

ČASOPIS MEDICINSKOG FAKULTETA UNIVERZITETA U BEOGRADU



# MEDICINSKA ISTRAŽIVANJA

UREĐIVAČKI ODBOR – EDITORIAL BOARD

GLAVNI I ODGOVORNI UREDNIK – EDITOR-IN-CHIEF

*Prof. dr Đorđe Radak, dopisni član SANU*

UREDNIK – EDITOR

*Prof. dr Aleksandar Ljubić*

SEKRETAR – SECRETARY

*Prof. dr Zvezdana Kojić*

Članovi – Members:

Akademik Miodrag Ostojić  
Akademik Vladimir Kostić  
Akademik Vladimir Bumbaširević  
Akademik Dragan Micić  
Akademik Predrag Peško  
Akademik Nebojša Lalić  
Prof.dr Lazar Davidović  
Prof.dr Gordana Basta-Jovanović  
Prof.dr Vesna Bošnjak-Petrović  
Prof.dr Tanja Jovanović  
Prof.dr Dragan Delić  
Prof.dr Laslo Puškaš  
Prof.dr Sandra Šipetić-Grujičić  
Prof.dr Nada Dimković  
Prof.dr Ivanka Marković  
Prof.dr Vladimir Trajković  
Doc.dr Petar Otašević  
Doc.dr Vojislav Parezanović

Članovi odbora iz inostranstva:

Members of the board from foreign countries:

Евгений Иванович Чазов – Rusija, Russia  
Николај Романович Палеев – Rusija, Russia  
Basil D. Thanopoulos – Grčka, Greece  
Nicholas Kastilambros – Grčka, Greece  
Александар Аметов – Rusija, Russia  
Manuel Serrano – Rios – Španija, Spain  
Felipe F. Casanueva – Španija, Spain  
Maria Angelica Milgino – Brazil, Brazil  
Ralf Ferdinand Basting – Nemačka, Germany  
Albert Hofman – Holandija, Nederland  
Guido Macchiarelli – Italija, Italy

TEHNIČKI SEKRETAR

Viktorija Joksimović



# MEDICINSKA ISTRAŽIVANJA

GODINA 2013.	SADRŽAJ – CONTENTS	VOL. 47. Sveska 1
<i>K. Smiljanić, I. Resanović, K. Savić, M. Obradović, B. Putniković, J. Dorđević, E. R. Isenović</i> ULOGA PKC $\delta$ I ERK1/2 U TROMBINOM STIMULISANOJ PROLIFERACIJI GLATKIH MIŠIĆNIH ČELIJA KRVNIH SUDOVA	5	<i>K. Smiljanić, I. Resanović, K. Savić, M. Obradović, B. Putniković, J. Dorđević, E. R. Isenović</i> ROLE OF PKC $\delta$ AND ERK1/2 IN TROMBIN- STIMULATED VASCULAR SMOOTH MUSCLE CELLS PROLIFERATION
<i>K. Smiljanić, I. Resanović, K. Savić, A. Jovanović, S. Zafirović, M. Obradović, E. R. Isenović</i> ULOGA RECEPTORA ZA EPIDERMALNI FAKTOR RASTA U TROMBINOM REGULISANOJ PROLIFERACIJI GLATKIH MIŠIĆNIH ČELIJA KRVNIH SUDOVA	10	<i>K. Smiljanić, I. Resanović, K. Savić, A. Jovanović, S. Zafirović, M. Obradović, E. R. Isenović</i> ROLE OF THE EPIDERMAL GROWTH FACTOR RECEPTOR IN THROMBIN REGULATED VASCULAR SMOOTH MUSCLE CELLS PROLIFERATION
<i>D. Vučević, Đ. Radak, D. Kovačević, I. Milovanović, T. Radosavljević, D. Mladenović, S. Kovačević</i> KORELACIJA IZMEĐU AKTIVNOSTI ALFA NAFTIL ACETAT ESTERAZE I RAZLIČITOG STEPENA SUŽENJA HUMANE KAROTIDNE ARTERIJE	21	<i>D. Vučević, Đ. Radak, D. Kovačević, I. Milovanović, T. Radosavljević, D. Mladenović, S. Kovačević</i> CORRELATION BETWEEN ALPHA NAPHTHYL ACETATE ESTERASE ACTIVITY AND DIFFERENT DEGREES OF STENOSIS OF HUMAN CAROTID ARTERY
<i>S. Babić, S. Tanasković, V. Sotirović, Đ. Radak</i> SURGICAL TREATMENT OF PORTAL HYPERTENSION	33	<i>S. Babić, S. Tanasković, V. Sotirović, Đ. Radak</i> HIRURŠKO LEČENJE PORTNE HIPERTENZIJE
<i>D. Lukić, P. Lazić, J. Bandić, Z. Tačević, N. Babić, D. Ivić</i> INFLUENCE OF RADICALITY SURGICAL EXCISION ON RESULTS IN THE TREATMENT OF BASOCELLULAR SKIN CARCINOMA (BCC)	39	<i>D. Lukić, P. Lazić, J. Bandić, Z. Tačević, N. Babić, D. Ivić</i> UTICAJ RADIKALNOSTI HIRURŠKE EKSCIZIJE NA REZULTATE LEČENJA BAZOCELULARNOG KARCINOMA KOŽE (BCC)
<i>D. Lukić, P. Lazić, J. Bandić, Đ. Radak, N. Babić, D. Ivić</i> THE ANALYSIS OF INFLUENCE OF TUMOR LOCALIZATION ON LATE DIAGNOSIS AND TREATMENT IN PATIENTS WITH SKIN MELANOMA	45	<i>D. Lukić, P. Lazić, J. Bandić, Đ. Radak, N. Babić, D. Ivić</i> ANALIZA UTUCAJA LOKALIZACIJE TUMORA NA KASNU DIJAGNOZU I LEČENJE PACIJENATA SA MELANOM KOŽE

<i>Luigi Meccariello, Sara Cioffi, Predrag Grubor, Raffaele Franzese, Raffaele Cioffi, Salvatore Di Giacinto</i> FLAT-BACK SYNDROME AS POST TRAUMATIC OR POST SCOLIOSIS TREATMENT DISORDER OF THE SPINE	51	<i>Luigi Meccariello, Sara Cioffi, Predrag Grubor, Raffaele Franzese, Raffaele Cioffi, Salvatore Di Giacinto</i> SINDROM RAVNIH LEĐA – POST TRAUMATOLOŠKI I POST SKOLIOZNI POREMEĆAJ KIČME	51
<i>G. Antuleska – Belčeska</i> JAVNO-ZDRAVSTVENI I BIOMEDICINSKI ASPEKTI SKOLIOZE KOD ŠKOLSKE POPULACIJE OD 7-14 GODINA U REPUBLICI MAKEDONIJI	57	<i>G. Antuleska – Belčeska</i> PUBLIC HEALTH AND BIOMEDICAL ASPECTS OF SCOLIOSIS AMONG SCHOOL POPULATION AT THE AGE OF 7-14 IN THE REPUBLIC OF MACEDONIA	57
<i>S.Mićić, D. Sinadinović,</i> STAVOVI STUDENATA PREMA UČENJU ENGLSKOG JEZIKA MEDICINE I PRILAGOĐAVANJE NASTAVE POTREBAMA STUDENATA	67	<i>S.Mićić, D. Sinadinović,</i> STUDENTS ATTITUDES ON LEARNING ENGLISH FOR MEDICAL ACADEMIC PURPOSES AND ADAPTING THE TEACHING PROCESS TO THEIR NEEDS	67

<sup>1</sup>Institut "Vinča", Univerzitet u Beogradu, Laboratorija za molekularnu genetiku i radiobiologiju,

<sup>2</sup>Kliničko bolnički centar Zemun, Odeljenje kardiologije, Zemun

<sup>3</sup>Biološki fakultet Univerziteta u Beogradu

## ULOGA PKC $\delta$ I ERK1/2 U TROMBINOM STIMULISANOJ PROLIFERACIJI GLATKIH MIŠIĆNIH ĆELIJA KRVNIH SUDOVA

### ROLE OF PKC $\delta$ AND ERK1/2 IN TROMBIN-STIMULATED VASCULAR SMOOTH MUSCLE CELLS PROLIFERATION

K.Smiljanić<sup>1</sup>, I.Resanović<sup>1</sup>, K. Savić<sup>1</sup>, M. Obradović<sup>1</sup>, B.Putniković<sup>2</sup>, J.Đorđević<sup>3</sup>, E. R.Isenović<sup>1</sup>

#### Sažetak

Kardiovaskularne bolesti predstavljaju najveći uzrok smrtnosti ljudske populacije, a jedna od njihovih najučestalijih patoloških komponenti je i sama ateroskleroza. Proliferacija ili deoba glatkih mišićnih ćelija krvnih sudova (VSMC) ključni je događaj u nastanku raznih vaskularnih oboljenja, uključujući ateroskleroza i hipertenziju. U procesu diferencijacije i abnormalne deobe VSMC povezanih sa hipertenzijom i aterosklerozom uključen je i trombin.

Stimulisanje VSMC trombinom dovodi do aktivacije ekstracelularnim signalima regulisanih kinaza 1 i 2 (ERK1/2), preko transaktivacije receptora za epidermalni faktor rasta (EGFR). U našim ranijim studijama potvrdili smo na osnovu inhibicije ERK1/2 od strane PD9805 inhibitora, učešće ERK1/2 u regulaciji proliferacije VSMC izazvanoj trombinom. Takođe, protein kinaza C delta (PKC $\delta$ ), detektovana je u VSMC i pokazano je da je i njena aktivnost takođe regulisana trombinom.

U okviru ovog preglednog članka biće prikazani literaturni podaci koji se odnose na ulogu PKC $\delta$  i ERK1/2, u posredovanju proliferativnog efekta trombina na VSMC.

**Ključne reči:** trombin, VSMC, proliferacija, PKC $\delta$ , ERK1/2, EGFR, ateroskleroza.

#### Summary

Cardiovascular disease is the greatestest single cause of mortality and its major underlying pathology is atherosclerosis. The proliferation of vascular smooth muscle cells (VSMC) is a key event in the pathogenesis of various vascular diseases, including atherosclerosis and hypertension. Thrombin is involved in the differentiation and abnormal proliferation of VSMC associated with atherosclerosis and hypertension.

Thrombin stimulation results in extracellular signal-regulated kinase (ERK1/2) activation through

transactivation of the epidermal growth factor receptor (EGFR). Based on our recent studies in which PD98059 used to inhibit ERK1/2, we have shown previously that ERK1/2 was involved in the regulation by thrombin of VSMC's proliferation. In addition, protein kinase C delta (PKC $\delta$ ) have also been detected in VSMC and shown to be regulated by thrombin.

In this review, we are presenting literature data relating to role of PKC $\delta$  and ERK1/2 in mediating the mitogenic action of thrombin in VSMC.

**Key words:** Thrombin, VSMC, Proliferation, PKC $\delta$ , EGFR, ERK1/2, Atherosclerosis.

#### Uvod

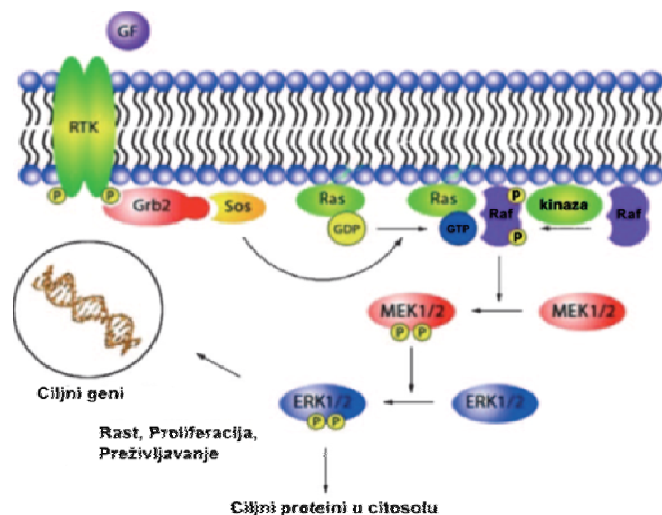
Proliferacija i patološka akumulacija glatkih mišićnih ćelije krvnih sudova (VSMC, engl. "Vascular Smooth Muscle Cell") su jedan od ključnih događaja u genezi raznih vaskularnih oboljenja, kao što su ateroskleroza i hipertenzija [1, 2].

Trombin ima ulogu u mnogobrojnim procesima, kao što su regulisanje tonusa i propustljivosti krvnih sudova, proliferacije i migracije VSMC, , privlačenja monocita i raznih proinflamatornih markera u aterosklerotske lezije, što sve zajedno, doprinosi progresiji kardiovaskularnih oboljenja [3]. Trombin je agonist receptora spregnutog sa proteinom G (GPCR, engl. "G Protein Coupled Receptor"), čijom aktivacijom dolazi do stimulacije fosfolipaze C, porasta nivoa intracelularnog Ca<sup>2+</sup> i aktivacije protein kinaze C (PKC), što sve zajedno aktivira signalni put mitogenom aktivirane protein kinaze (MAPK, engl. "Mitogen-Activated Protein Kinases"), u kome centralno mesto zauzima ekstracelularnim signalom regulisana kinaza 1/2 (ERK1/2, engl. "Extracellular-signal Regulated Kinase 1/2") [4, 5]. U našim prethodnim studijama potvrdili smo učešće ERK1/2 u regulaciji proliferacije VSMC izazvanoj trombinom [6, 7].

Brojna familija Ser/Thr PKC uključena je u mnoge ćelijske aktivnosti i regulaciju signalnih puteva [8, 9] uključujući i proliferaciju glatkih mišićnih ćelija traheja čoveka i psa pod delovanjem trombina [10, 11]. Protein kinaza C delta (PKC $\delta$ ), član podgrupe novih PKC kinaza [8], do skora je bila implicirana samo u negativnoj regulaciji proliferacije i apoptoze u velikom broju ćelijskih linija i tumorskih ćelija [12, 13]. Prvi izveštaj o pozitivnoj mitogenoj ulozi PKC $\delta$  u ćelijama mlečnih žlezda pacova je u studiji Grossoni i sar. (2007). Nedavno, Hsieh i sar. (2009), a potom i Smiljanić i sar. (2011) su ukazali na pozitivno učešće PKC $\delta$  u proliferaciji VSMC pacova stimulisanih trombinom, ali je ostao nerazjašnjen mehanizam dejstva ove kinaze.

### Uloga MAPK u proliferaciji VSMC

MAPK su familija serin (Ser)/treonin (Thr) protein kinaza, koje učestvuju u regulaciji više signalnih puteva uključenih u osnovne ćelijske procese kao što su rast, proliferacija, diferencijacija i ćelijski opstanak [6, 14-16]. U osnovi signalnih puteva MAPK su tri kinaze: MAPK kinaza kinaza (MAPKKK; MEKK tj. MEK kinaza; Raf) koja fosforiliše i aktivira MAPK kinazu (MAPKK; MEK; MKK), koja zatim aktivira MAPK [17] (Slika 1). Postoji najmanje pet različitih signalnih puteva MAPK nazvanih po specifičnoj MAPK sa kojom je povezan [16, 18]. Najvažnije su izoforme MAPK od 42 i 44 kDa, poznate i kao ERK1/2, c-Jun N-terminalna kinaza (JNK/SAPK, engl. "c-Jun N-Terminal Kinases/Stress-Activated Protein Kinase") i p38 kinaza.



Slika 1. Šematski prikaz aktivacije Ras-Raf-MEK1/2-ERK1/2 kaskade. Grb2 - adaptorni protein Grb-2 (engl. "Growth factor Receptor Bound protein-2"); Sos - faktor izmene nukleotida Sos - (engl. "Son of Sevenless"); Ras - mali GTP vezujući protein. Preuzeto i modifikovano iz [18].

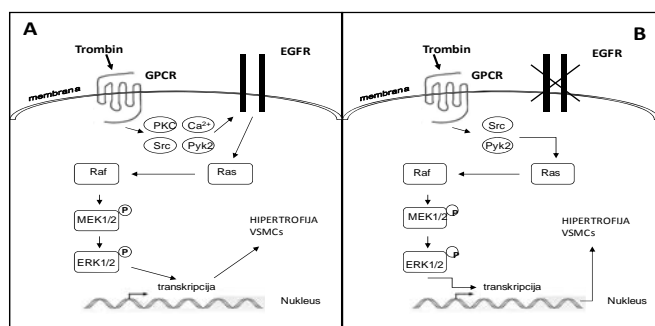
Aktivacija signalnih puteva MAPK uključuje male GTP hidrolaze, tzv., male GTP vezujuće proteine (Ras, engl. "Rat sarcoma"), koja regrutuje Raf kinazu u membranu, što dovodi do fosforilacije i aktivacije ERK1/2 [19], (Slika 1). Za punu aktivnost ERK1/2 neophodna je fosforilacija na dva aminokiselinska mesta: Thr202 i Tyr204 za ERK1 i Thr183 i Tyr185 na ERK2. Aktivirana ERK1/2 zatim može da fosforiliše različite Ser/Thr ostatke više od 50 različitih citosolnih i nuklearnih proteina i transkripcionih faktora i time utiče na ekspresiju gena koji vode povećanju proliferacije, diferencijacije i preživljavanja ćelije [18, 20], (Slika 1).

Od tri MAPK, pokazano je da ERK1/2 i p38 kinaze imaju aktivnu ulogu u prenosu signala faktora rasta i proliferaciji VSMC [21, 22]. Znatno je više objavljenih rezultata o učešću ERK1/2 nego p38 u transaktivaciji receptora epidermalnog faktora rasta (EGFR engl. "Epidermal Growth Factor Receptor") i subsekventnoj proliferaciji VSMC [7, 23-28].

S jedne strane, postoje radovi koji govore u prilog kritične uloge aktivacije EGFR potrebne za aktiviranje ERK1/2 kinaze [23, 26, 29, 30], a takođe postoje i radovi koji ukazuju da se MAPK signalni put može aktivirati nezavisno od aktivacije EGFR [7, 30]. Skoro kompletna inhibicija ERK1/2 aktivacije izazvane trombinom u VSMC, pomoću dva inhibitora EGFR kinazne aktivnosti, AG-1478 i PD 153035 ipak govori u prilog zavisnosti aktivacije ERK1/2 od transaktivacije EGFR [7] što je u skladu sa centralnom ulogom koju EGFR ima u prenosu GPCR signala [31]. S druge strane, u astrocitima transaktivacija EGFR nije neophodna da bi trombin aktivirao ERK1/2 [32]. Takođe, u studiji Bobe i sar., (2003) pokazano je da pretretman VSMC sa BAPTA-AM (Ca<sup>2+</sup> helirajuće jedinjenje, membranski propusno, koristi se kao intracelularni „sunder“ za Ca<sup>2+</sup>) potpuno inhibira fosforilaciju EGFR izazvanu trombinom, a ERK1/2 samo parcijalno, što ukazuje na postojanje EGFR-zavisnih i EGFR-nezavisnih puteva ERK1/2 aktivacije odmaskiranih u uslovima unutarćelijske deprivacije Ca<sup>2+</sup> [7, 27] (Slika 2).

