da je „pri ekstrakciji gornjeg kutnjaka došlo do preloma“. Bez ikakvog objašnjenja o nastaloj komplikaciji, bolesniku je zakazao pregled za dva dana uz savet da do tada uzima antibiotike i analgetike. U toku vikenda bolesnik je imao jake bolove, a pojavio mu se i krvni podliv u predelu desnog obraza.

Posle dva dana, u zakazano vreme, bolesnik nije otišao doktoru koji je započeo vađenje zuba, već u specijalističku ustanovu gde je prijem i pregled obavio specijalista oralne hirurģije. Tom prilikom specijalista je konstatovao prisustvo krvnog podliva u predelu desnog obraza, razdemonagnječnu ranu mekog tkiva (gingive) u predelu drugog gornjeg kutnjaka, kao i da su drugi i treći gornji kutnjak bili u supraokluziji. Takođe, napravljen je i ortopantomografski snimak na kome je uočena linija preloma u predelu tubera gornje vilice sa desne strane, kao i proširenje prostora između drugog i trećeg gornjeg kutnjaka sa

iste strane (slika 2). Na osnovu kliničkog pregleda i analize radiograma, specijalista oralne hirurģije postavio je sledeće dijagnoze: *Fractura tuberi maxillae lat. dex. post extractionem dentis 17. Haematoma cutis buccae lat. dex. Vulnus lacerocontusum gingivae in regio 17.* U istoj ustanovi izvršeno je

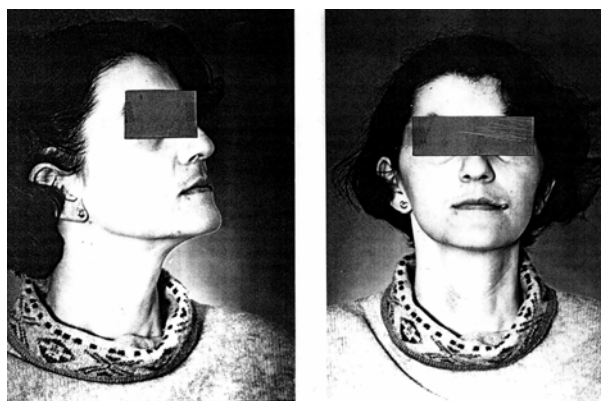


Sl. 2 – Ortopantomografski snimak posle pokušaja vađenja drugog kutnjaka sa desne strane

zbrinjavanje bolesnika sa nastalom komplikacijom. S obzirom na to da nije postojala mogućnost repozicije polomljenog fragmenta, izvršeno je njegovo uklanjanje hirurģkim putem zajedno sa obuhvaćenim zubima (drugi i treći kutnjak). U toku same intervencije ustanovljeno je prisustvo oroantralne komunikacije usled preloma zidova maksilarnog sinusa i u istom aktu izvršeno je njeno zbrinjavanje. Propisani su odgovarajući antibiotici i analgetici, a postoperativni tok protekao je uredno.

Protiv stomatologa koji je, pri pokušaju da bolesniku izvadi zub, polomio i deo gornje vilice, bolesnik je po završenom lečenju podneo krivičnu prijavu optužujući ga za nesavesno lečenje.

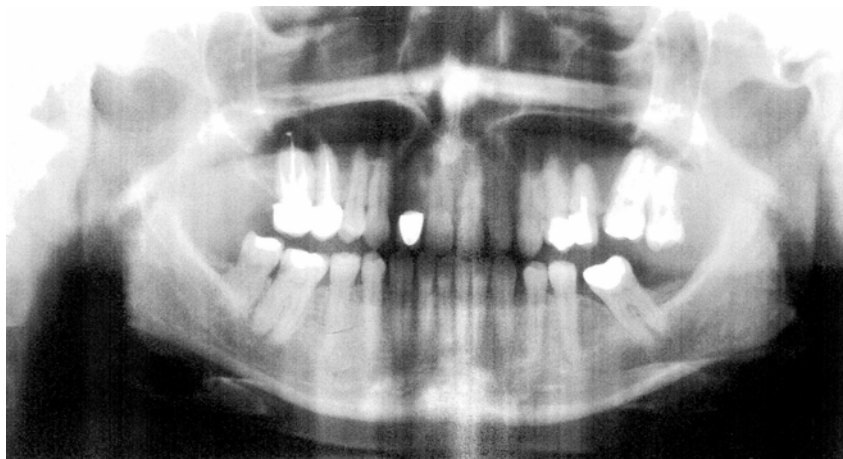
Predmet sudskomedicinskog veštačenja upućen je veštacima na razmatranje sa pitanjem da li je doktor, koji je u toku vađenja zuba izazvao prelom tubera gornje vilice, nesavesno postupio i primenio neodgovarajući način lečenja. Sudskomedicinski veštaci izvršili su uvid u dostavljen sudski spis, priloženu medicinsku dokumentaciju i radiografske snimke sadržane u spisu, obavili klinički pregled, fotografisanje i dodatno ortopantomografsko snimanje bolesnika. Prilikom kliničkog pregleda nisu primećene estetski vidljive promene na licu bolesnika (slika 3). Intraoralnim pregledom uočen je nedostatak



Sl. 3 (a i b) – Izgled bolesnika posle završenog tretmana preloma tubera gornje vilice

drugog i trećeg gornjeg desnog kutnjaka, kao i defekt alveolarnog grebena u predelu ovih zuba, što je potvrđeno i kontrolnim ortopantomografskim snimkom (slika 4).

Na pitanje suda da li je doktor koji je pri vađenju zuba polomio tuber gornje vilice nesavesno postupio i primenio nepodoban način lečenja, angažovani veštaci dali su slede-



Sl. 4 – Kontrolni ortopantomografski snimak dva meseca posle ekstrakcije gornjih kutnjaka i uklanjanja tubera sa desne strane

Diskusija

Jedna od teških komplikacija prilikom vađenja gornjih kutnjaka je prelom tubera gornje vilice. Ponekad je moguće predvideti nastanak preloma i pažljivim radom tada se uglavnom može i izbeći. Ukoliko ipak nastane prelom tubera gornje vilice, neophodno je da doktor dijagnostikuje komplikaciju još u toku same intervencije, ukaže bolesniku na nastalu povredu i što pre preduzme odgovarajuće mere lečenja. Postoji više mogućih terapijskih pristupa^{2, 4, 6-8}. Ako meko tkivo nije povređeno, a polomljeni tuber je vezan za periost, potrebno je pažljivo odvojiti zub od kosti, izvršiti repoziciju i imobilizaciju koštanog fragmenta, a ekstrakcionu ranu ušiti. U slučaju da je vađenje zuba neizvodljivo, a zub je bez patoloških promena (vađenje umnjaka iz ortodontskih razloga), polomljeni fragment može se reponirati i splintirati za susedne zube. U tom slučaju ekstrakcija se odlaže za 6–8 nedelja, kada se zub vadi hirurškim pristupom^{1, 2, 4-7}. Ukoliko je odlomljeni koštani fragment odvojen od mekog tkiva, potrebno ga je odstraniti, oštre koštane ivice zaobliti, a meko tkivo ušiti. Prelom tubera gornje vilice je vrlo često udružen sa prelomom zidova maksilarnog sinusa sa ili bez uspostavljanja oroantralne komunikacije. Ako je komunikacija prisutna, neophodno je da se na adekvatan način zatvori^{3, 6, 7}.

Pored navedenih terapijskih mera bolesniku se, u cilju prevencije nastanka infekcije, savetuje uzimanje antibiotika, a po potrebi i analgetika. Ukoliko doktor stomatologije nije dovoljno stručan da zbrine bolesnika sa komplikacijom, neophodno je da ga hitno uputi odgovarajućem specijalisti. Nedijagnostikovani, nelečeni ili pogrešno lečeni prelom tubera može biti uzrok ozbiljnih sekundarnih komplikacija (krvarenje, infekcija sinusa)^{7, 8}.

će stručno mišljenje: prelom tubera gornje vilice u toku vađenja kutnjaka predstavlja komplikaciju ove intervencije i ako se blagovremeno dijagnostikuje i odmah na adekvatan način pristupi njenom zbrinjavanju nema elemenata za nesavesno postupanje. U opisanom slučaju doktor je napravio nekoliko stručnih propusta. Pre intervencije bolesniku nije ukazao na moguće komplikacije što ukazuje da ili nije prepoznao faktore rizika ili je primenio grubu, nekontrolisanu silu u toku vađenja zuba. Kada je prelom tubera nastao, nije obavestio bolesnika o prirodi nastale povrede i mogućim komplikacijama. Takođe, nije preduzeo ni odgovarajuće mere lečenja, već je samo savetovao uzimanje antibiotika i analgetika. Repoziciju i imobilizaciju polomljenog tubera planirao je tek za 48 sati, čime je izgubljeno dragoceno vreme za sanaciju povrede. Za to vreme došlo je do sekundarne traumatizacije tkiva, usled supraokluzije zuba u polomljenom tuberu i pojave krvnog podliva i bolova. Zbog učinjenih stručnih propusta, u sekundarnom aktu bilo je neophodno operativno uklanjanje polomljenog dela tubera zajedno sa drugim i trećim kutnjakom, za čije vađenje pre frakture tubera nije postojala indikacija. Uklanjanjem polomljenog tubera nastao je defekt alveolarnog grebena čime je značajno otežana eventualna kasnija protetska rehabilitacija.