Dodatne dokaze o postojanju EGFR-nezavisnih puteva aktivacije ERK1/2, pružila su i naša najnovija istraživanja [33], gde je pokazano da je aktivacija ERK1/2 važan korak u proliferaciji VSMC stimulisanom trombinom. Inhibicija molekula učesnika signalnog puta koji vodi proliferaciji VSMC kao što su: EGFR, HB-EGF (eng. Growth Factor like Epidermal Factor which Binding Heparin), ADAM 12 (eng. A Disintegrin And Metalloproteinase domain-containing protein 12), MMP-2 (eng. Matrix Metalloproteinase-2) i PKC $\delta$  inhibira aktivaciju ERK1/2 u istoj meri kao i proliferaciju VSMC stimulisanu trombinom.

III Uloga PKC $\delta$  u proliferaciji VSMC



Slika 2. (A) EGFR zavistan put aktivacije ERK1/2 u VSMC. (B) EGFR nezavistan put aktivacije ERK1/2 u VSMC. Preuzeto i modifikovano iz [7, 27].

PKC su familija serin i treonin specifičnih proteinskih kinaza koje mogu biti aktivirane sa Ca<sup>2+</sup>, fosfolipidima i DAG. Članovi PKC familije fosforilišu širok spektar proteinskih „meta“ i poznate su po učešću u širokom spektru ćelijskih događaja, poput ćelijske adhezije, transformacije, kritičnih tačaka ćelijskog ciklusa i kontrole ćelijske zapremine [8]. Svaki član PKC familije ima poseban ekspresioni profil i ima različitu ulogu u ćelijama. Kod sisara, PKC familija kinaza podeljena je na 4 grupe na osnovu strukturnih i funkcionalnih razlika njihovih regulatornih domena: klasične izoforme (PKC $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ), nove izoforme (PKC $\delta$ ,  $\epsilon$ ,  $\eta$ ,  $\theta$ ), atipične izoforme (PKC $\zeta$ ,  $\lambda$ ) i kinaze slične PKC kinazama (PKN1,2,3) [9].

Najprisutnija, najviše eksprimirana izoforma PKC u humanim i pacovskim VSMC je PKC $\delta$  [34, 35], mada su prisutne i PKC $\alpha$ ,  $\beta$  i  $\epsilon$  [36]. Za razliku od klasičnih PKC koje su aktivirane vezivanjem DAG, fosfolipida i Ca<sup>2+</sup> za odgovarajuće domene, PKC $\delta$  nije direktno aktivirana sa Ca<sup>2+</sup> jer nema Ca<sup>2+</sup>-vezujući domen [8].

PKC učestvuje u proliferaciji glatkih mišićnih ćelija traheja čoveka i psa pod delovanjem trombina [10, 11]. PKC $\delta$ , član podgrupe novih PKC kinaza [8], do skora je bila uključena samo u negativnu regulaciju proliferacije i apoptoze u velikom broju ćelijskih linija i tumorskih ćelija, noseći atribut tumorskog supresora [12, 13]. Prvi izveštaj o pozitivnoj mitogenoj ulozi PKC $\delta$  u mlečnim ćelijama pacova objavili su Grossoni i sar. (2007). Nedavno, Hsieh i sar. (2009), a potom i naša grupa (2011) su ukazali na pozitivno učešće PKC $\delta$  u proliferaciji VSMC pacova stimuliranih trombinom, ali je ostala nerazjašnjena precizna uloga i mehanizam učešća ove kinaze u kompleksnoj mreži proliferativnog odgovora VSMC pod delovanjem trombina.

Naša najnovija istraživanja [33], ukazuju da PKC $\delta$ , osim što aktivira ERK1/2 posredno preko EGFR transaktivacije [23], i direktno aktivira MAP kinazni put [37]. Takođe rasvetlili smo i njeno učešće u okviru transaktivacije EGFR kaskade gde poredc-Src (eng. cellular Src), PKC $\delta$  učestvuje u aktivaciji ADAM 12, MT1-MMP (eng. Membrane-Associated MMP),

kao i same c-Src, time pojačavajući sam signal i obezbeđujući i dodatni baj-pas signala u uslovima intraćelijske homeostaze Ca<sup>2+</sup> preko aktivacije ne receptorske prolinom bogate tirozin kinaze Pyk2. Bobe i sar. (2003) su u uslovima deprivacije Ca<sup>2+</sup> i isključenja signalizacije EGFR receptora, pokazali učešće c-Src uzvodno od Pyk2 kinaze u trombinom stimuliranoj EGFR transaktivaciji i ERK1/2 aktivaciji. Dikić i sar. (1996) su pokazali da Pyk2 i Src imaju kompleksnu, izjednačenu ulogu, ali ima i radova koji pokazuju da je Ca<sup>2+</sup>-zavisna Pyk2 locirana uzvodno od c-Src kinaze i aktivira je [38, 39]. Suprotni nalazi mogu se objasniti različitim eksperimentalnim uslovima, a takođe je moguće da u slučajevima Ca<sup>2+</sup> deprivacije, prvenstvo ima c-Src, koja potom aktivira Pyk2 [7].

Na osnovu svojih rezultata, Dang i sar. (2011), sugerišu da specifičnost (selektivnost) oslobađanja EGFR liganada preko PKC-zavisnih i -nezavisnih signalnih puteva uključuje regulaciju proteolitičkog cepanja liganada ne samo na nivou metaloproteinaza (ADAM), već i na nivou nekog drugog adaptornog proteina ili samog prekursora liganada. Isti autori tvrde da PKC izoforma uključena u regulaciju proteolitičkog cepanja HB-EGF ne zavisi ustvari od identiteta ADAM molekula već od stimulusa. To ide u prilog objašnjenju kako je moguće da ADAM 12 bude glavna proteolitička „makazica“ HB-EGF u VSMC pod delovanjem trombina naspram velike grupe radova koja govori u prilog ADAM 17 kao glavnom proteolitičkom enzimu koji odcepljuje HB-EGF u ANG II-stimuliranim VSMC. Ovo takođe može objasniti i različite rezultate vezane za učešće PKC $\delta$  i PKC $\epsilon$  formi u aktivaciji ADAM 12. Naime, naši preliminarni rezultati [33], kao i rad Hsieh i sar. (2009), pokazuju učešće PKC $\delta$  u trombinom stimuliranoj proliferaciji VSMC. S druge strane, Sundberg i sar. (2004) sugerišu da PKC $\epsilon$  učestvuje u translokaciji ADAM 12 na površinu ćelije u RD ćelijama čoveka (engl. “Rhabdomyosarcoma”). Ove razlike o učešću različitih PKC izoformi mogu se objasniti korišćenjem različitih ćelijskih linija, kao i različitih stimulusa, kako je već pretpostavljeno od strane Dang i sar. (2011).

U zaključku, PKC $\delta$  je važan molekul-spona između transaktivacije EGFR receptora i signalnog puta trombinskih PAR receptora u proliferaciji primarnih kultura VSMC stimuliranih trombinom.

### Zaključak

U zaključku, PKC $\delta$  i ERK1/2 uključeni su u trombinom stimuliranoj proliferaciji VSMC. Saznanje o učešću nekog od PKC $\delta$  i ERK1/2 molekula u proliferaciji glatkih mišićnih ćelija krvnih sudova pod delovanjem trombina od izuzetne je važnosti za bolje razumevanje uloge trombina u kardiovaskularnoj biologiji i medicini. Pošto je ERK1/2 potvrđen kao

medijator hipertrofije VSMC, on, zajedno sa PKC $\delta$  može biti prepoznat kao ključna „meta” u novim terapijskim intervencijama kojima bi se smanjilo ireverzibilno oštećenje tkiva povezano sa aterosklerozom i hipertenzijom. Jedna od poželjnih

opcija, kao in vivo regulisane sinteze PKC $\delta$  i ERK1/2, zasigurno bi u terapijskoj intervenciji doprinela redukciji patološke proliferacije VSMC.

#### Zahvalnica

Ovaj rad je podržan projektom broj 173033 (Esma R. Isenović) finansiranim od strane Ministarstva prosvete i nauke.

#### Literatura

1. Beckman, J.A., M.A. Creager, and P. Libby, Diabetes and atherosclerosis: epidemiology, pathophysiology, and management. *JAMA*, 2002. 287(19): p. 2570-81.
2. Mnjogan, Z.H., et al., The critical role of the intrinsic VSMC proliferation and death programs in injury-induced neointimal hyperplasia. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2008. 294(5): p. H2276-84.
3. Borissoff, J.I., et al., Is thrombin a key player in the 'coagulation-atherogenesis' maze? *Cardiovasc Res*, 2009. 82(3): p. 392-403.
4. Fager, G., Thrombin and proliferation of vascular smooth muscle cells. *Circ Res*, 1995. 77(4): p. 645-50.
5. Gutkind, J.S., Cell growth control by G protein-coupled receptors: from signal transduction to signal integration. *Oncogene*, 1998. 17(11 Reviews): p. 1331-42.
6. Isenovic, E.R., et al., Involvement of ERK1/2 kinase in insulin-and thrombin-stimulated vascular smooth muscle cell proliferation. *Angiology*, 2010. 61(4): p. 357-64.
7. Bobe, R., et al., Evidence for ERK1/2 activation by thrombin that is independent of EGFR transactivation. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2003. 285(2): p. H745-54.
8. Mellor, H. and P.J. Parker, The extended protein kinase C superfamily. *Biochem J*, 1998. 332 ( Pt 2): p. 281-92.
9. Rosse, C., et al., PKC and the control of localized signal dynamics. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2010. 11(2): p. 103-12.
10. Lin, C.C., et al., Mechanisms of thrombin-induced MAPK activation associated with cell proliferation in human cultured tracheal smooth muscle cells. *Cell Signal*, 2001. 13(4): p. 257-67.
11. Lin, C.C., et al., Thrombin-stimulated cell proliferation mediated through activation of Ras/Raf/MEK/MAPK pathway in canine cultured tracheal smooth muscle cells. *Cell Signal*, 2002. 14(3): p. 265-75.
12. Grossoni, V.C., et al., Protein kinase C delta enhances proliferation and survival of murine mammary cells. *Mol Carcinog*, 2007. 46(5): p. 381-90.
13. Yamaguchi, T., Y. Miki, and K. Yoshida, Protein kinase C delta activates IkappaB-kinase alpha to induce the p53 tumor suppressor in response to oxidative stress. *Cell Signal*, 2007. 19(10): p. 2088-97.
14. Isenovic, E.R., et al., Insulin regulation of proliferation involves activation of AKT and ERK 1/2 signaling pathways in vascular smooth muscle cells. *Exp Clin Endocrinol Diabetes*, 2009. 117(5): p. 214-9.
15. Seger, R. and E.G. Krebs, The MAPK signaling cascade. *FASEB J*, 1995. 9(9): p. 726-35.
16. Lewis, T.S., P.S. Shapiro, and N.G. Ahn, Signal transduction through MAP kinase cascades. *Adv Cancer Res*, 1998. 74: p. 49-139.
17. Chang, C. and Z. Werb, The many faces of metalloproteases: cell growth, invasion, angiogenesis and metastasis. *Trends Cell Biol*, 2001. 11(11): p. S37-43.
18. Yap, J.L., et al., Small-molecule inhibitors of the ERK signaling pathway: Towards novel anticancer therapeutics. *ChemMedChem*, 2011. 6(1): p. 38-48.
19. Minden, A., et al., Differential activation of ERK and JNK mitogen-activated protein kinases by Raf-1 and MEKK. *Science*, 1994. 266(5191): p. 1719-23.
20. Taniguchi, C.M., B. Emanuelli, and C.R. Kahn, Critical nodes in signalling pathways: insights into insulin action. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2006. 7(2): p. 85-96.
21. Kanda, Y., et al., Thrombin-induced p38 mitogen-activated protein kinase activation is mediated by epidermal growth factor receptor transactivation pathway. *Br J Pharmacol*, 2001. 132(8): p. 1657-64.
22. Force, T. and J.V. Bonventre, Growth factors and mitogen-activated protein kinases. *Hypertension*, 1998. 31(1 Pt 2): p. 152-61.
23. Hsieh, H.L., et al., Thrombin induces EGF receptor expression and cell proliferation via a PKC(delta)/c-Src-dependent pathway in vascular



- smooth muscle cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2009. 29(10): p. 1594-601.
24. Huang, Y.L., et al., Thrombin induces nestin expression via the transactivation of EGFR signalings in rat vascular smooth muscle cells. *Cell Signal*, 2009. 21(6): p. 954-68.
  25. Brandes, R.P., et al., Thrombin-induced MCP-1 expression involves activation of the p22phox-containing NADPH oxidase in human vascular smooth muscle cells. *Thromb Haemost*, 2001. 85(6): p. 1104-10.
  26. Kalmes, A., et al., Heparin blockade of thrombin-induced smooth muscle cell migration involves inhibition of epidermal growth factor (EGF) receptor transactivation by heparin-binding EGF-like growth factor. *Circ Res*, 2000. 87(2): p. 92-8.
  27. Isenovic, E.R., et al., Role of ERK1/2 Activation In Thrombin-Induced Vascular Smooth Muscle Cell Hypertrophy. *Current Hypertension Reviews*, 2008. 4: p. 190-196.
  28. Molloy, C.J., et al., Thrombin receptor activation elicits rapid protein tyrosine phosphorylation and stimulation of the raf-1/MAP kinase pathway preceding delayed mitogenesis in cultured rat aortic smooth muscle cells: evidence for an obligate autocrine mechanism promoting cell proliferation induced by G-protein-coupled receptor agonist. *J Clin Invest*, 1996. 97(5): p. 1173-83.
  29. Hsieh, H.L., et al., PKC-delta/c-Src-mediated EGF receptor transactivation regulates thrombin-induced COX-2 expression and PGE(2) production in rat vascular smooth muscle cells. *Biochim Biophys Acta*, 2008. 1783(9): p. 1563-75.
  30. Yin, X., et al., Role of L-type calcium channel blocking in epidermal growth factor receptor-independent activation of extracellular signal regulated kinase 1/2. *J Hypertens*, 2005. 23(2): p. 337-50.
  31. Zwick, E., et al., The EGF receptor as central transducer of heterologous signalling systems. *Trends Pharmacol Sci*, 1999. 20(10): p. 408-12.
  32. Wang, H., et al., Thrombin (PAR-1)-induced proliferation in astrocytes via MAPK involves multiple signaling pathways. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2002. 283(5): p. C1351-64.
  33. Smiljanić, K., Uticaj trombina na regulaciju proliferacije glatkih mišićnih ćelija aorte pacova. 2012, doktorska disertacija, Biološki fakultet, Univerzitet u Beogradu: Beograd.
  34. Fukumoto, S., et al., Protein kinase C delta inhibits the proliferation of vascular smooth muscle cells by suppressing G1 cyclin expression. *J Biol Chem*, 1997. 272(21): p. 13816-22.
  35. Assender, J.W., E. Kontny, and B.B. Fredholm, Expression of protein kinase C isoforms in smooth muscle cells in various states of differentiation. *FEBS Lett*, 1994. 342(1): p. 76-80.
  36. Ding, R.Q., et al., Therapeutic Potential for Protein Kinase C Inhibitor in Vascular Restenosis. *Journal of Cardiovascular Pharmacology and Therapeutics*, 2011. 16(2): p. 160-167.
  37. Ginnan, R., et al., PKC-delta and CaMKII-delta 2 mediate ATP-dependent activation of ERK1/2 in vascular smooth muscle. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2004. 286(6): p. C1281-9.
  38. Block, E.R., M.A. Tolino, and J.K. Klarlund, Pyk2 activation triggers epidermal growth factor receptor signaling and cell motility after wounding sheets of epithelial cells. *J Biol Chem*, 2010. 285(18): p. 13372-9.
  39. Blaukat, A., et al., Adaptor proteins Grb2 and Crk couple Pyk2 with activation of specific mitogen-activated protein kinase cascades. *J Biol Chem*, 1999. 274(21): p. 14893-901.

Institut "Vinča", Univerzitet u Beogradu, Laboratorija za molekularnu genetiku i radiobiologiju

## ULOGA RECEPTORA ZA EPIDERMALNI FAKTOR RASTA U TROMBINOM REGULISANOJ PROLIFERACIJI GLATKIH MIŠIĆNIH ĆELIJA KRVNIH SUDOVA

### ROLE OF THE EPIDERMAL GROWTH FACTOR RECEPTOR IN THROMBIN REGULATED VASCULAR SMOOTH MUSCLE CELLS PROLIFERATION

K. Smiljanić, I. Resanović, K. Savić, A. Jovanović, S. Zafirović, M. Obradović, E. R. Isenović

#### **Sažetak**

Zajednički činioc u nastanku vaskularnih oboljenja kao što su ateroskleroza, restenoza i hipertenzija je patološka proliferacija i akumulacija glatkih mišićnih ćelija krvnog suda (VSMC) u njegov unutrašnji (intima) sloj.

Trombin, ključni hormon koagulationo-aterogenetske mreže posreduje u regulisanju tonusa i propustljivosti krvnih sudova, migracije i proliferacije VSMC, privlačenja monocita i raznih proinflamatornih markera u aterosklerotske lezije i svoje efekte ostvaruje direktno kao serinska proteinaza i aktivacijom svojih receptora spregnutih sa G proteinom (GPCR). Pokazano je da trombin posreduje u proliferaciji VSMC transaktivacijom receptora za epidermalni faktor rasta (EGFR). Proces transaktivacije EGFR preko aktivacije trombinskih receptora, uključuje metaloproteinaze koje generišu ligande proteolitičkim cepanjem membranskih prekursora, kao što je heparin vezujući epidermalni faktor rasta (HB-EGF) koji se vezuje za EGFR i aktivira ga, što vodi proliferaciji VSMC preko nishodnih, signalnih puteva mitogenom aktiviranih protein kinaza (MAPK).

U okviru ovog preglednog članka su prikazani i diskutovani novi literaturni podaci koji se odnose na: ulogu aktivacije EGFR u posredovanju proliferativnog efekta trombina na VSMC, razumevanje i reviziju koncepta trostruke kaskade transaktivacije EGFR stimulisane trombinom u mehanizmu proliferacije VSMC.

**Ključne reči:** trombin, VSMC, proliferacija, transaktivacija, EGFR, ateroskleroza.

#### **Summary**

The common factor in the development of vascular diseases, such as atherosclerosis, hypertension and restenosis, is excessive accumulation

and proliferation of vascular smooth muscle cells (VSMC) within inner (intima) layer of vessel wall.

Thrombin, a key player in athero-coagulation maze, mediates the regulation of vascular permeability and contraction, migration and proliferation of VSMC, attracting monocytes and a variety of pro-inflammatory markers in atherosclerotic lesions. Thrombin exerts its effects either directly as serine proteinases and/or via activation of its G proteins coupled receptors (GPCR). It has been shown that thrombin mediates transactivation of epidermal growth factor receptor (EGFR) within the process of VSMC proliferation. EGFR transactivation process through the activation of thrombin protease activated receptor (PAR), includes a matrix metalloproteinase cleavage of membrane ligands precursors such as epidermal growth factor like growth factor that binds heparin (HB-EGF) that binds to the EGFR and activates it, leading to VSMC proliferation via downstream signaling pathways of mitogen activated protein kinase (MAPK).

This review article presents review of the new literature data concerning: the role of EGFR activation in mediating the proliferative effect of thrombin in VSMC and understanding of the concept of the triple cascade of EGFR transactivation stimulated by thrombin in the mechanism of VSMC proliferation.

**Key words:** thrombin, VSMC, proliferation, transactivation, EGFR, atherosclerosis.

#### **Uvod**

Glatke mišićne ćelije krvnih sudova (VSMC, engl. "Vascular Smooth Muscle Cell") od vitalnog su značaja za strukturu i funkcionisanje krvnih sudova. Zajednički činioci u nastanku vaskularnih oboljenja poput ateroskleroze, restenoze i hipertenzije su prekomerna proliferacija i abnormalna akumulacija VSMC [1, 2]. Kardiovaskularne bolesti danas su jedan

od vodećih uzroka smrtnosti ljudske populacije u čijoj osnovi, u najvećoj meri, dominira ateroskleroza kao patološka komponenta [3].

Trombin, ključni hormon koagulaciono-aterogenetske mreže posreduje u regulisanju: tonusa i propustljivosti krvnih sudova, migracije i proliferacije VSMC, privlačenja monocita i raznih proinflamatornih markera u aterosklerotske lezije i svoje efekte ostvaruje direktno kao serinska proteinaza i aktivacijom svojih receptora spregnutih sa G proteinom (GPCR, engl. "G Protein Coupled Receptor") [4-8]. Pokazano je da trombin posreduje u proliferaciji VSMC, fibroblasta, endotelnih ćelija, transaktivacijom receptora za epidermalni faktor rasta (EGFR, engl. "Epidermal Growth Factor Receptor"), ali ne i kod astrocita. Proces transaktivacije EGFR, preko aktivacije GPCR, kao što su trombinski proteazom aktivirani receptori (PAR, engl. "Protease-Activated Receptor), uključuje metaloproteinaze (MP) koje cepaju ligande (engl. "shedding of ligands") od membranskih prekursora, kao što je prekursor faktora rasta sličan epidermalnom faktoru rasta koji vezuje heparin (pro-HB-EGF, engl. "pro Heparin Binding-Epidermal Growth Factor-like growth factor"). Otcepljeni faktor rasta sličan epidermalnom faktoru rasta koji vezuje heparin (HB-EGF, engl. "Heparin Binding Epidermal Growth Factor-like growth factor"), vezuje se za EGFR i aktivira ga [8-10]. Kao posledica njegove aktivacije, dolazi do aktivacije nishodnih signalnih puteva MAPK kinaza, što je i potvrđeno u našim ranije objavljenim istraživanjima o učešću ekstracelularnim signalom regulisane kinaze 1/2 (ERK1/2, engl. "Extracellular-signal Regulated Kinase 1/2") u regulaciji proliferacije VSMC indukovanoj trombinom [7, 8].

Iz literaturnih radova može se primetiti da je još uvek nedovoljno rasvetljena uloga aktivacije kako EGFR tako i MAPK kinaza u proliferaciji VSMC pod delovanjem trombina. S jedne strane, naučni radovi govore u prilog kritične uloge aktivacije EGFR potrebne za aktiviranje ERK1/2 kinaze [9, 11-13], dok postoje i literaturni podaci koji ukazuju na aktivaciju ERK1/2 nezavisno od aktivacije EGFR [8, 11]. Postavlja se pitanje: da li je aktivacija EGFR receptora neophodna u proliferaciji VSMC pod delovanjem trombina?

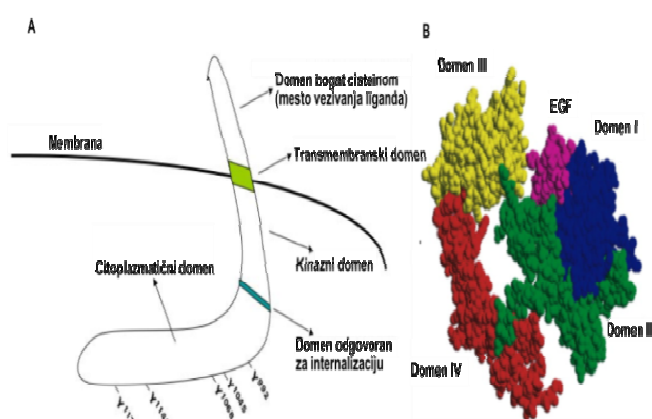
Cepanje EGFR liganada vrše adamalinske metaloproteinaze (ADAM, engl. "A Disintegrin And Metalloproteinase") i matriksne metaloproteinaze (MMP, engl. "Matrix Metalloproteinase"). Transaktivacija EGFR kao posledica dejstva nekih GPCR agonista, bila je i još uvek je aktuelna tema u istraživanju ćelijskih signalnih puteva [14]. U literaturi postoje brojni podaci o efektima angiotenzina II (ANG II), transformišućeg faktora rasta alfa (TGF- $\alpha$ ), lizofosfatidne kiseline (LPA), fenilefrina, endotelina-1 (ET-1), kao ćelijskim aktivatorima koji dovode do cepanja EGFR liganada aktivacijom različitih ADAM

molekula i sledstvene transaktivacije EGFR i ćelijske proliferacije, ali ne i podaci o učešću ADAM u ostvarivanju efekata trombina u proliferaciji VSMC [15]. Prvi literaturni podatak, prema našim saznanjima, koji ukazuje na ADAM metaloproteinaznu aktivnost vezanu za transaktivaciju EGFR i proliferaciju bilo koje ćelijske linije uključujući i VSMC, pod delovanjem trombina, je iz naše studije (Smiljanić i sar. 2011), u okviru koje je istaknuta uloga ADAM 12 kao odgovorne molekulske makazice ("shedase") [15].

S druge strane, iako HB-EGF i matriksna metaloproteinaza 2 (MMP-2) u VSMC čine sastavni deo transaktivacione kaskade EGFR, koja vodi migraciji ovih ćelija pod uticajem trombina, još uvek nema potpunog odgovora na pitanje: da li i na koji način MMP-2 ima efekta na proliferaciju VSMC pod delovanjem trombina, imajući u vidu kontroverzne literaturne podatke o uticaju MMP na proliferaciju VSMC [14-18]?

### EGFR i kaskada transaktivacije EGFR

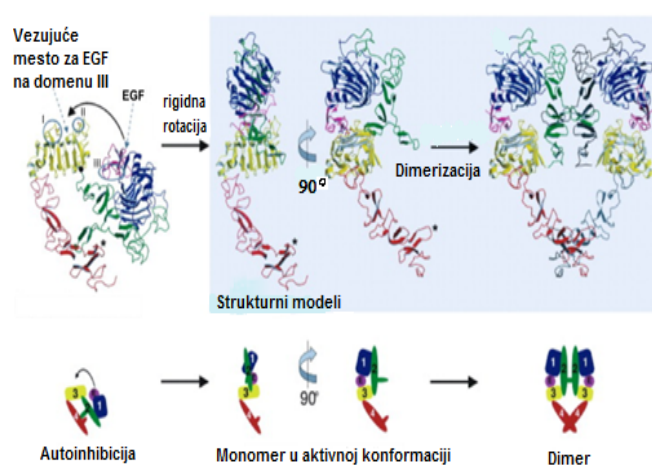
EGFR je jedan od četiri visoko srodna člana ErbB familije RTK [19]. Genski simbol, ErbB, potiče od imena viralnog onkogeno sa kojima su ovi receptori homolozi (engl. "Erythroblastic Leukemia Viral Oncogene"). U fiziološkim uslovima za EGFR vezuju se sledeći članovi familije epidermalnih faktora rasta: epidermalni faktor rasta (EGF, engl. "Epidermal Growth Factor"), TGF- $\alpha$ , HB-EGF, amfiredulin, epiregulin, betacelulin i epigen [20, 21]. Poremećaj u mehanizmu ErbB signalizacije kod ljudi je povezan sa razvojem neurodegenerativnih bolesti, poput multiple skleroze i Alchajmerove bolesti [22], a njegova povišena ekspresija dokumentovana je u više vrsta tumora [23-25].



Slika 1. (A) Šematski prikaz celovite strukture monomernog neaktivnog molekula EGFR. (B) Trodimenzionalni model ektodomena EGFR za koji je vezan EGF. Preuzeto iz doktorske disertacije: Uticaj trombina na regulaciju proliferacije glatkih mišićnih ćelija aorte pacova. Smiljanić, 2012. [26]

EGFR je jednonlačani transmembranski glikoprotein od 170 kDa i 1186 aminokiselina, sa mnoštvom N-glikozilovanih oligosaharidnih komponenti (približno 40 kDa) (Slika 1). Sastoji se od ekstracelularnog dela koji ima četiri domena (I i III odgovorni za specifičnost receptora ka ligandu, a II i IV su bogati cisteinom) (Slika 1), transmembranskog alfa heliksa i citoplazmatskog dela koji sadrži kinazni domen [20].

Transdukcija hormonskog signala započinje kada se odgovarajući ligand tj., hormon veže za vanćelijski deo EGFR, što vodi ka dimerizaciji, odnosno rearanžmanu monomera u već postojećem dimeru [27-29]. U aktivnom dimeru domeni dve tirozinske kinaze su orijentisani da dovedu do uzajamne fosforilacije i aktivacije (Slika 2) [30].



Slika 2. Šematski prikaz vezivanja EGF za EGFR receptor. Vezivanje EGF dovodi do konformacionih promena i dimerizacije receptora što rezultuje u aktivaciji tirozin kinaznih domena EGFR dimera. Preuzeto i modifikovano iz članka: *EGF Activates Its Receptor by Removing Interactions that Autoinhibit Ectodomain Dimerization*, *J Molecular Cell* [30].

Proces koji još uvek privlači veliku pažnju naučne javnosti je upravo transaktivacija EGFR odnosno posredna aktivacija EGFR preko aktivacije GPCR. Prvi korak GPCR indukovane transaktivacije EGFR, poznate još i kao „trostruko prolazeća membranska kaskada” (engl. “triple membrane passing cascade”), je direktna uključenost sekundarnih glasnika i/ili signalnih puteva pod delovanjem sekundarnih glasnika kao što je povećanje intracelularnog nivoa  $Ca^{2+}$  [31, 32], aktivacije PKC [7, 9, 15, 33] ili proizvodnje ROS [33]. Drugi korak predstavlja uključenje ne-receptorskih tirozin kinaza, kao što su c-Src i prolinom bogate tirozin kinaze Pyk2 [8, 34, 35]. Poslednji u nizu, treći događaj, je proteolitičko cepanje EGFR liganda (engl. “ligand shedding”) od strane aktivirane MP [10, 32] koji se vezuje za EGFR i na taj način ga aktivira.

Mnoge studije su ukazale da aktivacija EGFR vodi širokom spektru bioloških odgovora, uključujući proliferaciju i inflamaciju [20, 36, 37]. EGFR su identifikovani u humanim aterosklerotskim plakovima imunocitoheimijskim putem [38]. U kulturi VSMC poreklom iz aorte pacova pokazano je učešće EGFR u ćelijskoj proliferaciji i DNK sintezi [39, 40]. Centralna uloga EGFR u proliferaciji VSMC dokumentovana je u brojnim studijama, sa mnogim faktorima rasta uključujući i trombin.

Međutim, još uvek je nedovoljno rasvetljena veza aktivacije EGFR i proliferacije VSMC. Većina dosadašnjih naučnih radova ukazuje da bez aktivacije EGFR ne dolazi ni do proliferacije VSMC [9, 41]. Međutim, ima i radova koji ukazuju da je aktivacija ovog receptora važna, ali ne i neophodna za proces proliferacije VSMC [15, 42]. Potrebna su dodatna istraživanja kako bi se razrešila ova dilema, imajući u vidu i različitu biologiju samog EGFR receptora u fenotipskim modulacijama VSMC [43]. Osim toga, potrebno je napraviti distinkciju pojmova aktivacija EGFR i transaktivacija EGFR. Prvi događaj je izolovan i direktan, ali je takođe i sadržan u okviru pojma «transaktivacija EGFR». S druge strane, transaktivacija podrazumeva sve gore navedene korake, ali i dalju divergenciju tih pomenutih signala.

Postavlja se pitanje, da li je zaista aktivacija EGFR neophodna za aktivaciju ERK1/2, kao i za proliferaciju VSMC pod delovanjem trombina? Brojne studije ukazuju da bez aktivacije EGFR ne dolazi ni do aktivacije ERK1/2 kao ni do proliferacije VSMC [9, 10, 41, 44]. Bobe i sar. su 2003. godine, u uslovima smanjenog intracelularnog  $Ca^{2+}$  identifikovali EGFR nezavisni put aktivacije ERK1/2, pri čemu nisu eksperimentalno potvrdili, da li u takvim uslovima dolazi i do proliferacije VSMC. Ova potvrda bi bila relevantna i bitna kod pacijenata sa hipertenzijom koji su na terapiji sa blokatorima  $Ca^{2+}$  kanala. Zbog nedostatka naučne potvrđenosti, do sada se uglavnom prelazilo olako preko ovih, za sada, usamljenih studija [8] koje su u VSMC ukazivale na postojanje 2 puta aktivacije ERK1/2: zavisnog i nezavisnog od aktivacije EGFR. Druge istraživačke grupe su, u svojim objavljenim rezultatima, ukazivale na neophodnost EGFR aktivacije u proliferaciji VSMC, pri čemu su rezultate Bobe i sar. iz 2003. godine uglavnom objašnjavali „razlikama u eksperimentalnim uslovima” [9], ne ostavljajući mogućnost postojanja „baj-pas” signala za aktivaciju ERK1/2 u VSMC [8, 15, 45]. Moguće je da je signal koji premošćuje EGFR i univerzalnije prirode, tj., nije ograničen samo na VSMC. Takođe, „baj-pas” signal funkcioniše kako u fiziološkim uslovima, tako i u uslovima smanjenog intracelularnog  $Ca^{2+}$ , koji su omogućili da EGFR nezavisan put ERK1/2 aktivacije bude odmaskiran. To ne znači da on ne postoji u uslovima homeostaze  $Ca^{2+}$ , samo je mimikriran, obzirom na vodeću ulogu EGFR u

aktivaciji ERK1/2 i proliferaciji VSMC. Rezultati naših eksperimenata (Smiljanić i sar. 2012.), sa parcijalnom inhibicijom proliferacije VSMC, kao i aktivacije ERK1/2 stimulirane trombinom, pri potpunom farmakološkom isključenju EGFR receptora sa ireverzibilnim PD 169540 inhibitorom, ukazuju na postojanje „baj-pas” signala aktivacije ERK1/2 kaskade, kao i proliferacije VSMC pod delovanjem trombina, čiji je izvor uzvodno od EGFR [26]. Na osnovu naših rezultata, mi pretpostavljamo da aktivacija EGFR u okviru njegove transaktivacije inicirane trombinom nije neophodna za dalje provođenje proliferativnog odgovora u VSMC, što svakako predstavlja novootkriven koncept deobe VSMC pod delovanjem trombina.

### ***Uloga HB-EGF u aktivaciji EGFR i proliferaciji VSMC***

HB-EGF je član familije EGF faktora rasta i sintetise se kao transmembranski prekursor od 208 aminokiselina (pro-HB-EGF), poznat i kao receptor za toksin difterije, koji nakon proteolitičkog cepanja od strane metaloproteinaze, postaje zreo, solubilno EGFR ligand od 86 aminokiselina [10, 46]. Od njegovog pronalaska 1991. godine, smatran je važnim činiocem u nastanku ateroskleroze, hipertrofije miokarda, zarašćivanju rana o čemu svedoče brojne studije [47-49]. HB-EGF je eksprimiran u VSMC, makrofazima, T limfocitima i endotelnim ćelijama, a pokazao se i kao faktor proliferacije glatkih mišićnih ćelija i fibroblasta [46, 50-52].

Pod dejstvom heparina blokira se HB-EGF zavisna transaktivacija EGFR i sledstvena migracija VSMC pacova i babuna pod delovanjem trombina [12]. HB-EGF je, takođe, aktiviran (otcepljen) kao odgovor na aktivaciju PKC sa forbol estrima (npr., TPA) [53]. Smatra se da je PKC $\delta$  kao enzim, odgovoran za stimulaciju HB-EGF cepanja, izazvan TPA aktivacijom [54].

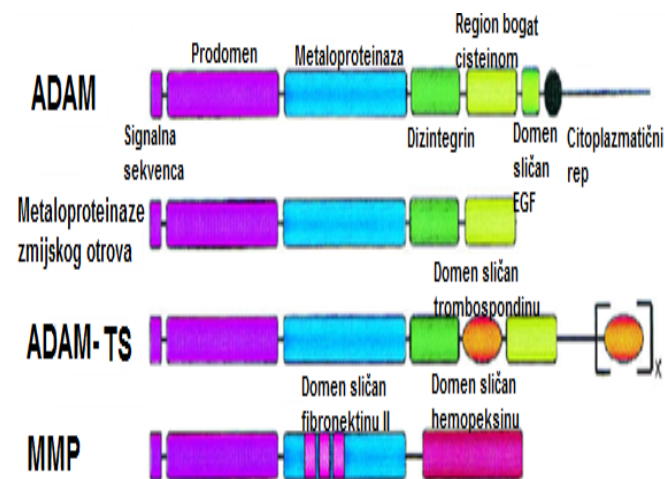
Dominantni ligand, detektovan u kulturi VSMC kao ligand aktivacije EGFR i proliferacije VSMC stimulacijom sa GPCR agonistima, jeste HB-EGF [10, 44]. Brojni literaturni podaci govore u prilog uloge HB-EGF u proliferaciji VSMC, aktivacijom EGFR sa raznim GPCR agonistima uključujući trombin, ANG II, ET-1, ATP, itd. [20, 41, 49, 55]. HB-EGF-indukovana proliferacija uključuje aktivnost ERK1/2 kinaze i PI3/Akt kinaze, ali ne i p38 kinaze [41]. Postoje radovi o učešću HB-EGF u transaktivaciji EGFR i proliferaciji VSMC pod delovanjem trombina [9, 12], ali se do skora nije znalo koje su MP uljučene u proteolitičko cepanje HB-EGF [15, 17]. Naši najnoviji eksperimentalni rezultati potvrđuju ulogu endogeno nastajućeg HB-EGF, koji pod delovanjem trombina, biva oslobođen proteolitičkim cepanjem od strane metaloproteinaza ADAM 12 i MMP-2 i aktivira EGFR receptor u primarnoj kulturi VSMC pacova [26].

Njegova blokada sa anti-HB-EGF neutrališućim antitelom, dovodi do potpune inhibicije aktivacije EGFR i delimičnih inhibicija aktivacije ERK1/2 i proliferacije VSMC stimuliranih trombinom [26].

### ***Uloga MMP u transaktivaciji EGFR i proliferaciji VSMC***

MMP i ADAM pripadaju „metzincinskoj” grupi superfamilije cink zavisnih metaloproteinaza koju čini pet grupa podeljenih na osnovu primarne strukture katalitičkog mesta [56]. „Metzincinska” grupa kojoj pripadaju MMP i ADAM, sadrži još dve podgrupe MP: seralizinke i astacinske MP [57].