Zaključak

Prelom tubera gornje vilice u toku vađenja zuba ne predstavlja krivično delo nesavesnog lečenja i nesavesnog postupanja ukoliko doktor u cilju njenog zbrinjavanja blagovremeno preduzme sve odgovarajuće stručne postupke koji su u skladu sa pravilima stomatološke struke i prakse.

L I T E R A T U R A

1. *Todorović Lj, Petrović V, Jurišić M, Kafedžićska-Vračar V.* Oral surgery. Belgrade: Nauka; 2002. (Serbian)
2. *Larsen PE.* Maxillofacial trauma. In: *Miloro M*, editor. Peterson's principle of oral and maxillofacial surgery. 2nd ed. London: BC Decker Inc; 2004. p. 395–6.
3. *Starsbak TJ.* Oral anatomy and physiology. In: *Starsbak TJ, Sanders B*, editors. Preprosthetic oral and maxillofacial surgery. St Louis: Mosby; 1980.
4. *Norman JE, Cannon PD.* Fracture of the maxillary tuberosity. Oral Surg Oral Med Oral Path 1967; 24(4): 459–67.
5. *Weintraub JA, Burt BA.* Oral health status in the United States: tooth loss and edentulism. J Dent Educ 1985; 49(6): 368–78.
6. *Hupp JR, Ellis E III, Tucker MR.* Contemporary oral and maxillofacial surgery. 5th ed. St. Luis: Mosby; 2008.
7. *Altuğ HA, Sabin S, Sencimen M, Dogan N.* Extraction of upper first molar resulting in fracture of maxillary tuberosity. Dent Traumatol 2009; 25(1): e1–2.
8. *Shah N, Bridgman JB.* An extraction complicated by lateral and medial pterygoid tethering of a fractured maxillary tuberosity. Br Dent J 2005; 198: 543–4.

Primljen 6. III 2010.
Revidiran 23. IV 2010.
Prihvaćen 7. V 2010.



Dijagnostika i lečenje primarne amiloidoze

Diagnosis and the treatment of primary amyloidosis

Irena Djunić*, Dragica Tomin*, Maja Peruničić*, Ana Vidović*,
Vesna Čemerikić†, Vladislava Djurašinić*, Ljubomir Jaković*, Gradimir Janković*

*Klinički centar Srbije, Institut za hematologiju, Beograd, Srbija;

†Patohistološka laboratorija „Histolab“, Beograd, Srbija

Apstrakt

Uvod. Primarna amiloidoza spada u grupu monoklonalnih plazma-ćelijskih poremećaja, čija je glavna odlika ekstrakelularno odlaganje fibrila lakih lanaca imunoglobulina u različita tkiva sa posledičnom multiorganskom disfunkcijom. **Prikaz bolesnika.** Prikazali smo 51-godišnju bolesnicu sa prethodnom dvogodišnjom istorijom zamora pri naporu, otokom lica, trbuha i nogu, bolovima u kostima i opstipacijom. Na osnovu elektroforeze i imunoelektroforeze proteina seruma i urina, imunohistohemijskog bojenja bioptata koštane srži i bojenja na Kongo crveno bioptata rektuma, posumnjano je na dijagnozu multiplog mijeloma. Po razmatranju sprovedenih dijagnostičkih procedura i dopune ehosografijom srca i biopsijom potkožnog masnog tkiva sa bojenjem na Kongo crveno, postavljena je dijagnoza primarne amiloidoze. Bolesnica je lečena, najpre intravenskom (*iv*) primenom intermedijarnih doza melfalana i deksametazona do ukupno VIII ciklusa, a potom peroralnom primenom melfalana i deksametazona *iv*, kao terapijom održavanja. Nakon, ukupno, 35 meseci lečenja, postignuta je stabilizacija bolesti. **Zaključak.** Ovaj prikaz bolesnice sa primarnom amiloidozom ukazuje na značaj ranog postavljanja dijagnoze i pravovremenog započinjanja odgovarajućeg lečenja koje je neophodno za poboljšanje prognoze ove bolesti.

Ključne reči:

amiloidoza; dijagnoza, diferencijalna; biopsija; histološke tehnike; melfalan; deksametazon; remisija, indukcija.

Abstract

Background. Primary amyloidosis belongs to a group of monoclonal plasma cell disorders, characterized by extracellular deposition of immunoglobulin light chain fibrils in various tissues and subsequent multiorgan dysfunction. **Case report.** We present a 51-year-old female with 2-years history of fatigue on exertion, oedema of face, abdomen and legs, bone pain and obstipation. After diagnostic procedures such as electrophoresis and immunoelectrophoresis of serum and urine proteins, immunohistochemical staining of bone marrow biopsy specimens and Congo red staining of rectal biopsy specimens, the patient received misdiagnosis of multiple myeloma and was referred to our hospital for further treatment. We reevaluated and complemented diagnostic procedures (echocardiography and biopsy of subcutaneous tissue with Congo red staining), and established diagnosis of primary amyloidosis. The therapy had started with intravenous (*iv*) melphalan and dexamethasone (totally eight cycles) and continued with peroral melphalan and *iv* dexamethasone. Stabilization of the disease was achieved after 35 months of the treatment. **Conclusion.** The case of this rare and often fatal disease emphasizes significance of early diagnosis and, consequently, initiation of specific therapies which are indispensable to improve the disease prognosis.

Key words:

amyloidosis; diagnosis, differential; biopsy; histological techniques; melphalan; dexamethasone; remission induction.

Uvod

Termin amiloidoza odnosi se na grupu različitih bolesti, ali svaka od njih karakteriše se ekstrakelularnim odlaganjem patoloških, nerastvorljivih fibrilarnih proteina u tkiva i organe ¹.

Sva amiloidna vlakna imaju zajedničku sekundarnu strukturu – karakterističnu konfiguraciju β -nabrane ploče ².

Depoziti amiloida imaju jednak nefibrilarni deo molekula, pentraksin serum amiloid P i svi su povezani sa glikozaminoglikanima i proteoglikanima ^{3,4}. Tipovi amiloida razlikuju se po prekursorom proteinu koji stvara fibrile, tako da se i savremena klasifikacija amiloidoze bazira na prirodi prekursorom proteina koji formira fibrilarne depozite ⁵ (tabela 1).

Primarna amiloidoza prema WHO (*World Health Organization*) klasifikaciji spada u grupu klonalnih plazma-ćelij-

Tabela 1

Savremena klasifikacija amiloidoza ⁵		
Protein	Prekursor	Klinički oblik
Amiloidoza lakih lanaca teških lanaca	Imunoglobulini lakih lanaca Imunoglobulini teških lanaca	Primarna amiloidoza ili udružena sa MM i ostalim plazma ćelijskim diskrazijama
Amiloidoza transtiretina Amiloidoza amiloida A	Transtiretin (Apo) serumski protein A	Familijarna i senilna amiloidoza Sekundarna ili reaktivna amiloidoza
Beta ₂ -mikroglobulinska amiloidoza	β ₂ -mikroglobulin	Amiloidoza hronične dijalize sa sindromom karpalnog tunela
Amiloidoza β protein Ostale familijarne amiloidoze (AApoA1, AGel, AFib, ALys)	Amiloid β protein Apolipoprotein A1, gelsolin, α-fibrinogen, lizozim	<i>Alzheimer</i> -ova bolest Retke familijarne amiloidoze udružene sa nefropatijom

skih poremećaja (amiloidoza lakih lanaca – AL), sa godišnjom incidencijom od osam bolesnika na 1 000 000 stanovnika^{6,7}. Klonalne plazma ćelije koštane srži proizvode delove lakih lanaca imunoglobulina (Ig) koji se deponuju u tkiva i organe. Dejstvom enzima tkivnih makrofaga delovi amino-kiselina menjaju mesta na specifičnim pozicijama u varijabilnom (V) delu lakih lanaca Ig što destabilizuje lake lance i povećava sklonost ka amiloidogenezi. Kod AL, odnos κ / λ lakih lanaca je 1 : 3, dok u fiziološkim uslovima odnos κ / λ iznosi 3 : 2. Svi laki lanci VIg su amiloidogeni, ali je λVIg najčešće udružen sa amiloidozom⁸.

Kliničke manifestacije primarne amiloidoze su opšti, nespecifični simptomi, kao i simptomi i znaci zahvaćenosti pojedinih organa i tkiva. Od opštih simptoma najčešće su prisutni: zamor (62%), gubitak težine (52%), purpura (15%) i bol u kostima (5%). Najčešće zahvaćeni organi su: bubreg (81%), srce (55%), nervni sistem (36%) i digestivni sistem (32%)⁵. Više od polovine bolesnika ima depozite amiloida u mišićima, koži i potkožnom tkivu, što daje karakterističan izgled bolesnika: makroglosija, periorbitalni edemi, submandibularni depoziti, alopecija, distrofija noktiju, infiltracija mišića i periartikularnog tkiva ramenog pojasa („rameno jastučće“), makulopapulozni ili lihenoidni plakovi kože i potkožnog tkiva, najčešće u predelu trbuha i ekstremiteta. Purpura i hematomi kože posledica su infiltracije amiloidom sitnih krvnih sudova, kao i inhibicije trombocita i faktora koagulacije, najčešće faktora X¹.