MMP su poznate i kao kolagenaze, uglavnom su solubilne i nalaze se u blizini ili na površini ćelija, mada postoje i transmembranske forme MMP (Slika 3). Ovi enzimi su odgovorni za degradaciju i remodeliranje ekstracelularnog matriksa (ECM), igraju važnu ulogu u razviću, zarastanju rana i nastanku oboljenja, kao što su ateroskleroza, artritis i kancer [18, 58].



*Slika 3. Topograski prikaz domenskih struktura ADAM i MMP. Prikazana MMP odgovara potklasi želatinaza; druge MMP potklase nemaju hemopeksinu sličnu sekvencu i/ili fibronektinu II sličnu sekvencu. ADAM sa trombospondinu sličnim domenima (ADAM-TS) sadrži i varijabilni broj domena sličnih trombospondinu. Preuzeto i modifikovano iz članka: The ADAMs family of metalloproteases: multidomain proteins with multiple functions, J Genes Dev [59].*

VSMC proizvode čitav spektar solubilnih i membranskih MMP (MMP-1,-2,-3,9,11,13, i membranska MT1-MMP), neke konstitutivno, a neke kao odgovor na istezanje, povredu ili delovanje faktora rasta [18, 60]. Analiza humanih aterosklerotskih lezija i naprednih plakova pokazala je visoku ekspresiju MMP, posebno želatinaza MMP-2 i MMP-9, prevashodno od strane VSMC [61, 62].

MMP regulišu migraciju, proliferaciju i smrt VSMC degradacijom komponenti ECM i drugih

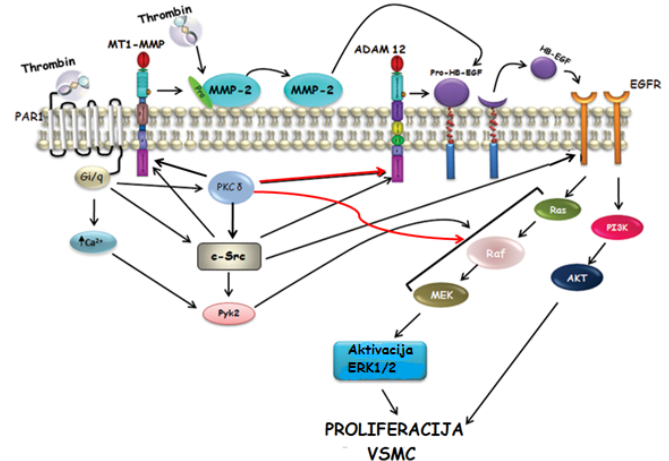
supstrata [18]. One su odgovorne za promenu (engl. "switch") fenotipa VSMC iz tihog, mirnog u migratorni [63]. Jasno je da MMP posreduju u migraciji VSMC u in vivo i in vitro uslovima, dok je uloga MMP u proliferaciji VSMC još uvek nedovoljno razjašnjena [18]. Inhibicija MMP blokirala je proliferaciju glatkih mišićnih ćelija traheja u odgovoru na serum, trombin i PDGF [64], proliferaciju VSMC iz komadića tkiva aorte (tzv. eksplanti aorte) [65], VSMC proliferaciju in vivo [66, 67], MMP-2-posredovanu VSMC migraciju nakon kateterizacije balonom [65, 68, 69] i nastanak neointimalnog zadebljanja [68]. Većina radova pokazala je inhibiciju proliferacije VSMC sa sintetičkim MMP inhibitorima u in vitro uslovima [70-72], ali neki i nisu [67].

Naši eksperimentalni rezultati (Smiljanić i sar 2011, 2012) ukazuju da trombin dovodi do proliferacije primarnih kultura VSMC, dvojakim mehanizmom: aktivacijom svojih PAR receptora (intaćelijski impuls signala) i direktnim proteolitičkim cepanjem molekula pro-MMP-2 izlučenog na površinu ćelijske membrane (spoljni, vanćelijski impuls signala) [26]. Ovim se objašnjava učešće MMP-2 kako u transaktivaciji EGFR i proliferaciji VSMC preko aktivacije ERK1/2 kinaze, tako i učešće MMP-2 u proliferativnom procesu preko drugih permisivnih interakcija vezanih za remodelovanje ekstracelularnog matriksa. Dalja istraživanja u ovom pravcu su potrebna kako bi se utvrdilo eventualno učešće drugih matriksnih metaloproteinaza (kolagenaza) u transaktivaciji EGFR i proliferaciji VSMC. Nova saznanja, u ovom smislu, svakako bi doprinela odgovoru na pitanje, koja klasa metaloproteinaza ima vodeću ulogu, u odsecanju membranskih prekursora faktora rasta i sledstvenoj transaktivaciji EGFR.

Interakcija trombina sa heparan-sulfat proteoglikanima vodi takvim alosternim promenama katalitičkog mesta, koje menjaju njegovu specifičnost ka supstratu čineći ga potentnim enzimom degradacije vanćelijskih komponenata [16]. Posebno se naglašava njena sposobnost aktivacije pro-MMP-2, nezavisne od aktivacije preko MT1-MMP [16]. S druge strane, u VSMC, MMP-2 može biti aktivirana i od strane MT1-MMP [18], koju aktiviraju c-Src u endotelnim i tumorskim ćelijama [73]. Svi rezultati, uključujući i naša istraživanja [15, 26], omogućili su nam da elaboriramo i doradimo signalizacionu šemu ekstra- i intracelularnih događaja kaskade transaktivacije EGFR, kao i nizvodnih signala u proliferaciji VSMC stimulisanoj trombinom (Slika 4).

Naš predloženi model je sledeći: postojanje spoljno-membranskog delovanja trombina koji vodi aktivaciji pro-MMP-2, nezavisnoj od MT1-MMP [16] (Slika 4) i intracelularnog delovanja preko PAR-1 receptora, sa c-Src i PKC $\delta$  posredovanom fosforilacijom i aktivacijom MT1-MMP koja, takođe, doprinosi daljoj aktivaciji pro-MMP-2 [74]. Aktivirani

MMP-2 cepa pro-HB-EGF; oslobođeni HB-EGF vezuje se za EGFR receptor i aktivira ga (Slika 4).



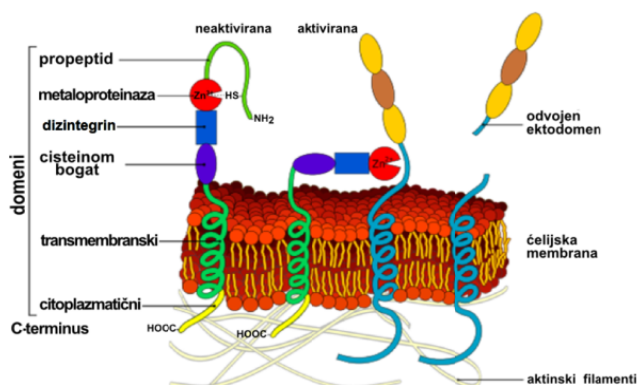
Slika 4. Prikaz signalnih puteva uključenih u efekte trombina na proliferaciju VSMC. Legenda: PAR 1: proteolitički aktiviran receptor 1; Gi/q: subjedinica i i q receptora spregnutog sa proteinom G; EGFR: receptor za epidermalni faktor rasta; pro-HB-EGF: transmembranski prekursor faktora rasta sličnog epidermalnom faktoru rasta koji vezuje heparin; HB-EGF: faktor rasta sličan epidermalnom faktoru rasta koji vezuje heparin; MMP-2: matriksna metaloproteinaza-2; MT1-MMP: transmembranska matriksna metaloproteinaza 1; ADAM 12: adamalinska metaloproteinaza 12; Ca<sup>2+</sup>: kalcijum; PKC $\delta$ : protein kinaza C delta; Pyk2: ne-receptorska tirozin kinaza, bogata prolinom i zavisna od kalcijuma; c-Src: konstitutivna-Src tirozinska kinaza; PI3-K: fosfatidilinozitol-3 -kinaza; AKT: protein kinaza B; Ras: mali GTP-vezujući protein (mala GTP-aza); Raf-Raf specifična serin/treonin protein kinaza; MEK: mitogenom aktivirana kinaza koja reguliše ERK1/2 kinazu; ERK1/2: ekstracelularnim signalima regulisane kinaze 1 i 2. Preuzeto i modifikovano iz doktorske disertacije: Uticaj trombina na regulaciju proliferacije glatkih mišićnih ćelija aorte pacova. Smiljanić, 2012. [26].

c-Src tirozin kinaza ima važno mesto u prenosu signala od PAR-1 receptora aktiviranog trombinom do transaktivacije EGFR u nekoliko vrsta ćelija, uključujući i VSMC [8, 75]. Kao što se može videti sa Slike 4. c-Src fosforiliše citoplazmatski deo MT1-MMP, koji potom biva aktiviran i proteolitički cepa pro-MMP-2 [76, 77]. Obzirom da c-Src nije membranski solubilna i deluje unutar ćelije, ona ne može direktno da fosforiliše MMP-2 i aktivira ga, kao što su to u svom modelu predložili Huang i sar. (2009), već to radi fosforilisani MT1-MMP (Slika 4). MT1-MMP je fiziološki aktivator pro-MMP-2 [78]. Osim toga, c-Src i direktno transaktivira EGFR receptor na Tyr845 [75, 79]. Luttrell i sar. (1997) pokazali su da G $\beta\gamma$  subjedinica receptora spregnutog sa Gi proteinom

aktivira c-Src koja potom dovodi do fosforilacije EGFR receptora [34].

### ***Uloga ADAM u transaktivaciji EGFR i proliferaciji VSMC***

ADAM su transmembranske metaloproteinaze koje pripadaju adamalizinskoj grupi i razlikuju se od MMP po tome što imaju vanćelijski deo sa dizintegrinskim domenom i citoplazmatski domen koji može da stupa u interakciju sa unutarćelijskim proteinima (Slika 5.). Adamalizinaska grupa takođe sadrži i klasu III metaloproteinaza zmijskog otrova i podgrupu ADAM-TS, koja se od ADAM familije razlikuje po tome što sadrži trombospondinu slične domene [59] (Slike 4 i 5).



Slika 5. Šematski prikaz strukture ADAM molekula. Preuzeto i modifikovano sa sajta: [http://commons.wikimedia.org/wiki/File:Shedding\\_01.svg](http://commons.wikimedia.org/wiki/File:Shedding_01.svg) [80].

ADAM su uključene u važne procese kao što su: proteoliza membranskih prekursora faktora rasta i citokina, degradacija ECM i odsecanje drugih membranskih proteina uključujući i obradu priona [81]. Pored ADAM i neke MMP mogu otcepiti membranske proteine i proizvoditi ligande za aktivaciju EGFR [59]. ADAM, kao i MMP, osetljive su na endogene, tkivne inhibitore metaloproteinaza (TIMP, engl. "Tissue Inhibitor of Metaloproteinases") [59].

Do sada je opisano 35 ADAM molekula iz raznih vrsta. Kod čoveka opisano je 19 od kojih su ADAM-9, -10, -12, -15, -17 i -19 uključene u transaktivaciju EGFR u VSMC stimulacijom ograničenog broja GPCR agonista [14].

Malo je literaturnih podataka o ulozi članova ADAM familije u proliferaciji VSMC. U in vitro uslovima pokazano je da ADAM-17 transaktivira EGFR i dovodi do proliferacije VSMC u kulturi [55]. Takođe, i u in vivo uslovima, ADAM 17 dovodi do aktivacije EGFR i subsekventne neointimalne hiperplazije nakon povrede krvnog suda delovanjem ANG II [82].

ADAM 12 učestvuje u proliferaciji hondrocita proteolitičkim cepanjem proteina 5 koji vezuje insulinu

sličan faktor rasta (IGFBP5) u osteoartritičnoj hrskavici [83]. Visoko pojačana selektivna ekspresija ADAM 12 u ćelijama glioblastoma povezuje se sa ćelijskom proliferacijom i proteolitičkim cepanjem HB-EGF [84]. Asakura i sar. (2002) sugerisali su da je ADAM-12 učesnik HB-EGF otcepljivanja (engl. "shedding") i hipertrofije miokarda pod delovanjem fenilefrina, ANG II i ET-1 [15]. Međutim, do skora nije bilo nijednog objavljenog rada koji se odnosi na ulogu ADAM 12 u proliferaciji VSMC. Na identitet i učešće ADAM molekula u transaktivaciji EGFR i proliferaciji VSMC, odsecanjem HB-EGF, pod delovanjem trombina, ukazala je naša grupa [15].

Naša pretpostavka je da ADAM 12 proteolitički cepa HB-EGF, što sledstveno aktivira EGFR receptor [15]. Za aktivaciju ADAM 12, odgovorna je PKC $\delta$  i c-Src, koje direktno interaguju sa citoplazmatskim delom ADAM 12, kao što su pokazali [85] za ADAM 9 i PKC $\delta$  i/ili direktnom interakcijom sa c-Src [74, 86] (Slika 4). Ova interakcija uključuje region bogat prolinom u citoplazmatskom delu ADAM 12 i SH3 domen Src kinaze [87]. Naš predloženi model zahteva dalja istraživanja kako bi se priroda ove interakcije u VSMC i ekperimentalno potvrdila.

### **Zaključak**

Nishodni signali u trombinom stimulisanoj proliferaciji preko ERK1/2 i PI3K/Akt puteva zavisi su od signala transaktivacione kaskade EGFR, s tim da sama aktivacija EGFR nije neophodna za dalje provođenje signala (aktivaciju ERK1/2 i proliferaciju VSMC), što je i jedan od bitnih zaključaka naših istraživanja. Izolovana aktivacija EGFR, u okviru njegove transaktivacione kaskade pod delovanjem trombina, nije neophodna za dalje provođenje signala aktivacije ERK1/2 i proliferacije VSMC. To govori u prilog postojanju EGFR-zavisnih puteva aktivacije ERK1/2 i proliferacije VSMC, kao i EGFR-nezavisnih puteva aktivacije ERK1/2 i proliferacije VSMC stimulisanih trombinom. Za „baj pas” signala od transaktivacione kaskade EGFR, pa do aktivacije ERK1/2, u našem modelu predlažemo PKC $\delta$ , koja direktno aktivira MAPK kaskadu, ili preko mehanizma koji uključuje  $\beta$ -arestine. Inhibicija svih izoformi PKC vodi znatnom smanjenju aktivnosti ERK1/2 posredovanim  $\beta$ 1-arestin-protein G receptorskim kompleksima (Slika 4). U zaključku, ADAM 12, MMP-2 i PKC $\delta$  uključeni su u trombinom stimulisanoj proliferaciji VSMC. Saznanje o učešću nekog od ADAM molekula u proliferaciji glatkih mišićnih ćelija krvnih sudova pod delovanjem trombina od izuzetne je važnosti za bolje razumevanje uloge trombina u kardiovaskularnoj biologiji i medicini. Pošto je za ADAM 12 potvrđeno da ima ulogu medijatora nastanka hipertrofije VSMC, on, zajedno sa MMP-2 može biti prepoznat kao ključna „meta” u novim terapijskim intervencijama, kojima bi se smanjilo

ireverzibilno oštećenje tkiva povezano sa aterosklerozom i hipertenzijom. Regulisana sinteza PKC $\delta$ , MMP-2 i ADAM 12 in vivo, mogla bi u

budućoj terapijskoj intervenciji, doprineti smanjenju patološke proliferacije VSMC.

### Literatura

1. Beckman, J.A., Creager, M.A., and Libby, P., Diabetes and atherosclerosis: epidemiology, pathophysiology, and management. *JAMA*, 2002. 287(19): p. 2570-81.
2. Mnjoyan, Z.H., Doan, D., Brandon, J.L., Felix, K., Sitter, C.L., Rege, A.A., Brock, T.A., and Fujise, K., The critical role of the intrinsic VSMC proliferation and death programs in injury-induced neointimal hyperplasia. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2008. 294(5): p. H2276-84.
3. Hozawa, A., Folsom, A.R., Sharrett, A.R., and Chambless, L.E., Absolute and attributable risks of cardiovascular disease incidence in relation to optimal and borderline risk factors: comparison of African American with white subjects--Atherosclerosis Risk in Communities Study. *Arch Intern Med*, 2007. 167(6): p. 573-9.
4. Borissoff, J.I., Spronk, H.M., Heeneman, S., and ten Cate, H., Is thrombin a key player in the 'coagulation-atherogenesis' maze? *Cardiovasc Res*, 2009. 82(3): p. 392-403.
5. Fager, G., Thrombin and proliferation of vascular smooth muscle cells. *Circ Res*, 1995. 77(4): p. 645-50.
6. Gutkind, J.S., Cell growth control by G protein-coupled receptors: from signal transduction to signal integration. *Oncogene*, 1998. 17(11 Reviews): p. 1331-42.
7. Isenovic, E.R., Kedees, M.H., Haidara, M.A., Trpkovic, A., Mikhailidis, D.P., and Marche, P., Involvement of ERK1/2 kinase in insulin-and thrombin-stimulated vascular smooth muscle cell proliferation. *Angiology*, 2010. 61(4): p. 357-64.
8. Bobe, R., Yin, X., Roussanne, M.C., Stepien, O., Polidano, E., Faverdin, C., and Marche, P., Evidence for ERK1/2 activation by thrombin that is independent of EGFR transactivation. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2003. 285(2): p. H745-54.
9. Hsieh, H.L., Tung, W.H., Wu, C.Y., Wang, H.H., Lin, C.C., Wang, T.S., and Yang, C.M., Thrombin induces EGF receptor expression and cell proliferation via a PKC( $\delta$ )/c-Src-dependent pathway in vascular smooth muscle cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2009. 29(10): p. 1594-601.
10. Prenzel, N., Zwick, E., Daub, H., Leserer, M., Abraham, R., Wallasch, C., and Ullrich, A., EGF receptor transactivation by G-protein-coupled receptors requires metalloproteinase cleavage of proHB-EGF. *Nature*, 1999. 402(6764): p. 884-8.
11. Yin, X., Polidano, E., Faverdin, C., and Marche, P., Role of L-type calcium channel blocking in epidermal growth factor receptor-independent activation of extracellular signal regulated kinase 1/2. *J Hypertens*, 2005. 23(2): p. 337-50.
12. Kalmes, A., Vesti, B.R., Daum, G., Abraham, J.A., and Clowes, A.W., Heparin blockade of thrombin-induced smooth muscle cell migration involves inhibition of epidermal growth factor (EGF) receptor transactivation by heparin-binding EGF-like growth factor. *Circ Res*, 2000. 87(2): p. 92-8.
13. Hsieh, H.L., Sun, C.C., Wang, T.S., and Yang, C.M., PKC- $\delta$ /c-Src-mediated EGF receptor transactivation regulates thrombin-induced COX-2 expression and PGE(2) production in rat vascular smooth muscle cells. *Biochim Biophys Acta*, 2008. 1783(9): p. 1563-75.
14. Ohtsu, H., Dempsey, P.J., and Eguchi, S., ADAMs as mediators of EGF receptor transactivation by G protein-coupled receptors. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2006. 291(1): p. C1-10.
15. Smiljanic, K., Dobutovic, B., Obradovic, M., Nikolic, D., Marche, P., and Isenovic, E.R., Involvement of the ADAM 12 in thrombin-induced rat's VSMCs proliferation. *Curr Med Chem*, 2011. 18(22): p. 3382-6.
16. Koo, B.H., Han, J.H., Yeom, Y.I., and Kim, D.S., Thrombin-dependent MMP-2 activity is regulated by heparan sulfate. *J Biol Chem*, 2010. 285(53): p. 41270-9.
17. Huang, Y.L., Shi, G.Y., Lee, H., Jiang, M.J., Huang, B.M., Wu, H.L., and Yang, H.Y., Thrombin induces nestin expression via the transactivation of EGFR signalings in rat vascular smooth muscle cells. *Cell Signal*, 2009. 21(6): p. 954-68.
18. Newby, A.C., Matrix metalloproteinases regulate migration, proliferation, and death of vascular smooth muscle cells by degrading matrix and non-matrix substrates. *Cardiovasc Res*, 2006. 69(3): p. 614-24.
19. Yarden, Y. and Sliwkowski, M.X., Untangling the ErbB signalling network. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2001. 2(2): p. 127-37.
20. Dreux, A.C., Lamb, D.J., Modjtahedi, H., and Ferns, G.A., The epidermal growth factor receptors and their family of ligands: their putative role in atherogenesis. *Atherosclerosis*, 2006. 186(1): p. 38-53.



21. Olayioye, M.A., Neve, R.M., Lane, H.A., and Hynes, N.E., The ErbB signaling network: receptor heterodimerization in development and cancer. *EMBO J*, 2000. 19(13): p. 3159-67.
22. Bublil, E.M. and Yarden, Y., The EGF receptor family: spearheading a merger of signaling and therapeutics. *Current Opinion in Cell Biology*, 2007. 19(2): p. 124-34.
23. Libermann, T.A., Nusbaum, H.R., Razon, N., Kris, R., Lax, I., Soreq, H., Whittle, N., Waterfield, M.D., Ullrich, A., and Schlessinger, J., Amplification, enhanced expression and possible rearrangement of EGF receptor gene in primary human brain tumours of glial origin. *Nature*, 1985. 313(5998): p. 144-7.
24. Kohler, M., Janz, I., Wintzer, H.O., Wagner, E., and Bauknecht, T., The expression of EGF receptors, EGF-like factors and c-myc in ovarian and cervical carcinomas and their potential clinical significance. *Anticancer Res*, 1989. 9(6): p. 1537-47.
25. Yoshida, K., Tosaka, A., Takeuchi, S., and Kobayashi, N., Epidermal growth factor receptor content in human renal cell carcinomas. *Cancer*, 1994. 73(7): p. 1913-8.
26. Smiljanic, K., Uticaj trombina na regulaciju proliferacije glatkih misicnih celija aorte pacova., in *Bioloski fakultet. Doktorska disertacija*, 2012, Univerzitet u Beogradu: Beograd.
27. Jiang, G. and Hunter, T., Receptor signaling: when dimerization is not enough. *Curr Biol*, 1999. 9(15): p. R568-71.
28. Schlessinger, J., Plotnikov, A.N., Ibrahimi, O.A., Eliseenkova, A.V., Yeh, B.K., Yayon, A., Linhardt, R.J., and Mohammadi, M., Crystal structure of a ternary FGF-FGFR-heparin complex reveals a dual role for heparin in FGFR binding and dimerization. *Mol Cell*, 2000. 6(3): p. 743-50.
29. Adak, S., Yang, K.S., Macdonald-Obermann, J., and Pike, L.J., The membrane-proximal intracellular domain of the epidermal growth factor receptor underlies negative cooperativity in ligand binding. *J Biol Chem*, 2011. 286(52): p. 45146-55.
30. Ferguson, K.M., Berger, M.B., Mendrola, J.M., Cho, H.-S., Leahy, D.J., and Lemmon, M.A., EGF Activates Its Receptor by Removing Interactions that Autoinhibit Ectodomain Dimerization. *Molecular Cell*, 2003. 11(2): p. 507-17.
31. Zwick, E., Daub, H., Aoki, N., Yamaguchi-Aoki, Y., Tinhofer, I., Maly, K., and Ullrich, A., Critical role of calcium-dependent epidermal growth factor receptor transactivation in PC12 cell membrane depolarization and bradykinin signaling. *J Biol Chem*, 1997. 272(40): p. 24767-70.
32. Eguchi, S., Dempsey, P.J., Frank, G.D., Motley, E.D., and Inagami, T., Activation of MAPKs by angiotensin II in vascular smooth muscle cells. Metalloprotease-dependent EGF receptor activation is required for activation of ERK and p38 MAPK but not for JNK. *J Biol Chem*, 2001. 276(11): p. 7957-62.
33. Frank, G.D., Mifune, M., Inagami, T., Ohba, M., Sasaki, T., Higashiyama, S., Dempsey, P.J., and Eguchi, S., Distinct mechanisms of receptor and nonreceptor tyrosine kinase activation by reactive oxygen species in vascular smooth muscle cells: role of metalloprotease and protein kinase C-delta. *Mol Cell Biol*, 2003. 23(5): p. 1581-9.
34. Luttrell, L.M., Della Rocca, G.J., van Biesen, T., Luttrell, D.K., and Lefkowitz, R.J., Gbetagamma subunits mediate Src-dependent phosphorylation of the epidermal growth factor receptor. A scaffold for G protein-coupled receptor-mediated Ras activation. *J Biol Chem*, 1997. 272(7): p. 4637-44.
35. Andreev, J., Galisteo, M.L., Kranenburg, O., Logan, S.K., Chiu, E.S., Okigaki, M., Cary, L.A., Moolenaar, W.H., and Schlessinger, J., Src and Pyk2 mediate G-protein-coupled receptor activation of epidermal growth factor receptor (EGFR) but are not required for coupling to the mitogen-activated protein (MAP) kinase signaling cascade. *J Biol Chem*, 2001. 276(23): p. 20130-5.
36. Wahl, M.I. and Carpenter, G., Role of growth factors and their receptors in the control of normal cell proliferation and cancer. *Clin Physiol Biochem*, 1987. 5(3-4): p. 130-9.
37. Woodworth, C.D., Michael, E., Marker, D., Allen, S., Smith, L., and Nees, M., Inhibition of the epidermal growth factor receptor increases expression of genes that stimulate inflammation, apoptosis, and cell attachment. *Mol Cancer Ther*, 2005. 4(4): p. 650-8.
38. Tamura, R., Miyagawa, J., Nishida, M., Kihara, S., Sasada, R., Igarashi, K., Nakata, A., Yamamori, K., Kameda-Takemura, K., Yamashita, S., and Matsuzawa, Y., Immunohistochemical localization of Betacellulin, a member of epidermal growth factor family, in atherosclerotic plaques of human aorta. *Atherosclerosis*, 2001. 155(2): p. 413-23.
39. Nanney, L.B., Stoscheck, C.M., and King, L.E., Characterization of binding and receptors for epidermal growth factor in smooth muscle. *Cell Tissue Res*, 1988. 254(1): p. 125-32.
40. Tomita, M., Hirata, Y., Uchihashi, M., and Fujita, T., Characterization of epidermal growth factor receptors in cultured vascular smooth muscle cells of rat aorta. *Endocrinol Jpn*, 1986. 33(2): p. 177-84.

41. Reynolds, C.M., Eguchi, S., Frank, G.D., and Motley, E.D., Signaling mechanisms of heparin-binding epidermal growth factor-like growth factor in vascular smooth muscle cells. *Hypertension*, 2002. 39(2 Pt 2): p. 525-9.
42. Schreier, B., Döhler, M., Rabe, S., Schneider, B., Schwerdt, G., Ruhs, S., Sibilia, M., Gotthardt, M., Gekle, M., and Grossmann, C., Consequences of Epidermal Growth Factor Receptor (ErbB1) Loss for Vascular Smooth Muscle Cells From Mice With Targeted Deletion of ErbB1. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 2011. 31(7): p. 1643-52.
43. Ivanov, A., Gerzanich, V., Ivanova, S., DenHaese, R., Tsybalyuk, O., and Simard, J.M., Adenylate cyclase 5 and KCa1.1 channel are required for EGFR up-regulation of PCNA in native contractile rat basilar artery smooth muscle. *The Journal of Physiology*, 2006. 570(1): p. 73-84.
44. Kalmes, A., Daum, G., and Clowes, A.W., EGFR transactivation in the regulation of SMC function. *Ann N Y Acad Sci*, 2001. 947: p. 42-54; discussion 54-5.
45. Ginnan, R., Pfeleiderer, P.J., Pumiglia, K., and Singer, H.A., PKC-delta and CaMKII-delta 2 mediate ATP-dependent activation of ERK1/2 in vascular smooth muscle. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2004. 286(6): p. C1281-9.
46. Raab, G. and Klagsbrun, M., Heparin-binding EGF-like growth factor. *Biochim Biophys Acta*, 1997. 1333(3): p. F179-99.
47. Matsumoto, S., Kishida, K., Shimomura, I., Maeda, N., Nagaretani, H., Matsuda, M., Nishizawa, H., Kihara, S., Funahashi, T., Matsuzawa, Y., Yamada, A., Yamashita, S., Tamura, S., and Kawata, S., Increased plasma HB-EGF associated with obesity and coronary artery disease. *Biochem Biophys Res Commun*, 2002. 292(3): p. 781-6.
48. Miyagawa, J., Higashiyama, S., Kawata, S., Inui, Y., Tamura, S., Yamamoto, K., Nishida, M., Nakamura, T., Yamashita, S., Matsuzawa, Y., and et al., Localization of heparin-binding EGF-like growth factor in the smooth muscle cells and macrophages of human atherosclerotic plaques. *J Clin Invest*, 1995. 95(1): p. 404-11.
49. Asakura, M., Kitakaze, M., Takashima, S., Liao, Y., Ishikura, F., Yoshinaka, T., Ohmoto, H., Node, K., Yoshino, K., Ishiguro, H., Asanuma, H., Sanada, S., Matsumura, Y., Takeda, H., Beppu, S., Tada, M., Hori, M., and Higashiyama, S., Cardiac hypertrophy is inhibited by antagonism of ADAM12 processing of HB-EGF: metalloproteinase inhibitors as a new therapy. *Nat Med*, 2002. 8(1): p. 35-40.
50. Higashiyama, S., Abraham, J.A., Miller, J., Fiddes, J.C., and Klagsbrun, M., A heparin-binding growth factor secreted by macrophage-like cells that is related to EGF. *Science*, 1991. 251(4996): p. 936-9.
51. Dluz, S.M., Higashiyama, S., Damm, D., Abraham, J.A., and Klagsbrun, M., Heparin-binding epidermal growth factor-like growth factor expression in cultured fetal human vascular smooth muscle cells. Induction of mRNA levels and secretion of active mitogen. *J Biol Chem*, 1993. 268(24): p. 18330-4.
52. Nakano, T., Raines, E.W., Abraham, J.A., Klagsbrun, M., and Ross, R., Lysophosphatidylcholine upregulates the level of heparin-binding epidermal growth factor-like growth factor mRNA in human monocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1994. 91(3): p. 1069-73.
53. Gechtman, Z., Alonso, J.L., Raab, G., Ingber, D.E., and Klagsbrun, M., The shedding of membrane-anchored heparin-binding epidermal-like growth factor is regulated by the Raf/mitogen-activated protein kinase cascade and by cell adhesion and spreading. *J Biol Chem*, 1999. 274(40): p. 28828-35.
54. Izumi, Y., Hirata, M., Hasuwa, H., Iwamoto, R., Umata, T., Miyado, K., Tamai, Y., Kurisaki, T., Sehara-Fujisawa, A., Ohno, S., and Mekada, E., A metalloprotease-disintegrin, MDC9/meltrin-gamma/ADAM9 and PKCdelta are involved in TPA-induced ectodomain shedding of membrane-anchored heparin-binding EGF-like growth factor. *EMBO J*, 1998. 17(24): p. 7260-72.
55. Ohtsu, H., Dempsey, P.J., Frank, G.D., Brailoiu, E., Higuchi, S., Suzuki, H., Nakashima, H., Eguchi, K., and Eguchi, S., ADAM17 mediates epidermal growth factor receptor transactivation and vascular smooth muscle cell hypertrophy induced by angiotensin II. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2006. 26(9): p. e133-7.
56. Hooper, N.M., Families of zinc metalloproteases. *FEBS Lett*, 1994. 354(1): p. 1-6.
57. Stocker, W., Grams, F., Baumann, U., Reinemer, P., Gomis-Ruth, F.X., McKay, D.B., and Bode, W., The metzincins--topological and sequential relations between the astacins, adamalysins, serralysins, and matrixins (collagenases) define a superfamily of zinc-peptidases. *Protein Sci*, 1995. 4(5): p. 823-40.
58. Chang, C. and Werb, Z., The many faces of metalloproteases: cell growth, invasion, angiogenesis and metastasis. *Trends Cell Biol*, 2001. 11(11): p. S37-43.
59. Seals, D.F. and Courtneidge, S.A., The ADAMs family of metalloproteases: multidomain proteins with multiple functions. *Genes Dev*, 2003. 17(1): p. 7-30.
60. Lutgens, E., Lievens, D., Beckers, L., Donners, M., and Daemen, M., CD40 and its ligand in

- atherosclerosis. *Trends Cardiovasc Med*, 2007. 17(4): p. 118-23.
61. Galis, Z.S., Sukhova, G.K., Lark, M.W., and Libby, P., Increased expression of matrix metalloproteinases and matrix degrading activity in vulnerable regions of human atherosclerotic plaques. *J Clin Invest*, 1994. 94(6): p. 2493-503.
62. Li, Z., Li, L., Zielke, H.R., Cheng, L., Xiao, R., Crow, M.T., Stetler-Stevenson, W.G., Froehlich, J., and Lakatta, E.G., Increased expression of 72-kd type IV collagenase (MMP-2) in human aortic atherosclerotic lesions. *Am J Pathol*, 1996. 148(1): p. 121-8.
63. Risinger, G.M., Jr., Hunt, T.S., Updike, D.L., Bullen, E.C., and Howard, E.W., Matrix metalloproteinase-2 expression by vascular smooth muscle cells is mediated by both stimulatory and inhibitory signals in response to growth factors. *J Biol Chem*, 2006. 281(36): p. 25915-25.
64. Johnson, S. and Knox, A., Autocrine production of matrix metalloproteinase-2 is required for human airway smooth muscle proliferation. *Am J Physiol*, 1999. 277(6 Pt 1): p. L1109-17.
65. Bendeck, M.P., Zempo, N., Clowes, A.W., Galaray, R.E., and Reidy, M.A., Smooth muscle cell migration and matrix metalloproteinase expression after arterial injury in the rat. *Circ Res*, 1994. 75(3): p. 539-45.
66. Kenagy, R.D., Hart, C.E., Stetler-Stevenson, W.G., and Clowes, A.W., Primate smooth muscle cell migration from aortic explants is mediated by endogenous platelet-derived growth factor and basic fibroblast growth factor acting through matrix metalloproteinases 2 and 9. *Circulation*, 1997. 96(10): p. 3555-60.
67. Zempo, N., Koyama, N., Kenagy, R.D., Lea, H.J., and Clowes, A.W., Regulation of vascular smooth muscle cell migration and proliferation in vitro and in injured rat arteries by a synthetic matrix metalloproteinase inhibitor. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 1996. 16(1): p. 28-33.
68. Cheng, L., Mantile, G., Pauly, R., Nater, C., Felici, A., Monticone, R., Bilato, C., Gluzband, Y.A., Crow, M.T., Stetler-Stevenson, W., and Capogrossi, M.C., Adenovirus-mediated gene transfer of the human tissue inhibitor of metalloproteinase-2 blocks vascular smooth muscle cell invasiveness in vitro and modulates neointimal development in vivo. *Circulation*, 1998. 98(20): p. 2195-201.
69. Jenkins, G.M., Crow, M.T., Bilato, C., Gluzband, Y., Ryu, W.S., Li, Z., Stetler-Stevenson, W., Nater, C., Froehlich, J.P., Lakatta, E.G., and Cheng, L., Increased expression of membrane-type matrix metalloproteinase and preferential localization of matrix metalloproteinase-2 to the neointima of balloon-injured rat carotid arteries. *Circulation*, 1998. 97(1): p. 82-90.
70. Lovdahl, C., Thyberg, J., and Hultgardh-Nilsson, A., The synthetic metalloproteinase inhibitor batimastat suppresses injury-induced phosphorylation of MAP kinase ERK1/ERK2 and phenotypic modification of arterial smooth muscle cells in vitro. *J Vasc Res*, 2000. 37(5): p. 345-54.
71. Uglow, E.B., Slater, S., Sala-Newby, G.B., Aguilera-Garcia, C.M., Angelini, G.D., Newby, A.C., and George, S.J., Dismantling of cadherin-mediated cell-cell contacts modulates smooth muscle cell proliferation. *Circ Res*, 2003. 92(12): p. 1314-21.
72. Southgate, K.M., Davies, M., Booth, R.F., and Newby, A.C., Involvement of extracellular-matrix-degrading metalloproteinases in rabbit aortic smooth-muscle cell proliferation. *Biochem J*, 1992. 288 ( Pt 1): p. 93-9.
73. Nyalendo, C., Michaud, M., Beaulieu, E., Roghi, C., Murphy, G., Gingras, D., and Beliveau, R., Src-dependent phosphorylation of membrane type I matrix metalloproteinase on cytoplasmic tyrosine 573: role in endothelial and tumor cell migration. *J Biol Chem*, 2007. 282(21): p. 15690-9.
74. Smiljanic, K., Resanovic, I., Savic, K., Obradovic, M., Putnikovic, B., Djordjevic, J., Isenovic, E.R., Uloga PKC $\delta$  i ERK1/2 u trombinom stimulisanoj proliferaciji glatkih mišićnih ćelija krvnih sudova Medicinska istrazivanja, 2012. accepted.
75. Wu, W., Graves, L.M., Gill, G.N., Parsons, S.J., and Samet, J.M., Src-dependent phosphorylation of the epidermal growth factor receptor on tyrosine 845 is required for zinc-induced Ras activation. *J Biol Chem*, 2002. 277(27): p. 24252-7.
76. Egeblad, M. and Werb, Z., New functions for the matrix metalloproteinases in cancer progression. *Nat Rev Cancer*, 2002. 2(3): p. 161-74.
77. Visse, R. and Nagase, H., Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, function, and biochemistry. *Circ Res*, 2003. 92(8): p. 827-39.
78. El Bedoui, J., Oak, M.H., Anglard, P., and Schini-Kerth, V.B., Catechins prevent vascular smooth muscle cell invasion by inhibiting MT1-MMP activity and MMP-2 expression. *Cardiovasc Res*, 2005. 67(2): p. 317-25.
79. Martorell, L., Martinez-Gonzalez, J., Rodriguez, C., Gentile, M., Calvayrac, O., and Badimon, L., Thrombin and protease-activated receptors (PARs) in atherothrombosis. *Thromb Haemost*, 2008. 99(2): p. 305-15.
80. [http://commons.wikimedia.org/wiki/File:Shedding\\_01.svg](http://commons.wikimedia.org/wiki/File:Shedding_01.svg).