Ukoliko se na osnovu navedenih kliničkih simptoma postavi sumnja na amiloidozu, treba je potvrditi biopsijom tkiva zahvaćenog organa pozitivnom na specifično bojenje Kongo crvenim⁸. Najkomfornije je uraditi biopsiju potkožnog masnog tkiva abdomena koja je kod 85% bolesnika sa primarnom amiloidozom pozitivna na Kongo crveno, ali se može uraditi i ciljana biopsija zahvaćenog organa (bubreg, rektum, jetra)⁷. Za odvajanje amiloidoze lakih lanaca od ostalih tipova amiloidoze, neophodno je uraditi elektroforezu (EF) sa imunoelektroforezom (IEF) proteina seruma i urina, kao i biopsiju koštane srži sa patohistološkom (PH) i imunohistochemijskom (IHH) analizom kojom se utvrđuje prisustvo klonalnih plazma-ćelija^{5,7,8}. U slučaju pozitivnosti jedne od navedenih dijagnostičkih procedura, tj. detekcije klonalne populacije plazma ćelija, potvrđuje se AL⁸. Sledeći korak je diferencijalno – dijagnostički razdvojiti primarnu amiloidozu od drugih klonalnih plazma diskrazija, najčešće multiplog

mijeloma (MM). Dijagnoza MM se postavlja na osnovu jasno definisanih glavnih i sporednih kriterijuma, te ukoliko vrednosti stepena infiltracije koštane srži plazmocitima, visina M-komponente seruma i urina, odnosno imunoglobulina u serumu, kao i prisutnost osteolitičkih lezija ne zadovoljava kriterijume za MM, dijagnoza MM se definitivno odbacuje i potvrđuje dijagnoza primarne amiloidoze^{9,10}.

Smatra se da je dijagnoza primarne amiloidoze znatno češća i da se u mnogim slučajevima pogrešno dijagnostikuje kao MM. Ovde ćemo prikazati ilustrativan slučaj bolesnice kod koje je najpre postavljena dijagnoza MM, ali je ponovnim razmatranjem i dodatnim dijagnostičkim procedurama utvrđena primarna amiloidoza.

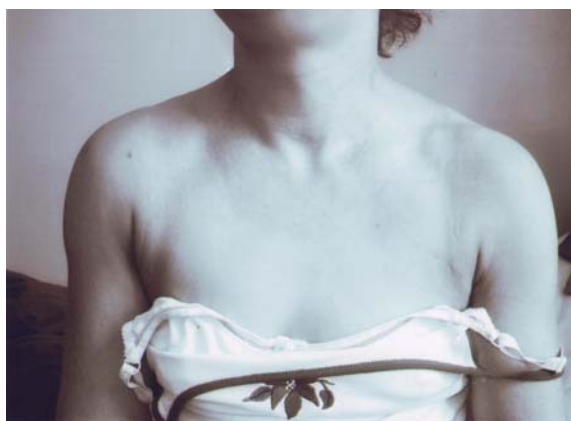
Prikaz bolesnika

Bolesnica stara 51 godinu primljena je u Institut za hematologiju Kliničkog centra Srbije (KCS) pod dijagnozom multiplog mijeloma radi odluke o modalitetu lečenja. Prve tegobe bolesnice u vidu otoka lica, trbuha i nogu datiraju od 2001. godine, pet godina pre sadašnjeg prijema. Tadašnjim nefrološkim, kardiološkim i endokrinološkim ispitivanjem nisu razjašnjene tegobe bolesnice. Od 2004. godine tegobe bolesnice progrediraju u vidu pojačanog zamora i malaksalosti, opadanja kose, pojave krtosti noktiju, promuklosti, a potom i bolova u kostima. Zbog opstipacija, februara 2006. godine ispitivana je gastroenterološki, kada je učinjena biopsija rektuma i PH analizom i bojenjem na Kongo crveno dokazana je amiloidoza rektuma. Dalje ispitivanje nastavljeno je kod hematologa. U EF i IEF proteina seruma videna je M-komponenta, a u biopsiji koštane srži PH i IHH analizom nađena je infiltracija koštane srži sa 20–30% klonalnih plazmocita, izrazito CD38+ i CD138+; međutim, depoziti amiloida nisu detektovani. Pošto u ostalim biohemijskim analizama krvi nije bilo odstupanja od fizioloških vrednosti, a na radiografiji skeleta (kraniogram, cela kičma, grudni koš, karlica, oba femura i oba humerusa) nisu videne osteolitične promene, bolesnica je shvaćena kao „smoldering“ MM.

Marta 2006. godine primljena je u Institut za hematologiju, KCS, zbog lečenja. Pri prijemu u objektivnom nalazu uočavaju se periorbitalni edemi, alopecija i distrofija noktiju (slika 1), makroglosija, submandibularni infiltrat, „rameno jastučće“ (slika 2), masivni potkožni plakovi u predelu trbuha, bedara i donjih ekstremiteta (slika 3). U ponovljenim nala-



Sl. 1 – Distrofija noktiju



Sl. 2 – Rameno jastuče



Sl. 3 – Masivni potkožni plakovi donjih ekstremiteta

zima krvne slike i kompletne biohemije krvi vrednosti nisu odstupale od normalnih, hemoglobin je iznosio 132 g/L, sedimentacija (SE) je iznosila 18 mm/h, ukupni proteini bili su 61 g/L, uočavala se samo blaga hipoalbuminemija od 37 g/L. U EF proteina seruma uočena je minimalna M komponenta čija

je klonalnost dokazana IEF, odnosno detektovana je IgA lambda M-komponenta čija je serumska koncentracija iznosila 4,8 g/L, sa β frakcijom od 14,5% i γ frakcijom 7,3%. Elektroforezom i imuno elektroforezom urina detektovani su slobodni lambda laki lanci sa β frakcijom 56,1% i γ frakcijom 13,0%, a 24 h proteinurija bila je u fiziološkim granicama – 0,05 g/24 h. Apsolutne vrednosti IgG u serumu iznosile su 5,2 g/L, a IgM 0,35 g/L. Po prijemu u našu ustanovu ponovljena je i radiografija skeleta kojom ni ovog puta nisu uočene osteolitičke promene. Pošto kriterijuma za dijagnozu MM nije bilo, a postojala je velika verovatnoća da se radi o primarnoj amiloidozi, sprovedena su dodatna ispitivanja: radiografija pluća i ehosonografija (EHO) abdomena koji su bili uredni, ali je EHO srca pokazao nalaz karakterističan za infiltrativnu kardiomiopatiju (CMP) u sklopu amiloidoze: leva komora debljine 18 mm izmenjene strukture miokarda u smislu pojačane ehogenosti i opalescencije miokarda, septum debljne 20 mm, na trikuspidalnom ušću manja regurgitacija, sistolni pritisak u desnoj komori povećan 35–40mm. Takođe, urađena je iglena biopsija potkožnog tkiva u predelu abdomena a PH nalaz je pozitivan na bojenje Kongo crvenim morfološki i histoheмиjski odgovarao je depositima amiloida u potkožnom tkivu.

Na osnovu svih sprovedenih dijagnostičkih procedura, postavljena je dijagnoza primarne amiloidoze sa zahvaćenošću srca, creva, mišića i potkožnog tkiva. Zbog ehokardiografskog nalaza (debljina zida septuma 18 mm) odustalo se od lečenja autologom transplantacijom matičnih ćelija hematopoeze (MČH) i započeto je lečenje primenom protokola IDMD (intermedijarne doze melfalana, 25 mg/m² D1 + deksametazon, 20 mg D1-D4, u intervalima na 28 dana). Već nakon primenjena dva ciklusa terapije, EF i IEF proteina seruma i urina nije se detektovala M-komponenta, a potkožni infiltrati bili su u znatnoj regresiji. Međutim, nakon četiri meseca i četiri ciklusa terapije, na ponovljenom EHO snimku abdomena uočavaju se infiltrati (amiloid) na zidu želudca i mokraćne bešike (koji na inicijalnom EHO snimku nisu uočeni), a nakon šest meseci (šest ciklusa terapije), zbog konstriktivne CMP, došlo je do bilateralne efuzije pleure koje su zahtevale evakuaciju pleuralnom punkcijom. S obzirom da su potkožni infiltrati bili znatno manji, kao i da na kontrolnom EHO snimku srca nije bilo bitnijih promena, nastavljeno je lečenje primenom navedene terapije do ukupno VIII ciklusa uz diuretsku terapiju. Nakon VIII ciklusa terapije novim EHO pregledom abdomena nisu uočeni infiltrati na zidu želudca i mokraćne bešike, EHO srca je bio i dalje bez značajne dinamike u debljini zida leve komore i septuma, obotrani pleuralni izlivi, diskretno manji, perzistirali su (pošto nisu kompromitovali disajnu funkciju, nisu zahtevali evakuaciju), kao i potkožni depoziti amiloida nešto manjeg obima nego inicijalno. Zbog toga je odlučeno da se lečenje nastavi manje intenzivnom „održavajućom“ terapijom (melfalan, 20 mg *per os*, i deksametazon, 20 mg *iv* D1-D4, na 28 dana), kojom je postignuta stabilizacija bolesti (potkožni infiltrati i pleuralni izlivi perzistirali su sve vreme). Bolesnica je sada na MP protokolu (melfalan, 20 mg, i prednizon, 60 mg D1-D4, na 28 dana). Od dijagnostike AL do sada prošlo je 35 meseci, a kod bolesnice uz primenjeno lečenje nema znakova progresije bolesti.

Diskusija

Amiloidoza se može javiti kao primarni fenomen, odnosno primarna amiloidoza, ili udružena sa ostalim plazma ćelijskim poremećajima, kao što su MGUS („monoclonal gammopathy of undetermined significance“) ili MM. Amiloidoza u okviru dijagnoze MM prisutna je kod 10–15% bolesnika sa MM. Kod primarne amiloidoze, svega 18% bolesnika ima infiltraciju koštane srži klonalnim plazmocitima $\geq 20\%$,

preživljavanja na svega 18 meseci¹⁴. Međutim, primenom HT protokola sa IDMD, stopa postizanja kopletne i parcijalne remisije (CR i PR) iznosi 54%, a medijana preživljanja 40 meseci, s tim da smrtnost usled terapije (TRM) iznosi 12%^{15, 16}. Visokodozna terapija melflanom (200 mg/m²) sa potporom autologih matičnih ćelija hematopoeze (MČH) kao prva linija terapije preporučuje se samo bolesnicima koji zadovoljavaju kriterijume preporučne od strane UKATT (UK *Amyloidosis Treatment Trial*) (tabela 2), koje ispunjava oko 50% bolesnika

Tabela 2

Kriterijumi podobnosti za autologu transplantaciju MČH – UKATT¹⁴

ECOG status 0-1
NYHA klasa srčane insuficijencije I ili II
Zahvaćenost amiloidozom ne više od 2 organa
Starost ≤ 65 godina
Klirens kreatinina ≥ 50 mL/min
Bilirubin ≤ 1.5 puta i alkalna fosfataza ≤ 2 puta iznad gornje granice normale
Debljina interventrikularnog septuma i zida leve komore ≤ 15 mm na ehosonografiji
Odsustvo klinički značajne autonomne neuropatije
Odsustvo klinički značajne gastrointestinalne hemoragije

ECOG: Eastern Cooperative Oncology Group; NYHA: New York Heart Association; MČH – matične ćelije hematopoeze; UKATT – UK *Amyloidosis Treatment Trial*

dok većina (60%) ima infiltraciju manju od 10%¹¹. Kod naše bolesnice infiltracija koštane srži plazmocitima bila je 20–30% zbog čega je posumnjano na MM. Elektroforezom i imunoelektroforezom proteina seruma i urina detektuje se M-komponenta kod oko 90% bolesnika sa primarnom amiloidozom, od toga se kod 70% bolesnika detektuju lambda laki lanci, dok se kod bolesnika sa MM detektuju kod oko 20% slučajeva¹¹. Nivo M-komponente u serumu i urinu je dijagnostički kriterijum za MM. Kod naše bolesnice u EF i IEF proteina seruma uočena je minimalna količina M-komponente IgA lambda tipa (4,8 g/L) što je govorilo u prilog klonalnog plazma ćelijskog poremećaja, ali ne i MM. EF i IEF proteina urina kod bolesnice detektovani su slobodni lambda laki lanci koji se znatno češće vidaju kod primarne amiloidoze, sa 24-časovnom proteinurijom u fiziološkim granicama, koja je takođe jedan od dijagnostičkih kriterijuma za MM, od svega 0,05 g/24 h. Jedna od glavnih karakteristika MM jesu osteolitične lezije koje su prisutne kod oko 75% bolesnika, dok ne predstavljaju karakteristiku primarne amiloidoze¹². Takođe, oko 80% bolesnika sa MM već na prezentaciji bolesti ima anemiju koja nije odlika primarne amiloidoze, što je potvrđeno i kod naše bolesnice koja je imala normalne vrednosti Hb^{9, 13}. Ubrzanu sedimentaciju eritrocita imaju skoro svi bolesnici sa MM, i to vrlo često preko 100 mm/h, dok je kod naše bolesnice isnosila 18 mm/h^{9, 13}. Kod naše bolesnice, uz navedene laboratorijske karakteristike, dokazali smo dijagnostičkim procedurama amiloidozu srca, digestivnog sistema, masivnu infiltraciju amiloidom mišića i potkožnog tkiva, uključujući bojenje biopata potkožnog tkiva na Kongo crveno, na osnovu čega je uz navedene laboratorijske i kliničke karakteristike postavljena definitivna dijagnoza primarne amiloidoze.

Medijana preživljavanja bolesnika sa primarnom amiloidozom bez lečenja iznosi 13 meseci¹⁴. Lečenje standardnim hemioterapijskim protokolom (HT) MP produžava medijanu

sa primarnom amiloidozom, sa kojom se kompletna remisija postiže u oko 40% lečenih uz medijanu preživljanja od 4,9 godina¹⁴. Uloga autologe transplantacije MČH u relapsu bolesti još uvek nije dovoljno proučena. Nedavno su publikovani ohrabrujući podaci od Wechalekar i sar.¹⁴ prema kojima je primenjen HT CTD (ciklofosamid, 500 mg *per os*, 1 \times nedeljno + talidomid, 200 mg dnevno, kontinuirano, deksametazon 40 mg D1-D4 i D9-D12, na 21 dan), postignut odgovor nivoa kompletne / parcijalne remisije kod 74% lečenih sa medijanom preživljanja od 41 mesec¹⁷.

Kod naše bolesnice odlučili smo se za terapiju IDMD, s obzirom da nije zadovoljavala kriterijume UKATT za terapiju autologom transplantacijom MČH. Sprovedeno je VIII ciklusa navedene terapije, a potom, zbog održavanja depozita amiloida potkožno, kao i u miokardu, prevedena je na terapiju „održavanja“ naredne dve godine (niskodoznim melfalanom uz deksametazon). Remisija bolesti nije postignuta, ali nije bilo ni progresije, odnosno dosadašnji odgovor na terapiju odgovara stabilnoj bolesti. Ova terapija je bez značajnije toksičnosti, a preživljavanje, za sada, iznosi 35 meseci.

Zaključak

Primarna amiloidoza je oboljenje na koje treba misliti prilikom susreta sa bolesnikom koji ima nespecifične opšte tegobe, disfunkciju organa kao što su bubrege, srce, digestivni ili nervni sistem, kao i specifični spoljni izgled (periorbitalni edem, makroglosija, alopecija, distrofija noktiju, otok ramenog pojasa), zbog infiltracije potkožnog i mišićnog tkiva. Kod sumnje na amiloidozu treba uraditi EF i IEF proteina seruma i urina, biopsiju koštane srži, potkožnog tkiva ili zahvaćenog organa. Ranom dijagnostikom ove bolesti izbegla bi se multiorganska oštećenja i omogućila primena agresivnije terapije i samim tim uticalo na bolje preživljavanje obolelih.

L I T E R A T U R A

1. Foerster J. Amyloidosis. In: Lee GR, Bitbell TC, Foerster J, Athens JW, Lukens JN, editors. *Wintrobe's Clinical Hematology*. 10th ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 1999. p 2705–24.
 2. Pepys MB. Amyloidosis. *Annu Rev Med* 2006; 57: 223–41.
 3. Pepys MB, Herbert J, Hutchinson WL, Tennet GA, Lachmann HJ, Gallimore JR, et al. Targeted pharmacological depletion of serum amyloid P component for treatment of human amyloidosis. *Nature* 2002; 417(6886): 254–9.
 4. Nelson SR, Lyon M, Gallagher JT, Johnson EA, Pepyes MB. Isolation and characterization of the integral glycosamino- glycan constituents of human amyloid A and monoclonal light- chain amyloid fibrils. *Biochem J* 1991; 275(Pt 1): 67–73.
 5. Gertz MA, Lacy QM, Dispenzieri A. Immunoglobulin light chain amyloidosis (Primary amyloidosis, AL). In: Gertz AM, Greipp RP, editors. *Multiple myeloma and related plasma cell disorders*. Berlin, Heidelberg, New York: Springer-Verlag; 2004. p. 157–95.
 6. Grogan TM, Van Camp B, Kyle RA, Muller-Hermelink HK, Harris NL. Plasma cell neoplasms. In: Jaffe ES, Harris NL, Stein H, Vardiman JW, editors. *Pathology and genetics of tumours of haematopoietic and lymphoid tissues*. Lyon: IARC Press; 2001. p. 142–56.
 7. Gertz MA, Lacy QM, Dispenzieri A. Amyloidosis: recognition, confirmation, prognosis and therapy. *Mayo Clin Proc* 1999; 74(5): 490–4.
 8. Falk RH, Comenzo R, Skinner M. The Systemic amyloidosis. *N Eng J Med* 1997; 337(13): 898–909.
 9. Longo DL. Plasma cell disorders. In: Fauci AS, Braunwald E, Isselbacher KJ, editors. *Harrison's Principles of Internal Medicine*. 14th ed. New York: McGraw-Hill; 1998. p. 1417–21.
 10. *International Myeloma Working Group*. Criteria for the classification of monoclonal gammopathies, multiple myeloma and related disorders: a report of the International Myeloma Working Group. *Br J Haematol* 2003; 121(5): 749–57.
 11. Muller A, Geibel A, Neumann H, Kubnemund A, Schmitt-Graff A, Bohm J, et al. Primary (AL) amyloidosis in plasma cell disorders. *Oncologist* 2006; 11(7): 824–30.
 12. Dimopoulos MA, Moulopoulos LA, Datsiris I, Weber D, Delasalle K, Goka D, et al. Imaging of myeloma bone disease-implications for staging, prognosis and follow-up. *Acta Oncol* 2000; 39(7): 823–7.
 13. Tricot G. Multiple myeloma and other plasma cell disorders. In: Hoffman R, Benz E, Shattil S, Furie B, Cohen H, editors. *Hematology, basic principles and practice*. 4th ed. Edinburgh: Churchill-Livingstone; 2004. p. 1398–410.
 14. Wechalekar AD, Hawkins PN, Gillmore JD. Perspectives in treatment of AL amyloidosis. *Br J Haematol* 2008; 140: 365–77.
 15. *United Kingdom Myeloma Forum*. Guidelines on the diagnosis and management of AL amyloidosis. *Br J Haematol* 2004; 125: 681–700.
 16. Goodman HJB, Lachmann HJ, Bradwell AR, Hawkins PN. Intermediate dose intravenous melphalan and dexamethasone treatment in 144 patients with systemic AL amyloidosis. *ASH Annual Meeting Abstracts* 2004; 104: 755.
 17. Wechalekar AD, Goodman HJB, Lachmann HJ, Offer M, Hawkins PN, Gillmore JD. Safety and efficacy of risk-adapted cyclophosphamide, talidomide, and dexamethasone in systemic AL amyloidosis. *Blood* 2007; 109(2): 457–64.
- Primljen 24. III 2009.
Revidiran 17. VII 2009.
Prihvaćen 28. VII 2009.