81. Huovila, A.P., Turner, A.J., Pelto-Huikko, M., Karkkainen, I., and Ortiz, R.M., Shedding light on ADAM metalloproteinases. *Trends Biochem Sci*, 2005. 30(7): p. 413-22.
82. Takaguri, A., Kimura, K., Hinoki, A., Bourne, A.M., Autieri, M.V., and Eguchi, S., A Disintegrin and Metalloprotease 17 Mediates Neointimal Hyperplasia in Vasculature. *Hypertension*, 2011. 57(4): p. 841-45.
83. Okada, A., Mochizuki, S., Yatabe, T., Kimura, T., Shiomi, T., Fujita, Y., Matsumoto, H., Sehara-Fujisawa, A., Iwamoto, Y., and Okada, Y., ADAM-12 (meltrin alpha) is involved in chondrocyte proliferation via cleavage of insulin-like growth factor binding protein 5 in osteoarthritic cartilage. *Arthritis Rheum*, 2008. 58(3): p. 778-89.
84. Kodama, T., Ikeda, E., Okada, A., Ohtsuka, T., Shimoda, M., Shiomi, T., Yoshida, K., Nakada, M., Ohuchi, E., and Okada, Y., ADAM12 is selectively overexpressed in human glioblastomas and is associated with glioblastoma cell proliferation and shedding of heparin-binding epidermal growth factor. *Am J Pathol*, 2004. 165(5): p. 1743-53.
85. Izumi, Y., Hirata, M., Hasuwa, H., Iwamoto, R., Umata, T., Miyado, K., Tamai, Y., Kurisaki, T., Sehara-Fujisawa, A., Ohno, S., and Mekada, E., A metalloprotease-disintegrin, MDC9/meltrin-gamma/ADAM9 and PKCdelta are involved in TPA-induced ectodomain shedding of membrane-anchored heparin-binding EGF-like growth factor. *EMBO J*, 1998. 17((24)): p. 7260-72.
86. Suzuki, A., Kadota, N., Hara, T., Nakagami, Y., Izumi, T., Takenawa, T., Sabe, H., and Endo, T., Meltrin alpha cytoplasmic domain interacts with SH3 domains of Src and Grb2 and is phosphorylated by v-Src. *Oncogene*, 2000. 19(51): p. 5842-50.
87. Kang, Q., Cao, Y., and Zolkiewska, A., Metalloprotease-disintegrin ADAM 12 binds to the SH3 domain of Src and activates Src tyrosine kinase in C2C12 cells. *Biochem J*, 2000. 352 Pt 3: p. 883-92.

<sup>1</sup>Institut za patološku fiziologiju "Ljubodrag Buba-Mihailović",  
Medicinski fakultet, Univerzitet u Beogradu, Beograd, Srbija

<sup>2</sup>Institut za kardiovaskularne bolesti "Dedinje", Medicinski fakultet, Univerzitet u Beogradu

## KORELACIJA IZMEĐU AKTIVNOSTI ALFA NAFTIL ACETAT ESTERAZE I RAZLIČITOG STEPENA SUŽENJA HUMANE KAROTIDNE ARTERIJE

## CORRELATION BETWEEN ALPHA NAPHTHYL ACETATE ESTERASE ACTIVITY AND DIFFERENT DEGREES OF STENOSIS OF HUMAN CAROTID ARTERY

D. Vučević<sup>1</sup>, Đ. Radak<sup>2</sup>, D. Kovačević<sup>1</sup>, I. Milovanović<sup>1</sup>, T. Radosavljević<sup>1</sup>, D. Mladenović<sup>1</sup>, S. Kovačević<sup>1</sup>

### **Sažetak**

Uprkos neprestanom ovladavanju biomedicinskim znanjima i tehnikama, naučnici su još uvek daleko od potpunog razumevanja poremećaja molekulskih funkcija i njihovog značaja u aterogenezi. U tom smislu, posebno polje istraživanja predstavljaju ćelijske nespecifične esteraze, s obzirom na ulogu koju imaju u širokom spektru bolesti, uključujući i aterosklerozu. U našoj studiji ispitivana je korelacija između aktivnosti alfa naftil acetat esteraze (ANAE) i različitog stepena suženja humane karotidne arterije. Aktivnost ANAE u imprintima karotidnih plakova pacijenata sa aterosklerozom različitih morfoloških grupa (n=100), kao i u kontrolnoj grupi pacijenata sa kinkingom i/ili koilingom karotidnih arterija (n=25), je određivana primenom citohemijskog scoring sistema (metoda po Hejhou /Hayhoe/ i Kvalinu /Quaglino/, koju su modifikovali Cvetković, Radak i Đorđević-Denić). Naši rezultati pokazuju da postoji razlika relativne vrednosti ANAE esteraznog skora u karotidnim arterijama/plakovima između ispitivanih grupa pacijenata. Utvrđena je, takođe, linearna korelacija između relativne vrednosti ANAE esteraznog skora i različitog stepena suženja karotidne arterije kod pacijenata sa morfološki različitim ateroskleroznim lezijama ovog krvnog suda. Ovi rezultati mogli bi da ukažu na značaj ANAE u procesu aterogeneze.

**Cljučne reči:** alfa naftil acetat esteraza (ANAE), ateroskleroza, karotidni plak, kinking, koiling

### **Summary**

In spite of the constantly growing body of biomedical knowledge and techniques, scientists are still far from a complete understanding of molecular system dysfunctions and their relevance in atherogenesis. Accordingly, cellular non specific esterases represent a special field of research, due to

their role in a wide range of diseases, including atherosclerosis. This paper deals with linear correlation between relative  $\alpha$ -naphthyl acetate esterase (ANAE) score values and different degrees of carotid stenosis in patients with various morphological atherosclerotic lesions of this blood vessel. In our study analysis of ANAE cytochemical activity was performed in imprints of carotid plaques obtained from patients with different morphological groups of atherosclerotic lesions (n=100), as well as in control group of patients with kinking and/or coiling of carotid arteries (n=25). ANAE status was determined by cytochemical scoring system (Hayhoe and Quaglino's method modified by Cvetković, Radak and Đorđević-Denić). Our results show that there is difference in relative score value of ANAE activity in carotid artery/plaque tissue between investigated groups of patients. One can, also, observed linear correlation between relative ANAE score values and different degrees of carotid stenosis in patients with various morphological atherosclerotic lesions of this blood vessel. This findings may indicate importance of ANAE in atherogenesis.

**Key words:**  $\alpha$ -naphthyl acetate esterase (ANAE), atherosclerosis, carotid plaque, kinking, coiling

### **Uvod**

Ateroskleroza je metaboličko, hronično, inflamacijsko, imunski posredovano oboljenje zida arterijskog krvnog suda (1-3). Ova progresivna, multifaktorska bolest dovodi do očvršćavanja, zakrećavanja i suženja velikih arterija (aorte, karotidnih arterija, ilijačnih arterija, arterija mozga, koronarnih arterija) i arterija srednje veličine, sa predilekcionom lokalizacijom na mestima račvanja, odnosno njihovog odvajanja. Početne patološke promene se nalaze u intimi arterija. Osnovna

karakteristična lezija je aterosklerozna ploča (plak /franc. plaque/), tj. aterom (grčki atheroma) (4).

Centralnu ulogu u razvoju ateroskleroznog plaka, posebno u ranim fazama njegovog stvaranja, imaju potencijalno reverzibilni činioci (poremećena sinteza azot monoksida /NO/), odgovor na vazodilatacijske supstance, inflamacija, aktivnost makrofaga i metaloproteinaza, agregacija trombocita i proliferacija glatkih mišićnih ćelija. Dalje napredovanje i rast ateroskleroznog plaka odvija se kao posledica interakcije različitih frakcija lipida, partikula oksidovanih lipoproteina male gustine (ox-LDL → engl. oxidized low density lipoproteins), reverznog transporta lipoproteina velike gustine (HDL → engl. high density lipoproteins) i lokalnih faktora endotela (4). Međutim, uprkos velikoj pažnji koja se posvećuje proučavanju ateroskleroze, pokretač primarnog patološkog događaja je još uvek nepoznat. U tom smislu posebno polje istraživanja predstavljaju nespecifične esteraze, imajući u vidu ulogu koju ovi enzimi imaju u širokom spektru bolesti, uključujući i aterosklerozu.

Pod terminom nespecifične esteraze (proste esteraze) u citohemiji se podrazumeva grupa enzima (karboksil esteraze, aril esteraze i acetil esteraze) koji vrše hidrolizu prostih estara ( $\alpha$ -naftil acetata,  $\alpha$ -naftil butirata, hloracetata, indoksil acetata, i dr.), pri čemu nastaju N-slobodni alkoholi i organske kiseline (5).

U modifikovanim uslovima lokalne mikrosredine nespecifične esteraze u većoj količini prelaze iz lizozoma u vanćelijski prostor. Naime, u osoba obolelih od ateroskleroze i u pušača sa razvijenom aterosklerozom dolazi do otpuštanja ovih enzima, koji u sadejstvu sa kiselim fosfatazama, elastazama, hijaluronidazom, katepsinom, kolagenazama i aktivatorima plazmina mogu da oštete okolne plemenite strukture (6, 7).

U toku sazrevanja makrofaga raste količina hidrolitičkih enzima u njihovim lizozomima. Stepennost aktivnosti esteraza je u mononuklearima u korelaciji sa ćelijskim vijabilitetom i mitotskim kapacitetom. U određenim uslovima makrofagi snažno podstiču imunsku reakciju, oslobađajući citokine i faktore rasta, koji zatim aktiviraju limfocite. Razni lokalni stimulusi (imunski kompleksi, antigeni, limfokini, delovi bakterija, itd.) mogu da pokrenu oslobađanje hidrolitičkih lizozomskih enzima u vanćelijski prostor sa autodestruktivnim posledicama. S tim u vezi, histohemijskim metodama je utvrđeno da je aktivnost nespecifičnih esteraza u makrofagima arterijskog zida povišena u toku aterogeneze indukovane hiperholesterolskom dijetom, a takođe i prilikom povreda endotela balon kateterom. Uočeno je, takođe, da je količina esteraza direktno proporcionalna stepenu zasićenosti intime lipoproteinima i drugim makromolekulima (7).

Citohemijskom analizom aterosklerozno promenjenih plakova ustanovljeno je prisustvo  $\alpha$ -naftil acetat esteraze (ANAE → engl.  $\alpha$ -naphthyl acetate esterase). Rezultati dosadašnjih istraživanja pokazuju da je aktivnost ovog enzima, kao prvenstvenog markera monocitno-makrofagne ćelijske loze, u korelaciji sa morfološkim karakteristikama plaka i njegovom progresijom (5, 8, 9). U tom smislu, utvrđivanje dinamike promene aktivnosti ANAE u aterogenezi bi moglo imati terapijsku implikaciju, s obzirom da ovaj enzim može biti potencijalna meta u prevenciji progresije ateroskleroze. Stoga je cilj ovog rada bio da se ispita korelacija između aktivnosti ANAE i različitog stepena suženja humane karotidne arterije.

## Materijal i metode

### Ispitanici

Istraživanje, koje je odobrio Etički komitet Medicinskog fakulteta u Beogradu, je obuhvatilo 125 bolesnika primljenih u Institut za kardiovaskularne bolesti "Dedinje" u Beogradu zbog kardioloških i vaskularnih tegoba. Period praćenja ovih bolesnika je bio od oktobra 2007. godine do februara 2008. godine. Od 125 operisanih pacijenata, 100 pacijenta (80%) je imalo aterosklerozu karotidnih krvnih sudova, i zbog stenoze karotidne arterije jednake ili veće od 70%, kao i prisustva fokalnih ili globalnih simptoma cerebralne ishemije, bilo operisano primenom everzione karotidne endarterektomije. 25 pacijenata (20%) bez morfoloških znakova ateroskleroze karotidnih krvnih sudova koji su činili kontrolnu grupu, bilo je podvrgnuto resekciji elongirane karotidne arterije zbog otklanjanja hemodinamski značajnog kinkinga (/engl. kinking/ koleno, pregib) ili koilinga (/engl. coiling/ petlja, klupko). Kod bolesnika je vršeno preoperativno kliničko neuroangiološko i kardiološko ispitivanje, kao i ultrazvučno ispitivanje morfologije i procenta stenoze karotidnih arterija.

Karotidni aterosklerozni plak je ispitivan ultrasonografski preoperativno, kao i makroskopski intraoperativno. Na osnovu makroskopsko-morfoloških karakteristika, sve lezije karotidnih arterija su podeljene u četiri morfološke grupe:

- grupa sa karakteristikama fibroznog tkiva u intimalnom i medijalnom delu karotidne arterije (FIB-fibrolipidni plak),
- grupa sa intraplakalnom hemoragijom (HEM-krvarenje u plaku),
- grupa sa egzulceracijom karotidnog plaka (ULC-egzulcerisani plak) i
- grupa sa kalcifikovanim depozitima u karotidnom plaku (KALC-kalcifikovani plak).

Ispitivanje je obuhvatilo i uzorke normalnog tkiva karotidne arterije kontrolne grupe (K), sa kinkingom ili koilingom.

Citohemijsko ispitivanje ANAE metodom imprinta

Citohemijsko ispitivanje ANAE je vršeno u Institutu za patološku fiziologiju Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu.

Odstranjeni delovi karotidne arterije sa morfološki prisutnim ateromom i morfološki "zdravim" delovima arterije (kinking i koiling bez ateroskleroznih promena, tj. kontrolne morfološke grupe - K) korišćeni su za citološko i citohemijsko ispitivanje aktivnosti ANAE metodom imprinta (otiska). Ispitivani uzorci tkiva karotidnih arterija utiskivani su na mikroskopsku pločicu prethodno tretiranu rastvorom 70% etilalkohola, a potom su imprinti (otisci) ispitivanih i kontrolnih uzoraka tkiva bojeni citohemijskim bojama za vizualizaciju ANAE.

Aktivnost ANAE u imprintima karotidne arterije/plaka određivana je tehnikom koju su primenjivali Vahštajn (Wachstein) i Volf (Wolf), a dopunili Meler (Mueller) i njegovi saradnici (10, 11). U tom cilju upotrebljen je supstrat sastavljen od 40 mL rastvora propilen glikola (0.1 mol/L) u fosfatnom puferu (0.2 mol/L) čiji je pH 6.9 (0.4 mL 1/100 naftol AS ili AS-D acetata /Sigma diagnostics/ u acetonu) i 80 mg Fast blue BB salt (Sigma diagnostics).

Procedura bojenja je obuhvatala fiksiranje preparata u parama formalina u toku 4 minuta, ispiranje preparata destilovanom vodom, prelivanje preparata sveže napravljenim rastvorom supstrata, inkubaciju sa supstratom na sobnoj temperaturi u trajanju od 30 do 60 minuta, ispiranje preparata destilovanom vodom, sušenje preparata na vazduhu i bojenje preparata Harris ili Karazzi hematoksilinom u trajanju od 10 minuta. Proizvod reakcije su precipitati enzima u vidu granula crne boje.

Citohemijska analiza preparata karotidnih arterija i plakova vršena je pomoću svetlosnog mikroskopa BIO-OPTICA (uveličanje 100x i imerzija). Zatim su specifična polja fotografisana korišćenjem digitalnog fotoaparata na mikroskopu OLYMPUS DP70 (uveličanje 40x, 100x i 400x).

Citohemijska procena ANAE esterazne aktivnosti metodom indeksiranja i skoriranja

U proceni citohemijske aktivnosti ANAE pošlo se od iskustava i standarda postavljenih za semikvantitativnu procenu pozitivnosti citohemijskih reakcija metodom indeksiranja i skora (engl. scoring method), koju su opisali Hejho (Hayhoe) i Kvalino (Quaglino) (5), a modifikovali Cvetković, Radak i Đorđević-Denić (12). Navedena iskustva se odnose na procenu pozitivnosti citohemijskih reakcija na hematološkim preparatima, kao i na preparatima alveolarnih makrofaga dobijenim bronhoalveolarnom lavažom na eksperimentalnim modelima.

Skoring sistem je zasnovan na prisustvu različitog stepena esterazne pozitivnosti u

granulocitnoj, limfocitnoj i monocitno-makrofagnoj populaciji ćelija (5).

Procena stepena ANAE esterazne aktivnosti se vrši na 100 ćelija, tako što se pozitivnost u vidu većeg broja grubih granula označava sa "+++", pozitivnost u vidu pojedinačnih grubih granula označava se sa "++", pozitivnost u vidu sitnijih diskretnih granula u citoplazmi označava se sa "+", dok se negativna reakcija označava sa "0". Suma aktivnosti 100 ćelija daje ANAE esterazni skor za svaki preparat, čije se varijacije kreću od 0 do 300 (5).

Aktivnost ANAE procenjena je na 100 ćelija, koje pokazuju različit stepen aktivnosti (od negativnog do izrazito pozitivnog), pri čemu je na osnovu zajedničkog indeksa (skora) određivana srednja vrednost skora aktivnosti ovog enzima. Kvantifikacijom dobijenih srednjih vrednosti skora, određivana je relativna vrednost skora (5).

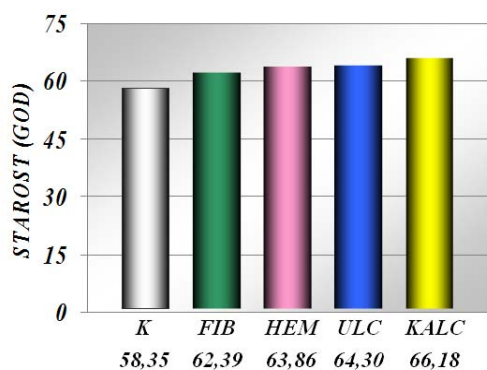
Relativna vrednost skora predstavlja izraz srednje vrednosti skora u odnosu na maksimalnu vrednost skora za pojedinačnu aktivnost ispitivane esteraze, izražena u obliku procenta (5).

Analiza rezultata istraživanja vršena je na osnovu odgovarajućih statističkih parametara (aritmetička sredina, standardna devijacija, koeficijent varijacije), metoda (Studentov t test, analiza varijanse /ANOVA/, Fišerov /Fisher/ post hoc test, Kruskall-Wallis test), i kompjuterskih statističkih programa (STATISTICA 7.0 Professional Edition, SPSS 15.0 Professional Edition).

## Rezultati

Karotidni plak ispitanika je na osnovu nalaza dupleks sonografije podeljen u četiri morfološke grupe. U prvoj grupi sa fibrolipidnim plakom (FIB) bilo je 20 bolesnika (20%). U drugoj grupi sa intraplakalnom hemoragijom (HEM) bilo je 10 bolesnika (10%). Treću morfološku grupu sa egzulcerisanim karotidnim plakom (ULC) činilo je 36 bolesnika (36%), dok je u četvrtoj morfološkoj grupi sa izraženim kalcifikacijama karotidnog plaka (KALC) bilo 34 bolesnika (34%). Starost bolesnika.- Prosečna starost svih ispitivanih bolesnika iznosila je  $62.80 \pm 8.22$  godine. Bolesnici sa karotidnom aterosklerozom imali su u proseku  $63.95 \pm 6.67$  godine. Kontrolna grupa bolesnika (K) sa kinkingom ili koilingom karotidnih arterija u proseku je bila stara  $58.35 \pm 9.27$  godina. U grupi bolesnika sa karotidnom aterosklerozom bilo je 62 (62%) muškarca (prosečne starosti  $63.83 \pm 7.69$ ) i 38 (38%) žena (prosečne starosti  $65.05 \pm 7.43$ ). U kontrolnoj grupi je bilo 7 (28%) muškarca (prosečne starosti  $58.55 \pm 7.56$ ) i 18 (72%) žena (prosečne starosti  $58.15 \pm 9.82$ ). Analizom starosnog doba ispitivanih pacijenata, dobijeni su rezultati, koji su prikazani na grafikonu 1.