Jedna zlehuda lekarska sudbina: sanitetski kapetan 2. klase dr Periša Šljivić (1851–1877)

A bad luck of a physician: II class Army Medical Corps Captain Periša Šljivić (1851–1877)

Prelistavajući svoju dokumentaciju, naiđoh na jednu koja me podseti na zlehude sudbine siromašnih srpskih mladića koji su, inteligentni, a bez materijalnih sredstava, ipak pokušavali da ostvare svoj životni ideal i, vrlo često, mučeći se i gladujući, to ostvarivali ili ne, ali najčešće plaćali svojim zdravljem i životom. Među njima bilo je i medicinara, počev od najpoznatijega među njima, pesnika Branka Radičevića. Evo jedne takve sudbine.

Na traganje za ovom ličnošću krenuo sam tokom pisanja biografija lekara učesnika srpsko-turskih ratova 1876–1878, kada sam u „Istoriji srpskog vojnog saniteta“, knjiga II, sv. 1 dr Vladana Đorđevića naišao na ovo ime, koje se kasnije ni u jednom državnom Šematizmu niti u bilo kome drugome zvaničnom dokumentu nije pojavljivalo¹.

Arhiv Srbije, iako posebno u sanitetskom domenu pružalim ratovima i nebrigom dobrim delom devastiran, pruža solidnu osnovu za istraživanje srpske medicinske prošlosti. Srećom, pretražujući registre i delovodne protokole Sanitetskog odeljenja Ministarstva unutrašnjih dela, naišao sam na fasciklu u kojoj se nalazila dokumentacija o ovome tragičnome mladome studentu^{2,3}. Evo te priče:

Periša Šljivić rođen je u užičkom kraju u siromašnoj zemljoradničkoj porodici. Posle završene osnovne škole i niže gimnazije u Užicu, više razrede onda šestogodišnje gimnazije završio je u Kragujevcu, a potom u Beogradu, u Velikoj školi, prvu godinu tehnike. Za vreme studija upoznao je i oženio se sa učiteljicom Katarinom, ćerkom beogradskog đumrukadžije (carinika) Sretena Blagojevića.

Željan znanja, a budući odličan student, postao je „pito-mac“ užičkog vladika Janićija, onda poznatog istoričara i dobrotvora, i krenuo 1870. god. u Cirihi na studije medicine, u pratnji supruge koja je izabrala filozofiju. Nažalost, usred studija, marta 1873. umire vladika i Periša ostaje bez novca, gladujući po nekoliko dana, uz malu novčanu pomoć prijatelja i tasta. Maja iste godine on se pismom obratio ministru prosvete Stojanu Novakoviću sa molbom „da mu se odredi državno

blagodejanje da ne bi započete nauke morao prekidati, počem se više nema(m) otkud izdržavati“. Odbijen od ministra unutrašnjih dela kome je njegova molba prosledena, on se, u očajanju, obraća Knezu (Milanu), moleći ga „...najučtivije i najpokornije... za potporu...kao učenik jedan siromašnog stanja“. Ni od ovoga ne bi ništa sve dok narodni poslanici i arhimandrit iz užičkog kraja nisu zatražili od ministra „da mu se dodeli stipendija zbog siromašnog stanja“.

I Periša 1. aprila 1875, posle 2 godine gladovanja, dobi stipendiju pošto je prethodno potpisao pod sledećim uslovima: „...da ću na vreme ispite polagati, da ću za 2 godine medicinske nauke svršiti i državni ispit za to vreme u Bernu položiti, da ću...u praviteljstvenoj službi onoliko godina koliko sam na strani sa praviteljstvenim troškom proveo služiti, da neću lakomislen, neuredan ili nevaljao biti, da neću raskošno živeti, u dugove uvaljivati i drugome se čemu osim medicinskim naukama odavati...“

Periša je studije na vreme završio i obavezni švajcarski završni državni ispit položio u leto 1876, upravo kada je započinjao I srpsko-turski rat. Proizveden u čin sanitetskog kapetana 2 klase, poslat je u Vrhovnu komandu srpske vojske u Aleksinac, upravo u vreme kada su započinjali veliki bojevi u kojima je i on učestvovao: Krevet (16–20. septembar), Veliki Šiljegovac (7–11. oktobar) i Đunis (17–20. oktobar). Posle ovoga krvavog, a neuspešnog rata, Perišino se ime gubi iz svih državnih izvora: plaćajući danak svome mukotrpnom životu i ratnim naporima u koje je uleteo pravo iz studentske klupe, umro je od tuberkuloze 14. marta 1877. godine.

Neka ovaj šturi i tužan zapis posle 143 godine otrgne od zaborava ime ovoga mladoga vojnog lekara, koji je životom platio svoju ljubav prema medicini i svoju odanost otadžbini.

Aleksandar S. Nedok
Akademija medicinskih nauka
Srpskog lekarskog društva
Džordža Vašingtona 19
11000 Beograd, Srbija

L I T E R A T U R A

1. *Vladan Đorđević*. History of the Serbian Military Medical Corps, knj. II, sv.1, Beograd: 1893; p. 277–8, 282. (Serbian)
2. *Ministarstvo unutrašnjih dela*. Sanitetsko odeljenje, brojevi: 870/73, 1710/73, 139/74, 1704/74, 232/75, 280/75, 467/75, 866/75, 2246/75, 166/76, 207/76, 1027/76, 1260/76, Arhiv Srbije, Beograd, F.III, R 141/1876.
3. *Ljubinka Trgovčević*. Planned elite. Službeni Glasnik; 2003. p. 274. (Serbian)



**Prof. dr
DUŠAN JOVANOVIĆ
pukovnik u penziji
(1953–2010)**

Dana 15. avgusta 2010. godine, posle kratke i teške bolesti, umro je u Beogradu pukovnik u penziji, dr sc med. Dušan Jovanović, redovni profesor Vojnomedicinske akademije (VMA), jedan od vodećih srpskih farmakologa i toksikologa srednje generacije.



Pukovnik prof. dr Dušan Jovanović rođen je 24. septembra 1953. godine u Beogradu, gde je živio, školovao se i 1978. diplomirao sa odličnom ocenom na Medicinskom fakultetu. Odmah po završetku studija, sledeći put svog oca Jovana, postao je poručnik i lekar Komande ratnog vazduhoplovstva u Zemunu. Dalji profesionalni put vodio ga je u Medicinsko odeljenje Vojnotehničkog instituta (VTI), odakle početkom 1998. godine prelazi u VMA, u novoformirani Centar za kontrolu trovanja.

U VMA i na Medicinskom fakultetu u Beogradu završio je kompletno naučno i stručno usavršavanje. Od početka školovanja izdvajao se kao najbolji u klasi. Godine 1983. odbranio je magistarski rad, 1989. završio je specijalizaciju iz kliničke farmakologije, a već sledeće godine, odbranom doktorske disertacije, postao je jedan od najmlađih doktora nauka u VMA iz oblasti toksikologije.

Kao toksikolog i klinički farmakolog bio je jedan od vodećih istraživača u zemlji u ovim oblastima. O tome govore njegovi brojni naučnoistraživački radovi, objavljeni u naj-

poznatijim domaćim i međunarodnim naučnim časopisima iz oblasti toksikologije, kliničke farmakologije ili kliničke farmakokinetike, koje su više od 250 puta citirali drugi autori. Profesor Jovanović je kao jedini, prvi autor ili koautor učestvovao u radu brojnih stručnih i naučnih skupova u zemlji i inostranstvu, a, između ostalog, bio je prvi autor ili koautor 22 poglavlja u domaćim knjigama ili stručnim priručnicima. Posebno treba istaći činjenicu da je profesor Jovanović jedan od retkih stručnjaka iz Srbije čiji se radovi pominju i u čuvenoj Martindejlovoj ekstra-farmakopeji.

U mnogobrojnim naučnim i stručnim telima vojnih i civilnih zdravstvenih, akademskih i regulatornih institucija u bivšoj SFRJ i Srbiji radio je godinama kao vrhunski ekspert čije su znanje i iskustvo bili nezamenljivi. Od 1996–1998. godine bio je član Komisije za lekove Saveznog ministarstva za rad, zdravlje i socijalnu politiku, od 2000. do 2002. godine član Komisije za pomoćna lekovita sredstva Saveznog sekretarijata za rad, zdravlje i socijalno staranje, od 2004. godine član Etičkog komiteta Instituta za majku i dete „Dr Vukan Čupić“ u Beogradu, od 2005. godine spoljni ekspert Agencije za lekove i medicinska sredstva Srbije (segment farmakologija i toksikologija), a prošle godine imenovan je i za eksperta Agencije za lijekove i medicinska sredstva Crne Gore.

U stručnim telima VMA obavljao je veći broj najodgovornijih funkcija. Između ostalog, bio je dugogodišnji predsednik Komisije za lekove VMA (2003–februar, 2010), šef Katedre za kliničku, analitičku i eksperimentalnu toksikologiju i farmakologiju (1999–2003) i zamenik predsednika Nastavnonaučnog veća VMA (februar, 2005–decembar, 2006).

Kao čovek velike stvaralačke energije ostavio je snažan pečat i u radu udruženja toksikologa i farmakologa Srbije. Bio je osnivač i dugogodišnji član uredništva časopisa *Archives of Toxicology, Pharmacokinetics and Xenobiotic Metabolism*, prvog časopisa takvog profila na našim prostorima koji je za kratko vreme izlaženja ostvario značajnu međunarodnu reputaciju.

Od samih početaka svog naučnoistraživačkog rada u Medicinskom odeljenju VTI, gde je zapamćen kao veliki entuzijasta, predani radnik, istrajni istraživač i naučnik, do

Centra za kontrolu trovanja VMA, gde je mnogo godina radio kao načelnik, prof. Jovanović je imao blistavu karijeru vrhunskog stručnjaka i nastavnika. Pod njegovim mentorstvom ili komentorstvom odbranjene su mnoge magistarske i doktorske teze u VMA i na Medicinskom fakultetu u Beogradu, a profesor Jovanović bio je omiljeni predavač brojnim generacijama polaznika Škole rezervnih oficira Sanitetske službe, kao i polaznicima poslediplomskih studija u VMA.

U svim sredinama u kojima je radio bio je lider u svom poslu koji je tačno znao kako se zadatak inicira i dovodi do potpune realizacije. Pri tome je za sve nas istovremeno bio i autoritet, ali i neko kome se obraćamo kada imamo problem. Čak i onda kada se mnogima od nas činilo da nema rešenja, nepogrešivo je nalazio pravi put.

Teško je izdvojiti najvažnije osobine koje su krasile blistav lik profesora Jovanovića. Na prvom mestu trebalo bi reći da se radi o čoveku briljantne inteligencije, savršene ekspeditivnosti i elokventnosti, pedantnosti i organizovanosti koje su svi prepoznavali i poštovali. Kao rukovodioca karakterisala ga je stalna briga o zaposlenima, želja da svi budu adekvatno nagrađeni i da iz sebe izvuku najbolje.

Pre godinu dana zajedno smo proslavili 45 godina od osnivanja Klinike za toksikologiju i tada istakli najvažnije stručnjake za formiranje i razvoj Centra za kontrolu trovanja. Sada bismo ponovo mogli reći da je prof. Jovanović jedan od najzaslužnijih za njegovo formiranje jer je Centar, upravo zahvaljujući njegovoj viziji, upornosti, istrajnosti, pronicljivosti i zalaganju ove godine konačno i dobio status koji mu pripada, a to je institucija od nacionalnog značaja. Želeli smo da to zajedno proslavimo, ali sada nam ostaje da svim snagama nastavimo dalje, putem koji je on trasirao i u čije je temelje ugradio godine samopregornog rada.

Sa velikom tugom opraštamo se od našeg profesora, kolege i prijatelja i, nadasve, divnog čoveka. Njegov lik i delo uvek će nam biti putokaz kako treba da se odnosimo prema radu, prema struci, nauci, bolesnom čoveku, saradnicima i kolegama.

Neka je večna slava i hvala pukovniku prof. dr Dušanu Jovanoviću!

prof. dr Slavica Vučinić
Načelnik Klinike za ugentnu i kliničku toksikologiju, VMA



ERRATUM

Sunčanje ili zdravlje – izaberite sami

Lidija Kandolf Sekulović

Vojnosanit Pregl 2010; 67(8): 613–5.

Jedno od objašnjenja može se naći u dokazanom dejstvu **UV zračenja**, i to vidljivog i infracrvenog dela spektra na popravljavanje raspoloženja, i njegovog korišćenja u lečenju depresije i sezonskog afektivnog poremećaja u severnim regijama sa malom insolacijom. Ovi efekti, povezuju se sa uticajem **UV zračenja** na produkciju melatonina, serotonina i kateholamina, mada se tačan mehanizam dejstva još uvek ne zna ⁵.

Erratum in: Vojnosanit Pregl 2010; 67(9): 789.

Jedno od objašnjenja može se naći u dokazanom dejstvu **sunčevog zračenja**, i to vidljivog i infracrvenog dela spektra na popravljavanje raspoloženja, i njegovog korišćenja u lečenju depresije i sezonskog afektivnog poremećaja u severnim regijama sa malom insolacijom. Ovi efekti, povezuju se sa uticajem **sunčevog zračenja** na produkciju melatonina, serotonina i kateholamina, mada se tačan mehanizam dejstva još uvek ne zna ⁵.



ВОЈНОСАНИТЕТСКИ ПРЕГЛЕД
ВОЈНОМЕДИЦИНСКА АКАДЕМИЈА
Црнотравска 17, 11040 Београд, Србија
Тел/факс: +381 11 2669689
vmains2@hotmail.com
vmains2@eunet.yu

Пристап чланцима публикованим у часопису Војносанитетски преглед у *pdf* формату

По узору на велике издавачке куће у свету које публикују и часописе из области биомедицине као и раширену праксу *on line* доступности медицинске периодике и чланака преко *Interneta* у *pdf* формату (програм *Adobe Reader*) и Војносанитетски преглед, пратећи савремене трендове издаваштва и доступности у електронској форми, нуди свим заинтересованима чланке у *pdf* формату публиковане од 2002. године до данас. Од 2002. године часопис је доступан преко *EBSCO* базе података у *pdf* формату, али је мали број установа у Србији претплаћен на ову медицинску научноинформацијску базу.

Сви заинтересовани могу преузети жељени чланак у *pdf* формату, из часописа који је доступан преко сајта ВМА: <http://www.vma.mod.gov.rs/vsp>

UPUTSTVO AUTORIMA

Vojnosanitetski pregled (VSP) objavljuje radove koji ranije nisu nigde publikovani, niti predati za publikovanje redosledom koji određuje uređivački odbor. Uz rad, na posebnom listu, treba dostaviti: izjavu da rad do sada nije (ili je delimično) objavljen ili prihvaćen za štampu u drugom časopisu; potpise svih koautora; ime, tačnu adresu, brojeve telefona (fiksne, mobilne, faks), *e-mail* adresu, kao i kopiju dokaza o pretplati na časopis za sve autore (i koautore). Za objavljene radove VSP zadržava autorsko pravo.

Radove slati na adresu: Vojnosanitetski pregled Vojnomedicinska akademija, Institut za naučne informacije, Cmotravska 17, 11040 Beograd.

U VSP-u se objavljuju **uvodnici, originalni članci, prethodna ili kratka saopštenja**, revijski radovi tipa **opšteg pregleda, aktuelne teme ili metaanalize, kazuistika**, članci iz **istorije medicine**, lični stavovi, naručeni komentari, pisma uredništvu, izveštaji sa naučnih i stručnih skupova, prikazi knjiga, referati iz naučne i stručne literature i drugi prilozi.

Radove tipa opšteg pregleda Uredništvo će prihvatiti samo ukoliko autori navođenjem najmanje 5 autocitata potvrde da su eksperti u oblasti o kojoj pišu.

Radovi se objavljuju na srpskom ili engleskom jeziku sa apstraktima na srpskom i engleskom, za radove tipa originalnih članaka, prethodnih ili kratkih saopštenja, metaanalize i kazuistike. Odabrani članci objavljuju se u celini na engleskom jeziku sa apstraktom na srpskom.

Rukopis se piše pomoću IBM-PC kompatibilnog računara, sa proredom 1,5. Štampa se na laserskom ili nekom drugom visokokvalitetnom štampaču, uredno i bez ispravki, na čistoj beloj hartiji formata A4, sa levom marginom od 4 cm. Koristiti font veličine 12, a načelno izbegavati upotrebu **bold** i *italic* slova, koja su rezervisana za podnaslove. Originalni članci, opšti pregledi i metaanalize ne smeju prelaziti 16 stranica (sa prilogima); aktuelne teme – osam, kazuistika – šest, prethodna saopštenja – pet, a pisma uredniku, izveštaji sa skupova i prikazi knjiga – dve stranice.

U celom radu obavezno je korišćenje međunarodnog sistema mera (SI) i standardnih međunarodno prihvaćenih termina.

Radove (tekst i grafičke priloge) treba slati na disketi (CD) i štampane u tri primerka (original i dve kopije). Autori konačnu verziju rukopisa i priloga prihvaćenih za publikovanje predaju u jednom štampanom primerku i na disketi od 3,5" (očišćenju od „virusa“) ili na kompaktnom disku. Za obradu teksta koristiti program **Word for Windows** verzije 97, 2000, XP ili 2003, a samo izuzetno i neki drugi. Za izradu grafičkih priloga koristiti standardne grafičke programe za **Windows**, poželjno iz programskog paketa **Microsoft Office (Excel, Word Graph)**. Kod kompjuterske izrade grafika izbegavati upotrebu boja i senčenja pozadine.

Prispeli radovi kao anonimni podležu uređivačkoj obradi i recenziji najmanje dva urednika/recenzenata. Primedbe i sugestije urednika/recenzenata dostavljaju se autoru radi konačnog oblikovanja. Otisak članka šalje se prvom autoru na korekturu, koji treba vratiti u roku od pet dana. Rukopisi radova prihvaćenih za štampu ne vraćaju se autoru.