Grafikon 1. Starosna raspodela ispitivanih pacijenata

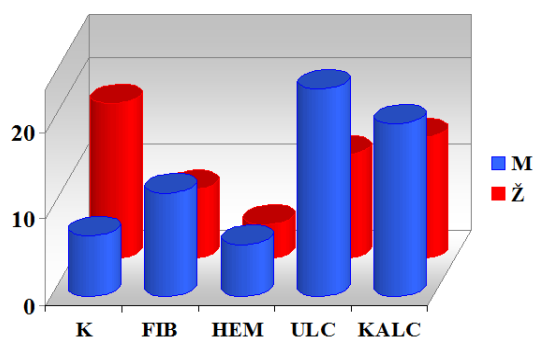


K/ULC → \* $p < 0.05$ ; K/KALC → \*\* $p < 0.01$ ; KALC/FIB → \* $p < 0.05$   
 $p$ -nivo statističke značajnosti;  
 \*  $p < 0.05$  statistički značajna razlika u odnosu na kontrolnu grupu (K);  
 \*\*  $p < 0.01$  visoko statistički značajna razlika u odnosu na kontrolnu grupu (K)

Analizom varijanse (ANOVA) za kontinuirane varijable je ustanovljeno da postoji značajna razlika ( $p < 0.05$ ) u prosečnim godinama starosti ovih pet grupa ispitanika. Post-hoc LSD (engl. least significant difference) metodom testiranja međugrupnih razlika značajnosti pokazano je da ta razlika najvećim delom potiče od razlike između prosečnih godina starosti pacijenata sa kalcifikovanim ateroskleroznim plakom ( $66.18 \pm 8.27$ ) i ispitanika kontrolne grupe ( $58.35 \pm 9.27$ ) (grafikon 1).

Pol bolesnika.- Od 125 bolesnika u našoj studiji, 69 bolesnika je bilo muškog pola, dok je 56 bolesnika bilo ženskog pola. Analizom raspodele ispitanika kontrolne grupe i različitih morfoloških grupa po polu, dobijeni su rezultati prikazani na grafikonu 2.

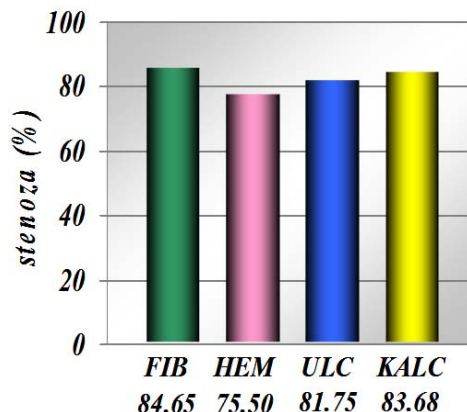
Grafikon 2. Raspodela ispitivanih pacijenata po polu



Stepen stenozе karotidnih arterija.- Dopler sonografskim pregledom karotidnih arterija kod 25 bolesnika u kontrolnoj grupi sa kinkingom ili koilingom karotidnih arterija nisu registrovane stenozе ovog krvnog suda. S druge strane, kod preostalih 100 bolesnika sa aterosklerozno izmenjenim karotidnim arterijama, uočeni su različiti stepeni stenozе ovog

krvnog suda. Rezultati ispitivanja stepena stenozе karotidnih arterija, predstavljeni su grafički (grafikon 3).

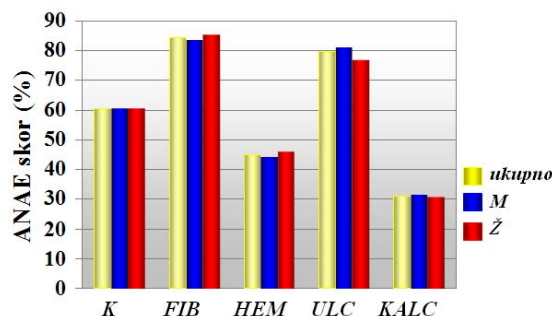
Grafikon 3. Distribucija stepena stenozе karotidnih arterija prema morfološkim grupama



Analizom varijanse (ANOVA) za kontinuirane varijable pokazano je da nema značajne razlike ( $p > 0.05$ ) između morfoloških grupa u pogledu stepena stenozе karotidne arterije, uprkos evidentno manjem stepenu suženja karotidne arterije u grupi bolesnika sa intraplakalnom hemoragijom u odnosu na ostale morfološke grupe (grafikon 3).

Analiza ANAE esterazne aktivnosti u kontrolnoj i morfološkim grupama.- Rezultati dobijeni analizom aktivnosti ANAE u ispitivanim grupama su prikazani na grafikonu 4.

Grafikon 4. Relativne vrednosti skora (%) aktivnosti ANAE u ispitivanih bolesnika



K/FIB → \*\* $p < 0.01$ ; K/ULC → \*\* $p < 0.01$ ; FIB/HEM → \*\* $p < 0.01$ ;  
 FIB/KALC → \*\* $p < 0.01$ ; HEM/ULC → \*\* $p < 0.01$ ; ULC/KALC → \*\*  
 $p < 0.01$   
 $p$ -nivo statističke značajnosti;  
 \*  $p < 0.05$  statistički značajna razlika u odnosu na kontrolnu grupu (K);  
 \*\*  $p < 0.01$  visoko statistički značajna razlika u odnosu na kontrolnu grupu (K)



U odnosu na ukupnu relativnu vrednost skora (% skora) aktivnosti ANAE koja je registrovana u kontrolnoj grupi, relativna vrednost skora aktivnosti ove esteraze je u muškaraca viša, dok je u žena niža (grafikon 4).

U odnosu na ukupnu relativnu vrednost skora (% skora) aktivnosti ANAE, koja je registrovana u ispitanika sa fibrolipidnim plakom, relativna vrednost skora aktivnosti ove esteraze je u muškaraca niža, dok je u žena viša (grafikon 4).

U pacijenata sa intraplakalnom hemoragijom relativna vrednost skora (% skora) aktivnosti ANAE je u odnosu na ukupnu relativnu vrednost skora (% skora) aktivnosti ove esteraze niža, dok je u pacijentkinja viša (grafikon 4).

U muškaraca sa egzulcerisanim plakom relativna vrednost skora (% skora) aktivnosti ANAE je u odnosu na ukupnu relativnu vrednost skora (% skora) aktivnosti ove esteraze viša, dok je u žena niža (grafikon 4).

U pacijenata sa kalcifikovanim plakom relativna vrednost skora (% skora) aktivnosti ANAE je u odnosu na ukupnu relativnu vrednost skora (% skora) aktivnosti ove esteraze viša, dok je u pacijentkinja niža (grafikon 4).

Poređenjem relativne vrednosti ANAE skora između K i FIB grupe, registrovano je visoko statistički značajno povećanje ( $p < 0.01$ ) aktivnosti ovog enzima u FIB grupi u odnosu na njenu ukupnu vrednost skora, kao i vrednosti skora u oba pola u kontrolnoj grupi (grafikon 4).

Visoko statistički značajno povećanje ( $p < 0.01$ ) aktivnosti ANAE registrovano je i u ULC grupi u odnosu na ukupnu relativnu vrednost skora ovog enzima i njegove vrednosti u oba pola u kontrolnoj grupi (grafikon 4).

Visoko statistički značajno smanjenje ( $p < 0.01$ ) aktivnosti ANAE uočeno je u HEM i KALC grupi u odnosu na ukupnu relativnu vrednost skora ovog enzima i njegove vrednosti u oba pola u FIB grupi (grafikon 4).

Poređenjem relativne vrednosti ANAE skora između HEM i ULC grupe, takođe je uočeno visoko statistički značajno smanjenje ( $p < 0.01$ ) aktivnosti ANAE u HEM grupi u odnosu na ukupnu relativnu vrednost skora ovog enzima i njegove vrednosti u oba pola u ULC grupi (grafikon 4).

Visoko statistički značajno povećanje ( $p < 0.01$ ) aktivnosti ANAE nađeno je u ULC grupi u odnosu na ukupnu relativnu vrednost skora ovog enzima i njegove vrednosti u oba pola u KALC grupi (grafikon 4).

Poređenje citohemijske aktivnosti ANAE i suženja karotidne arterije u morfološkim grupama pacijenata.- Poređenjem citohemijske aktivnosti ANAE i različitog stepena stenoze karotidne arterije u morfološkim grupama pacijenata dobijeni su rezultati,

koji su prikazani grafički (grafikoni 5-8) i tabelarno (tabele 1-4).

Utvrđena je visoko statistički značajna pozitivna korelacija između relativne vrednosti ANAE skora i karotidne stenoze ispitanika sa fibrolipidnim plakom ( $p < 0.01$ ) (tabela 1, grafikon 5).

Grafikon 5. Linearna korelacija između relativne vrednosti ANAE skora i karotidne stenoze ispitanika sa fibrolipidnim plakom

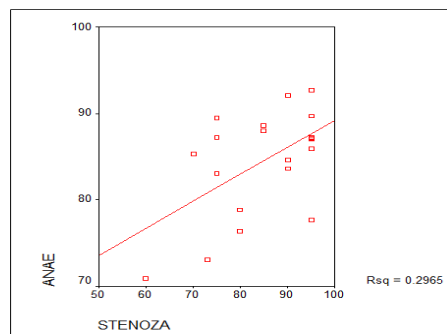


Tabela 1. Statistički prikaz linearne korelacije između relativne vrednosti ANAE skora i karotidne stenoze ispitanika sa fibrolipidnim plakom

		STENOZA	ANAE
STENOZA	Pirson (Pearson) Korelacija	1	,544 **
	Značajnost	.	,007
	N	20	20
	ANAE	Pirson (Pearson) Korelacija	,544(**)
	Značajnost	,007	.
	N	20	20

\*\* -  $p < 0.01$

pozitivna povezanost relativne vrednosti ANAE skora i karotidne stenoze ispitanika sa krvarenjem u plaku je na nivou statističke značajnosti ( $p < 0.05$ ) (tabela 2, grafikon 6).

Grafikon 6. Linearna korelacija između relativne vrednosti ANAE skora i karotidne stenoze ispitanika sa intraplakalnom hemoragijom

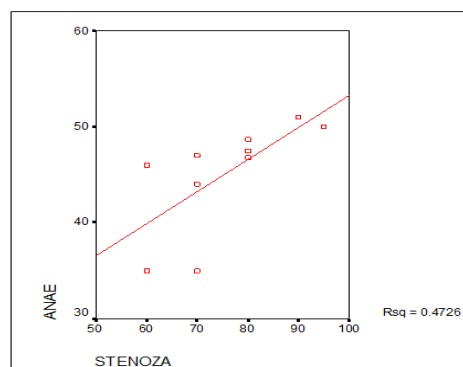


Tabela 2. Statistički prikaz linearne korelacije između relativne vrednosti ANAE skora i karotidne stenozе ispitanika sa intraplakalnom hemoragijom

/	/	STENOZA	ANAE
STENOZA	Pirson (Pearson)	1	,687(*)
	Korelacija		
	Značajnost	.	,014
	N	10	10
ANAE	Pirson (Pearson)	,687(*)	1
	Korelacija		
	Značajnost	,014	.
	N	10	10

Statistički značajna pozitivna korelacija je nađena između relativne vrednosti ANAE skora i karotidne stenozе ispitanika sa egzulcerisanim plakom ( $p < 0.05$ ) (tabela 3, grafikon 7).

Grafikon 7. Linearna korelacija između relativne vrednosti ANAE skora i karotidne stenozе ispitanika sa egzulcerisanim plakom

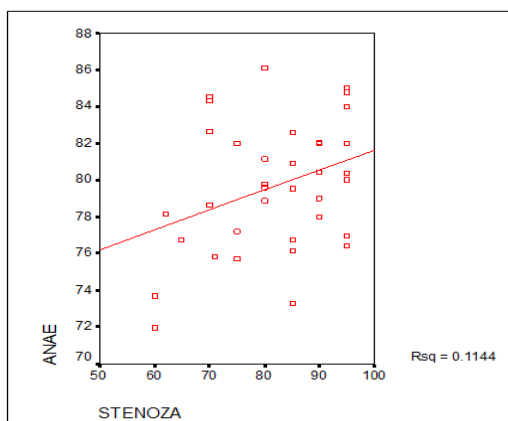


Tabela 3. Statistički prikaz linearne korelacije između relativne vrednosti ANAE skora i karotidne stenozе ispitanika sa egzulcerisanim plakom

/	/	STENOZA	ANAE
STENOZA	Pirson (Pearson)	1	,338(*)
	Korelacija		
	Značajnost	.	,044
	N	36	36
ANAE	Pirson (Pearson)	,338(*)	1
	Korelacija		
	Značajnost	,044	.
	N	36	36

\*- $p < 0.05$

Između relativne vrednosti ANAE skora i karotidne stenozе ispitanika sa kalcifikovanim plakom, takođe je registrovana statistički značajna pozitivna korelacija ( $p < 0.05$ ) (tabela 4, grafikon 8).

Grafikon 8. Linearna korelacija između relativne vrednosti ANAE skora i karotidne stenozе ispitanika sa kalcifikovanim plakom

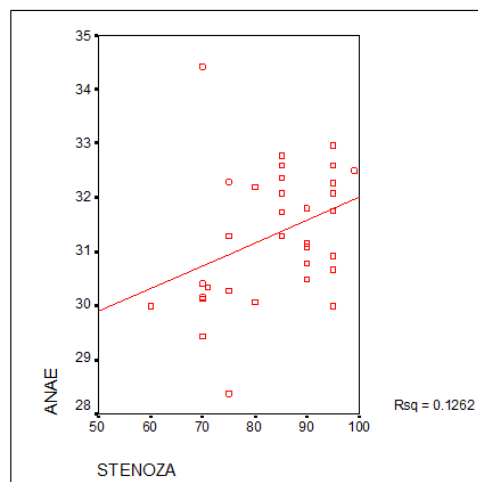
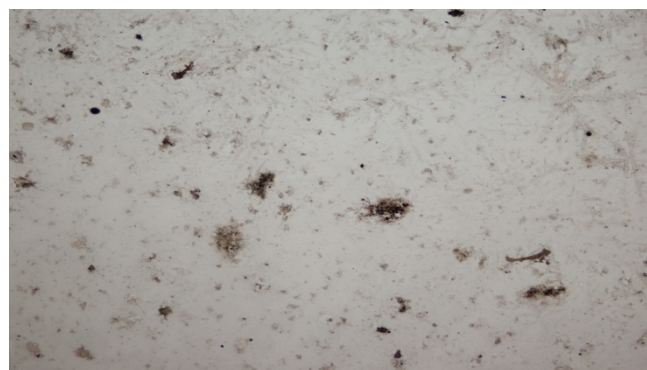


Tabela 4. Statistički prikaz linearne korelacije između relativne vrednosti ANAE skora i karotidne stenozе ispitanika sa kalcifikovanim plakom

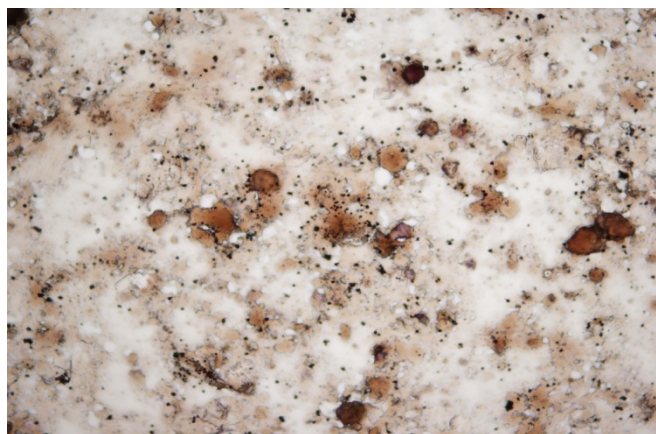
/	/	STENOZA	ANAE
STENOZA	Pirson (Pearson)	1	,355(*)
	Korelacija		
	Značajnost	.	,039
	N	34	34
ANAE	Pirson (Pearson)	,355(*)	1
	Korelacija		
	Značajnost	,039	.
	N	34	34

\*- $p < 0.05$

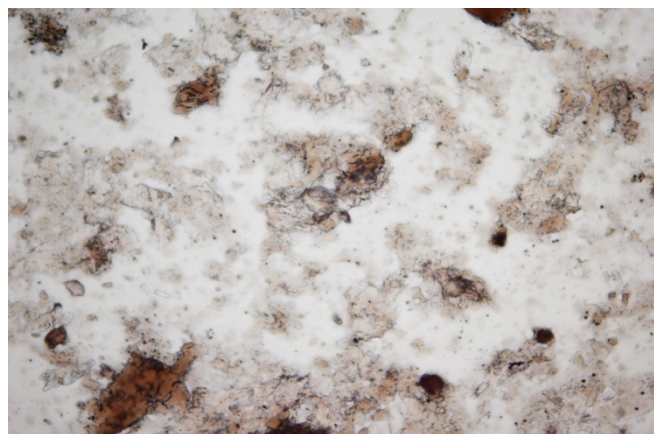
Citohemijska analiza ANAE esterazne aktivnosti u kontrolnoj i morfološkim grupama.- Metodološki pristup korišćen u našem radu, potvrđen je i citohemijski. Rezultati citohemijske analize ANAE esterazne aktivnosti preparata karotidnih arterija i plakova, koji su prikazani na slikama 1-5, ukazuju na različit stepen esterazno pozitivnih makrofaga i granulocita.



Slika 1. ANAE - imprint kontrolne grupe (K) Zapažaju se esterazno pozitivni granulociti i makrofagi (uveličanje 100 x).



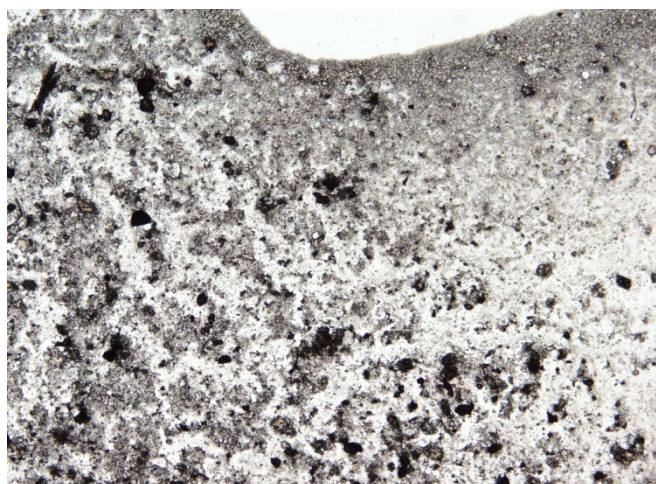
Slika 2. ANAE - imprint fibrolipidnog plaka (FIB)  
Vide se esterazno pozitivni makrofagi i granulociti sa krupnim granulama po obodu ćelije (uveličanje 100 x).