Priprema rada

Delovi rada su: **naslovna strana, apstrakt sa ključnim rečima, tekst i literatura.**

1. Naslovna strana

a) Naslov treba da bude kratak, jasan i informativan i da odgovara sadržaju rada. Podnaslove treba izbegavati.

b) Ispisuju se puna imena i prezimena autora.

c) Navode se puni nazivi ustanove i organizacijske jedinice u kojima je rad obavljen i mesta u kojima se ustanove nalaze, sa jasnim obeležavanjem odakle je autor, koristeći standardne znake za fus-note.

2. Apstrakt i ključne reči

Na drugoj stranici nalazi se strukturisani apstrakt sa naslovom rada. Kratkim rečenicama na srpskom i engleskom jeziku iznosi se **uvod i cilj** rada, osnovne procedure - **metode** (izbor ispitanika ili laboratorijskih životinja; metode posmatranja i analize), glavni nalazi - **rezultati** (konkretni podaci i njihova statistička značajnost) i glavni **zaključak**. Naglasiti nove i značajne aspekte studije ili zapažanja. Strukturisani apstrakt (**250** reči) ima podnaslove: *uvod/cilj, metode, rezultati i zaključak*. Za apstrakte na engleskom dozvoljeno je i do **450** reči. Strukturisani apstrakt je obavezan za metaanalize (istog obima kao i za originalne članke) i kazuistiku (do 150 reči, sa podnaslovima *uvod, prikaz slučaja i zaključak*). Ispod apstrakta, pod podnaslovom „Ključne reči“ predložiti 3–10 ključnih reči ili kratkih izraza koji oslikavaju sadržinu članka.

3. Tekst članka

Tekst sadrži sledeća poglavlja: **uvod, metode, rezultate i diskusiju. Zaključak** može da bude posebno poglavlje ili se iznosi u poslednjem

pasusu diskusije. U **uvodu** ponovo napisati naslov rada, bez navođenja autora. Navesti hipotezu (ukoliko je ima) i ciljeve rada. Ukratko izneti razloge za studiju ili posmatranje. Navesti samo strogo relevantne podatke iz literature i ne iznositi opširna razmatranja o predmetu rada, kao ni podatke ili zaključke iz rada o kome se izveštava.

Metode. Jasno opisati izbor metoda posmatranja ili eksperimentalnih metoda (ispitanici ili eksperimentalne životinje, uključujući kontrolne). Identifikovati metode, aparaturu (ime i adresa proizvođača u zagradi) i proceduru, dovoljno detaljno da se drugim autorima omogući reprodukcija rezultata. Navesti podatke iz literature za uhodane metode, uključujući i statističke. Tačno identifikovati sve primenjene lekove i hemikalije, uključujući generičko ime, doze i načine davanja. Za ispitivanja na ljudima i životinjama navesti saglasnost etičkog komiteta.

Rezultate prikazati logičkim redosledom u tekstu, tabelama i ilustracijama. U tekstu naglasiti ili sumirati samo značajna zapažanja.

U **diskusiji** naglasiti nove i značajne aspekte studije i izvedene zaključke. Posmatranja dovesti u vezu sa drugim relevantnim studijama, u načelu iz poslednje tri godine, a samo izuzetno i starijim. Povezati zaključke sa ciljevima rada, ali izbegavati nesumnjive tvrdnje i one zaključke koje podaci iz rada ne podržavaju u potpunosti.

Literatura

Literatura se u radu citira kao superskript, a popisuje rednim brojevima pod kojima se citat pojavljuje u tekstu. Navode se svi autori, ali ako broj prelazi šest, navodi se prvih šest i dodaje et al. Svi podaci o citiranoj literaturi moraju biti tačni. Literatura se u celini citira na engleskom jeziku, a iza naslova se navodi jezik članka u zagradi. Ne prihvata se citiranje apstrakata, sekundarnih publikacija, usmenih saopštenja, neobjavljenih radova, službenih i poverljivih dokumenata. Radovi koji su prihvaćeni za štampu, ali još nisu objavljeni, navode se uz dodatak „u štampi“. Rukopisi koji su predati, ali još nisu prihvaćeni za štampu, u tekstu se citiraju kao „neobjavljeni podaci“ (u zagradi). Podaci sa *Interneta* citiraju se uz navođenje datuma.

Primeri oblika referenci:

Durović BM. Endothelial trauma in the surgery of cataract. *Vojnosanit Pregl* 2004; 61(5): 491–7. (Serbian)

Balint B. From the haemotherapy to the haemomodulation. Beograd: Zavod za udžbenike i nastavna sredstva; 2001. (Serbian)

Mladenović T, Kandolf L, Mijušković ŽP. Lasers in dermatology. In: *Karadaglić D*, editor. *Dermatology*. Beograd: Vojnoizdavački zavod & Verzal Press; 2000. p. 1437–49. (Serbian)

Christensen S, Oppacher F. An analysis of Koza's computational effort statistic for genetic programming. In: *Foster JA, Lutton E, Miller J, Ryan C, Tettamanzi AG*, editors. *Genetic programming*. EuroGP 2002: Proceedings of the 5th European Conference on Genetic Programming; 2002 Apr 3–5; Kinsdale, Ireland. Berlin: Springer; 2002. p. 182–91.

Aboud S. Quality improvement initiative in nursing homes: the ANA acts in an advisory role. *Am J Nurs [serial on the Internet]*. 2002 Jun [cited 2002 Aug 12]; 102(6): [about 3 p.]. Available from: <http://www.nursingworld.org/AJN/2002/june/Wawatch.htm>

Tabele

Sve tabele štampaju se sa proredom 1,5 na posebnom listu hartije. Obeležavaju se arapskim brojevima, redosledom pojavljivanja, u desnom uglu (**Tabela 1**), a svakoj se daje kratak naslov. Objašnjenja se daju u fus-noti, ne u zaglavlju. Za fus-notu koristiti sledeće simbole ovim redosledom: *, †, ‡, §, ||, ¶, **, ††, Svaka tabela mora da se pomene u tekstu. Ako se koriste tuđi podaci, obavezno ih navesti kao i svaki drugi podatak iz literature.

Ilustracije

Slikama se zovu svi oblici grafičkih priloga i predaju se u tri primerka i na disketi (CD). Fotografije treba da budu oštre, na glatkom i sjajnom papiru, do formata dopisnice. Slova, brojevi i simboli treba da su jasni i ujednačeni, a dovoljne veličine da prilikom umanjivanja budu čitljivi. Na svakoj slici treba na poleđini, tankom grafitnom olovkom, označiti broj slike, ime prvog autora i gornji kraj slike. Slike treba obeležiti brojevima, onim redom kojim se navode u tekstu (**Sl. 1; Sl. 2** itd.). Ukoliko je slika već negde objavljena, obavezno citirati izvor.

Legende za ilustracije pisati na posebnom listu hartije, koristeći arapske brojeve. Ukoliko se koriste simboli, strelice, brojevi ili slova za objašnjenje pojedinog dela ilustracije, svaki pojedinačno treba objasniti u legendi. Za fotomikrografije navesti unutrašnju skalu i metod bojenja.

Skraćenice i simboli

Koristiti samo standardne skraćenice, izuzev u naslovu i apstraktu. Pun naziv sa skraćenicom u zagradi treba dati kod prvog pominjanja u tekstu.

Detaljno uputstvo može se dobiti u redakciji ili na sajtu:
www.vma.mod.gov.rs/vsp/download/uputstvo_za_autore.pdf.

INSTRUCTIONS TO AUTHORS

Vojnosanitetski pregljed (VSP) publishes only previously neither published nor submitted papers in any other journals in the order determined by the Editorial Board. The following should be enclosed with the manuscript: a statement that the paper has not been submitted or accepted for publication elsewhere; a consent signed by all the authors that the paper could be submitted; the name, exact address, phone number, and e-mail address of the first author and co-authors. VSP reserves all copyrights.

Papers should be sent to: Military Medical Academy, Institute for Scientific Information, Crnotravska 17, 11040 Belgrade, Serbia & Montenegro, for "Editorial Board of VSP."

VSP publishes: **editorials, original articles, short communications, reviews/meta-analyses, case reports**, from the **medical history** (general or military), personal views, invited comments, letters to the editor, reports from scientific meetings, book reviews, extensive abstracts of interesting articles from foreign language journals, and other contributions. Papers are published in Serbian or English with abstracts in both languages, and the selected ones fully in English for original articles, short communications, meta-analyses and case reports.

General review papers type will be accepted by the Editorial Board only if the authors prove themselves as the experts in the fields they write on by citing not less than 5 self-citations.

Papers should be written on IBM-compatible PC, using 12 pt font, and double spacing, and printed on the laser, or other high-quality printer without any corrections, on white bond paper ISO A4 (212×297 mm) with at least 4 cm left margin. **Bold** and *italic* letters should be avoided. Observational and experimental articles, reviews and meta-analyses, should not exceed 16 pages (including tables and illustrations); case reports – 6; short communications – 5; letters to the Editor, reports on scientific meetings and book reviews – 2.

All measurements should be reported in the metric system in terms of the International System of Units (SI). Standard, internationally accepted terms should be used. Papers should be submitted on a diskette (CD) in triplicate (original and two copies).

Authors are requested to submit the final version of manuscript approved for publishing with tables and illustrations on a 3.5" virus free diskette or a CD. **MS Word for Windows** (97, 2000, XP, 2003) is recommended for word processing; other programs are to be used only exceptionally. Illustrations should be made using standard **Windows** programs. Avoid the use of colors in graphs.

Papers are reviewed anonymously by at least two editors and/or invited reviewers. Remarks and suggestions are sent to the author for final composition. Galley proofs are sent to the first author for corrections that should be returned within 5 days. Manuscripts accepted for publication are not being returned.

Preparation of manuscript

Parts of the manuscript are: **Title page; Abstract with key words; Text; References.**

1. Title page

- The title should be concise but informative. Subheadings should be avoided;
- full name of each author;
- name and place of department(s) and institution(s) of affiliation, clearly marked by standard footnote signs.

2. Abstract and key words

The second page should carry a structured abstract with the title for original articles, meta-analyses and case reports. The abstract should state the purposes of the study or investigation, basic procedures (selection of study subjects or laboratory animals; observational and analytical methods), main findings (giving specific data and their statistical significance, if possible), and the principal conclusions. It should emphasize new and important aspects of the study or observations. **Structure** abstract should contain typical subtitles: *background/aim, methods, results and conclusion*. The abstract for meta-analyses and original papers should have up to 450 words, and up to 150 words for case reports (with subtitles *background, case report, conclusion*). Below the abstract authors should provide, and identify as such, 3–10 key words or short phrases that will assist indexers in cross-indexing the article and will be published with the abstract.

3. Text

The text of original articles is divided into sections with the headings: **Introduction, Methods, Results, and Discussion**. Long articles may need subheadings within some sections to clarify their content.

In the **Introduction** repeat the title of the article, excluding the names of authors. State the purpose of the article and summarize the rationale for the study or observation. Give only strictly pertinent references and do not include data or conclusions from the work being reported.

Methods. Describe your selection of the observational or experimental subjects (patients or experimental animals, including controls) clearly. Identify the methods, apparatus (manufacturer's name and address in parentheses), and procedures in sufficient detail to allow other workers to reproduce the results. Give references to established methods, including statistical methods. Identify precisely all drugs and chemicals used, with generic name(s), dose(s), and route(s) of administration. State the approval of the Ethics Committee for the tests in humans and animals.

Results should be presented in logical sequence in the text, tables and illustrations. Emphasize or summarize only important observations.

Discussion is to emphasize the new and important aspects of the study and the conclusions that result from them. Relate the observations to other relevant studies. Link the conclusions with the goals of the study, but avoid unqualified statements and conclusions not completely supported by your data.

References

References should be superscripted and numbered consecutively in the order in which they are first mentioned in the text. **The references must be verified by the author(s) against the original document.** List all authors, but if the number exceeds 6, give 6 followed by et al. Do not use abstracts, secondary publications, oral communications, unpublished papers, official and classified documents. References to papers accepted but not yet published should be designated as "in press". Information from manuscripts not yet accepted should be cited in the text as "unpublished observations". References are cited according to the **International Committee of Medical Journal Editors. Uniform Requirements for Manuscripts Submitted to Biomedical Journals. Ann Intern Med 1997; 126: 36–47. Updated October 2001.**

Examples of references:

Jurhar-Pavlova M, Petlichkovski A, Trajkov D, Efinanska-Mladenovska O, Arsov T, Strezova A, et al. Influence of the elevated ambient temperature on immunoglobulin G and immunoglobulin G subclasses in sera of Wistar rats. *Vojnosanit Pregl* 2003; 60(6): 657–612.

DiMaio VJ. Forensic Pathology. 2nd ed. Boca Raton: CRC Press; 2001.

Blinder MA. Anemia and Transfusion Therapy. In: Ahya NS, Flood K, Paranjothi S, editors. *The Washington Manual of Medical Therapeutics*, 30th edition. Boston: Lippincott, Williams and Wilkins; 2001. p. 413-428.

Christensen S, Oppacher F. An analysis of Koza's computational effort statistic for genetic programming. In: *Foster JA, Lutton E, Miller J, Ryan C, Tettamanzi AG*, editors. Genetic programming. EuroGP 2002: Proceedings of the 5th European Conference on Genetic Programming; 2002 Apr 3-5; Kinsdale, Ireland. Berlin: Springer; 2002. p. 182-91.

Abood S. Quality improvement initiative in nursing homes: the ANA acts in an advisory role. *Am J Nurs* [serial on the Internet]. 2002 Jun [cited 2002 Aug 12]; 102(6): [about 3 p.]. Available from: <http://www.nursingworld.org/AJN/2002/june/Wawatch.htm>

Tables

Type each table double-spaced on a separate sheet. Number tables consecutively in the order of their first citation in the text in the upper right corner (**Table 1**) and supply a brief title for each. Place explanatory matter in footnotes, using the following symbols, in this sequence: *, †, ‡, §, ||, ¶, **, ††, Each table has to be mentioned in the text. If you use data from another source, acknowledge fully.

Illustrations

Figures are submitted in triplicate, and for the final version also on diskette/CD. Photos should be sharp, glossy black and white photographic prints, not larger than 203 × 254 mm. Letters, numbers, and symbols should be clear and even throughout and of sufficient size that when reduced for publication, each item will still be legible. Each figure should have a label on its back indicating the number of the figure, author's name, and top of the figure. If a figure has been published, acknowledge the original source.

Legends for illustrations are typed on a separate page, with arabic numerals corresponding to the illustrations. Identify and explain each one clearly in the legend symbols, arrows, numbers, or letters used to identify parts of the illustrations. Explain the internal scale and identify the method of staining in photomicrographs.

Abbreviations and symbols

Use only standard abbreviations. Avoid abbreviations in the title and abstracts. The full term for which an abbreviation stands should precede its first use in the text.

Detailed Instructions are available at the web site: www.vma.mod.gov.rs/vsp/download/instructions_to_authors.pdf.



VOJNOSANITETSKI PREGLED
VOJNOMEDICINSKA AKADEMIJA
Crnotravska 17, 11040 **Beograd, Srbija**
Tel/Fax: +381 11 2669689
vmaini1@EUnetr.rs
vmavsp@hotmail.com

Časopis „Vojnosanitetski pregled“ izlazi godišnje u 12 brojeva. Godišnja pretplata za 2010. godinu iznosi: 4 000 dinara za građane Srbije, 8 000 dinara za ustanove iz Srbije i 150 € za strane državljanke i ustanove. Sredstva se uplaćuju na tekući račun Vojnomedicinske akademije Beograd kod Uprave za javna plaćanja u Beogradu broj: **840-941621-02 VMA (za Vojnosanitetski pregled ili za VSP), PIB 102116082**. Uplatnicu (dokaz o uplati) dostaviti lično ili poštom (pismom, faksom, *e-mail*-om). Za zaposlene u MO i Vojsci Srbije moguća je i pretplata u 12 mesečnih rata putem trajnog naloga, tj. „odbijanjem od plate“. Popunjen obrazac poslati na adresu VSP-a.

PRIJAVA ZA PRETPLATU NA ČASOPIS „VOJNOSANITETSKI PREGLED“

Ime i prezime ili naziv ustanove	
Jedinstveni matični broj građana	
Poreski identifikacioni broj (PIB) za ustanove	
Mesto	
Ulica i broj	
Telefon / telefaks	
Pretplata na časopis „Vojnosanitetski pregled“ (zaokružiti):	
1. Lično. Dokaz o pretplati dostavljam uz ovu prijavu.	
2. Za pripadnike MO i Vojske Srbije: Dajem saglasnost da se prilikom isplate plata u Računovodstvenom centru MO iz mojih prinadležnosti obustavlja iznos mesečne rate (preplate).	
3. Virmanom po prijemu profakture.	
Datum _____	Potpis _____



VOJNOSANITETSKI PREGLED
VOJNOMEDICINSKA AKADEMIJA
Crnotravska 17, 11040 **Beograd, Srbija**
Tel/Fax: +381 11 2669689
vmaini1@EUnetr.rs
vmavsp@hotmail.com

Časopis „Vojnosanitetski pregled“ izlazi godišnje u 12 brojeva. Godišnja pretplata za 2010. godinu iznosi: 4 000 dinara za građane Srbije, 8 000 dinara za ustanove iz Srbije i 150 € za strane državljanke i ustanove. Sredstva se uplaćuju na tekući račun Vojnomedicinske akademije Beograd kod Uprave za javna plaćanja u Beogradu broj: **840-941621-02 VMA (za Vojnosanitetski pregled ili za VSP), PIB 102116082**. Uplatnicu (dokaz o uplati) dostaviti lično ili poštom (pismom, faksom, *e-mail*-om). Za zaposlene u MO i Vojsci Srbije moguća je i pretplata u 12 mesečnih rata putem trajnog naloga, tj. „odbijanjem od plate“. Popunjen obrazac poslati na adresu VSP-a.

PRIJAVA ZA PRETPLATU NA ČASOPIS „VOJNOSANITETSKI PREGLED“

Ime i prezime ili naziv ustanove	
Jedinstveni matični broj građana	
Poreski identifikacioni broj (PIB) za ustanove	
Mesto	
Ulica i broj	
Telefon / telefaks	
Pretplata na časopis „Vojnosanitetski pregled“ (zaokružiti):	
1. Lično. Dokaz o pretplati dostavljam uz ovu prijavu.	
2. Za pripadnike MO i Vojske Srbije: Dajem saglasnost da se prilikom isplate plata u Računovodstvenom centru MO iz mojih prinadležnosti obustavlja iznos mesečne rate (preplate).	
3. Virmanom po prijemu profakture.	
Datum _____	Potpis _____