Slika 5. ANAE - imprint kalcifikovanog plaka (KALC)  
Zapažaju se depoziti kristala karakteristični za kalcifikaciju, kao i makrofagi sa paketima krupnih granula (uveličanje 400 x).



Slika 3. ANAE - imprint krvarenja u plaku (HEM)  
Uočava se izrazita intraplakalna hemoragija, sa mnoštvom penastih ćelija i esterazno pozitivnih makrofaga i granulocita (uveličanje 40 x).



Slika 4. ANAE - imprint egzulcerisanog plaka (ULC)  
Uočava se mnoštvo lipofaga, kao i pozitivnih makrofaga i granulocita, naročito u egzulcerisanom oštećenju intime karotidne arterije (uveličanje 100 x).

### Diskusija

Starost ispitanika.- Ateroskleroza predstavlja globalni zdravstveni problem. U razvijenim zemljama ateroskleroza i njene komplikacije dovode do 50% svih smrtnih ishoda i 1/3 smrtnih ishoda kod ljudi između 35. i 65. godine života. Od ukupnog broja obolelih od ateroskleroze, više od 60% oboljeva u zemljama u razvoju. Od tog broja, više od 50% mortaliteta i invaliditeta pripada bolestima srca i moždanom udaru. Procenjuje se da globalna prevalenca karotidne ateroskleroze iznosi oko 25%, a prevalenca ateroskleroznog plaka oko 13% (13).

U našem istraživanju prosečna starost svih ispitivanih bolesnika iznosila je  $62.80 \pm 8.22$  godine. Bolesnici sa aterosklerozom karotidne arterije su bili u proseku nešto stariji ( $63.95 \pm 6.67$ ) u odnosu na kontrolnu grupu ( $58.35 \pm 9.27$ ), pri čemu ova razlika nije na nivou statističke značajnosti ( $p > 0.05$ ). Ovakav naš nalaz je u skladu sa opšte prihvaćenim mišljenjem da je ateroskleroza bolest starijeg životnog doba.

Analiza starosti naših bolesnika u odnosu na pol je pokazala da nema značajne razlike u pogledu starosti muškaraca i žena, kako u grupi obolelih koji su imali različite morfološke tipove ateroskleroznog plaka, tako i u kontrolnoj grupi ( $p > 0.05$ ). Naše istraživanje je pokazalo da među bolesnicima sa komplikacijama ateroskleroznih lezija karotidnog plaka preovlađuju muškarci starosti između 55 i 65 godina, što je u saglasnosti sa literaturnim podacima (14, 15).

Analiza starosti ispitivanih bolesnika u odnosu na morfološke grupe je pokazala da su pripadnici morfološke grupe sa kalcifikovanim karotidnim plakom značajno stariji u odnosu na bolesnike u kontrolnoj grupi ( $p < 0.01$ ) (grafikon 1), potvrđujući, na taj način, međusobnu povezanost starenja i uznapredovale ateroskleroze. Naime, poznato je da sa starenjem kod bolesnika sa karotidnom aterosklerozom dolazi do povećanja incidence kalcifikovanih plakova,

a smanjenja incidence fibroznih plakova, što je praćeno redukcijom glatkih mišićnih ćelija unutar samog plaka (16). Različite studije sprovedene u poslednje dve decenije, su pružile potvrdu da starenje arterija, koje se karakteriše zadebljanjem i dilatacijom zidova arterija (prvenstveno intime i medije), značajno utiče na razvoj ateroskleroze (14, 17).

Međusobnu povezanost starenja i uznapredovale ateroskleroze, koja predstavlja nalaz dobijen u našem istraživanju, potkrepljuje i činjenica da je povećana biosinteza fosfolipida, masnih kiselina i sterola dokazana u arterijama u kojima su već nastali ateromi. Osim toga, pokazano je da su aktivnosti lipaza i esteraza smanjene u aortama eksperimentalnih životinja na aterogenoj dijeti, uz lokalni gubitak aktivnosti adenozintrifosfataze (ATP-aze) u ateromatoznim lezijama (18). Takođe je naglašen značaj funkcijskog stanja lizozomskog enzimskog sistema arterijskog zida za normalnu rezistenciju intime u odnosu na hiperlipemiju i lezije endotela. Lizozomski enzimi mogu da dovedu do generalizovane razgradnje ćelijskih komponenti bitnih za kontinuirano samoobnavljanje. Ovaj enzimski sistem je uključen u proces starenja (nakupljanja lipofuscina, tj. pigmenta starenja). Smatra se da povećano taloženje estara holesterola u glatkim mišićnim ćelijama arterija može biti povezano sa delimičnim nedostatkom lizozomske hidrolaze holesterolskih estara. Estri holesterola se nagomilavaju u lizozomima i mogu da dovedu do ćelijske smrti. U saglasnosti sa ovim, osobe kod kojih je ustanovljena ova retko zastupljena enzimopatija mogu imati ubrzanu aterosklerozu (19).

Pol bolesnika.- Od 125 bolesnika u našoj studiji, 69 bolesnika je bilo muškog pola, dok je 56 bolesnika pripadalo ženskom polu. Kontrolna grupa je obuhvatila 7 (28%) muškarca i 18 (72%) žena. U grupi bolesnika sa karotidnom aterosklerozom bilo je 62 (62%) muškarca i 38 (38%) žena. Ovaj podatak je u skladu sa činjenicom da su procesu ateroskleroze podložnije osobe muškog pola (20).

Analizom raspodele ispitanika različitih morfoloških grupa i kontrolne grupe po polu, dobijeni su rezultati koji pokazuju značajnu razliku između grupa, pre svega usled većeg prisustva žena u kontrolnoj grupi u poređenju sa ostalim morfološkim grupama. Takođe, kao što je već naglašeno, registrovan je veći broj pripadnika muškog pola u bolesnika sa značajnom aterosklerozom karotidne arterije u svim morfološkim grupama u odnosu na ženski pol (grafikon 2). Distribucija naših ispitanika po polu je u skladu sa većom incidencijom karotidne ateroskleroze u muškoj populaciji (20), odnosno kinkinga i koilinga u ženskoj populaciji (21). Pokazano je, takođe, da u svim uzrasnim grupama muškarci imaju veći procenat "mekših" karotidnih plakova, koji su bogati lipidima, u odnosu na žene (22). Pored toga, kod žena posle menopauze je utvrđena značajna razlika u smislu veće

prevalence karotidnog plaka ( $p < 0.001$ ) u odnosu na žene pre menopauze (23). Posebno je interesantno istraživanje uticaja muških polnih hormona na karotidnu aterosklerozu, koje ukazuje na naglašen razvoj zadebljanja zida zajedničke karotidne arterije i karotidnog bulbosa u sredovečnih muškaraca u tzv. andropauzi (testosteron  $< 9.8$  nmol/L) (24).

Stepen stenozе karotidnih arterija.- Na osnovu ultrazvučnog ispitivanja morfološke karotidnog plaka, kod bolesnika u kontrolnoj grupi je dijagnostifikovan kinking i/ili koiling karotidne arterije bez značajnih suženja lumena krvnog suda. Kinking i koiling predstavljaju dva osnovna morfološka oblika, tj. dve osnovne simptomatske forme arterijske elongacije, koje nemaju značajnu korelaciju sa aterosklerozom i glavnim kardiovaskularnim faktorima rizika.

U našem istraživanju kod svih bolesnika sa aterosklerozom karotidnog plaka izvršena je kvantifikacija stepena karotidne stenozе. Analizom prosečnih vrednosti stepena stenozе karotidnih arterija po morfološkim grupama je utvrđen manji stepen karotidne stenozе u grupi bolesnika sa intraplakalnom hemoragijom i veći stepen karotidne stenozе u grupi bolesnika sa fibrolipidnim plakom u poređenju sa ostalim morfološkim grupama (grafikon 3). Ovi naši nalazi nisu statistički značajni ( $p > 0.05$ ).

Dosadašnja raznovrsna istraživanja na ovom polju su potvrdila povezanost heterogenih plakova i relevantne stenozе karotidne arterije. Nedavno je utvrđeno da je prevalenca stenotičnih plakova kod asimptomatskih bolesnika 2.7% kod muškaraca i 1.5% kod žena. Poređenjem brzine protoka kroz iste stepene suženja karotidne arterije, registrovane su veće brzine protoka kod žena u odnosu na muškarce, naročito kod stenozа karotidne arterije koje su se kretale u intervalu od 60 do 70%. Interesantno je napomenuti i to da su mlade životno doba, prisustvo koronarne bolesti i eholucentni plak označeni kao faktori progresije stepena karotidne stenozе. Pokazalo se, takođe, da se višestrukim merenjem progresije stepena karotidne stenozе mogu u značajno većem obimu predvideti budući cerebrovaskularni poremećaji u odnosu na njegovo bazalno merenje (25).

Pokazano je da su simptomatski karotidni plakovi najčešće eholucentni, manje kalcifikovani i sa većim stepenom intraplakalne nekroze u odnosu na asimptomatske plakove. Sa sigurnošću se još uvek ne može reći koje lokalne promene u karotidnom plaku neposredno izazivaju njegov prelazak iz stabilnog (asimptomatskog) u nestabilno (simptomatsko) stanje. Izgleda da porastom stenozе plak postaje nestabilan i daje simptome koji postaju stabilni nakon arterijske okluzije (26).

Najveći broj naših ispitanika je imao egzulcerisan karotidni plak, što je u saglasnosti sa publikovanim podacima (27).

Bolesnici sa fibrolipidnim plakom i intraplakalnom hemoragijom u našoj studiji su imali karotidne stenoze veće od 75% lumena u većem broju u odnosu na podatke iz literature. Ovakav naš rezultat se može dovesti u vezu sa većim stepenom preciznosti Dupleks sonografskog pregleda korišćenog u našoj studiji, s obzirom na činjenicu da je Dopler analiza, koja daje nešto preciznije podatke o kvalitetu stenoze karotidne arterije, sastavni deo ovog pregleda.

Naučna istraživanja su pokazala da su karotidni plakovi sa visokim rizikom za rupturu uglavnom heterogeni, fibrozni i sa varijacijama u pogledu količine lipida (25-27). Do ruptуре plaka najčešće dolazi zbog intramuralnog hematoma ili disekcije usled pritiska krvi u toku sistole, koji je u suprotnom smeru u odnosu na otpor izazvan stenotičnom lezijom (27).

ANAE esterazna aktivnost u kontrolnoj i morfološkim grupama.- Poređenjem relativne vrednosti ANAE skora između ispitanika kontrolne grupe i ispitanika sa fibrolipidnim karotidnim plakom, registrovano je visoko statistički značajno povećanje ( $p < 0.01$ ) aktivnosti ovog enzima u ispitanika sa fibrolipidnim karotidnim plakom u odnosu na njenu ukupnu vrednost skora, kao i vrednosti skora u oba pola u kontrolnoj grupi (grafikon 4, slike 1 i 2). Visoko statistički značajno povećanje ( $p < 0.01$ ) aktivnosti ANAE registrovano je i u ispitanika sa egzulceracijom karotidnog plaka u odnosu na ukupnu relativnu vrednost skora ovog enzima i njegove vrednosti u oba pola u kontrolnoj grupi (grafikon 4, slika 4). Ovi naši rezultati su potvrda teze da se citohemijska aktivnost ANAE može koristiti kao parametar u ispitivanjima normalnih ćelija, kao i ćelija koje su izmenjene inflamacijskim ili neoplastičnim procesom (8). Poznato je da u modifikovanim uslovima lokalne mikrosredine, koji odlikuju i aterosklerozu, ćelijske nespecifične esteraze u većoj količini prelaze iz lizozoma u ekstracelularni prostor, gde u sadejstvu sa drugim enzimima (kiselim fosfatazama, elastazama, hijaluronidazom, katepsinom, kolagenazama, aktivatorima plazmina, mijeloperoksidazama i dr.) mogu da dovedu do tkivnog oštećenja (4, 7, 9). Poznato je, takođe, da u tom štetnom sadejstvu prednjače mijeloperoksidaze, koje su zastupljene u makrofagima i predstavljaju realnu potencijalnu opasnost, kako za "domaćina", tako i za patogen na koga atakuju makrofagi, pa samim tim imaju veliku odgovornost za oštećenje tkiva u inflamacijskim procesima (1-3). S obzirom na činjenicu da su naučnici vrlo blizu potvrde hipoteze, prema kojoj je ateroskleroza po svojim patogenetskim karakteristikama najbliža generalizovanoj inflamaciji, logično se nameće zaključak da su, pored ostalog, ANAE i mijeloperoksidaze verovatno odgovorne za uključivanje makrofaga u ovaj proces. Najverovatniji mehanizam dejstva enzimskog sinergističkog oštećenja endotela je konverzija slobodnog L-tirozina u plazmi u

tirozil-radikal, koji zatim dovodi do oksidacije LDL molekula. Nedavna istraživanja su pokazala da mijeloperoksidaze, oksiduju nitrite, stvarajući pri tom u prvom redu peroksinitrit, koji se smatra najtoksičnijom reaktivnom azotnom vrstom (3, 4).

Visoko statistički značajno smanjenje ( $p < 0.01$ ) aktivnosti ANAE uočeno je u grupi pacijenata sa krvarenjem u plaku i u ispitanika sa kalcifikovanim plakom u odnosu na ukupnu relativnu vrednost skora ovog enzima i njegove vrednosti u oba pola ispitanika sa fibrolipidnim plakom (grafikon 4, slike 3 i 5). Ovi rezultati naše studije, takođe idu u prilog široko zastupljenom gledištu, po kome nakupljanje masnih materija u zidu krvnog suda može da pokrene oslobađanje hidrolitičkih lizozomskih enzima u vanćelijski prostor sa autodestruktivnim posledicama (7). S tim u vezi, uočeno je, takođe, da je količina esteraza direktno proporcionalna stepenu zasićenosti intime lipoproteinima i drugim makromolekulima (8). Poređenjem relativne vrednosti ANAE skora između ispitanika sa intraplakalnom hemoragijom i ispitanika sa egzulceracijom plaka, nađeno je visoko statistički značajno smanjenje ( $p < 0.01$ ) aktivnosti ANAE u grupi ispitanika sa krvarenjem u plaku u odnosu na ukupnu relativnu vrednost skora ovog enzima i njegove vrednosti u oba pola ispitanika sa egzulceracijom plaka (grafikon 4, slike 3 i 4). Osim toga, visoko statistički značajno povećanje ( $p < 0.01$ ) aktivnosti ANAE nađeno je u pacijenata sa egzulcerisanim plakom u odnosu na ukupnu relativnu vrednost skora ovog enzima i njegove vrednosti u oba pola pacijenata sa kalcifikovanim plakom (grafikon 4, slike 4 i 5). Ovi naši rezultati su u saglasnosti sa publikovanim podacima, prema kojima ANAE pozitivnost varira u zavisnosti od stepena aktivacije makrofaga (8). Uz to, oni predstavljaju potvrdu da povećan broj monocita i ostalih zapaljenjskih ćelija, pored ostalog, preko izlučenih esteraznih enzima razgradnjom osnovnog matriksa u vezivnoj kapi plaka, dovode do njegove ulceracije (7, 28).

Uzorci aterosklerozno izmenjene humane karotidne arterije u odnosu na kontrolne vrednosti se razlikuju u pogledu stepena i vrste celularnosti. Ovakav nalaz naše studije ukazuje na aktivnu ulogu monocitno-makrofagnih ćelijskih populacija u nastanku i razvoju karotidnog plaka.

Korelacija aktivnosti ANAE i suženja karotidne arterije u morfološkim grupama pacijenata.- U našem istraživanju utvrđena je visoko statistički značajna ( $p < 0.01$ ) pozitivna korelacija između relativne vrednosti ANAE skora i karotidne stenoze ispitanika sa fibrolipidnim plakom (tabela 1, grafikon 5). Ovaj rezultat je u saglasnosti sa brojnim istraživanjima aterogeneze, koja su istakla značaj makrofaga kao lipofaga, uz preporuku da »lizozomima treba pokloniti pažnju u vaskularnoj patologiji, jer su skoro uvek umešani u odgovor organizma na spoljašnje izazove«

(1-11). Tako se ispitivanjem makrofaga iz ateroskleroznih karotidnih lezija došlo do zaključka da ove ćelije imaju više lipofagnih vakuola i veću aktivnost lizozomskih esteraza,  $\beta$ -glukuronidaze, kisele fosfataze i katepsina. Pokazano je, takođe, da lizozomski enzimi makrofaga imaju stimulacijski efekat na DNK sintezu i pokreću mitotske procese u ćeliji (8). Naš rezultat je u saglasnosti sa citohemijskim nalazima povećane aktivnosti ANAE u toku eksperimentalne ateroskeroze (7, 9, 28). U makrofagima i penastim ćelijama dobijenim iz ateroskleroznih plakova životinja koje su bile na hiperholesterolskoj dijeti nađen je povećan broj lizozoma, sekundarnih lizozoma, fagolizozoma, postlizozoma i rezidualnih tela. Fibrolipidni plak je metabolički veoma dinamična tvorevina, u kojoj imunski kompleksi i drugi imunski efektori ostvaruju svoj uticaj svojevrsnim podešavanjem stepena aktivnosti lizozomskog enzimskeg sistema (28). Pokazano je da ANAE pozitivnost varira u zavisnosti od stepena aktivacije makrofaga (8). Razni lokalni stimulusi (cirkulišući imunski kompleksi, antigeni, ćelijski debris, produkti inflamacijskih procesa, nagomilavanje stranih materija, delovi mikroorganizama, i dr.) mogu da aktiviraju makrofage, i izazovu nakupljanje i otpuštanje lizozomskih enzima (7). Osim toga, preovlađuje mišljenje da bi ANAE mogla učestvovati u antigenskoj prezentaciji i aktivaciji T limfocita (29). Imajući sve ove činjenice u vidu, naš rezultat bi trebalo shvatiti i kao pokušaj dela monocitnog klirens sistema da, pored ostalog, ubrza uklanjanje nagomilanih lipoproteina i imunskih kompleksa.

Pozitivna povezanost relativne vrednosti ANAE skora i karotidne stenoze ispitanika sa krvarenjem u plaku, koja je na nivou statističke značajnosti ( $p < 0.05$ ) (tabela 2, grafikon 6), predstavlja naš rezultat, koji ide u prilog shvatanjima da morfološke promene ateroskleroznog suženja, koje iznenada nastaju u toku intraplakalne hemoragije, mogu da aktiviraju makrofage i njihove lizozomske enzime (30, 31). Prepoznatljiva akutna hemoragija, praćena infiltracijom polimorfonuklearnim leukocitima i ranom fokalnom makrofagnom aktivacijom, uočljiva je u vremenskom periodu do jedne nedelje od pojave erozije fibrozne kape. Dalja promena u intraplakalnoj hemoragiji, praćena u vremenskom intervalu do šest nedelja od pojave erozije fibrozne kape, vezana je za prisustvo intaktnih i raspadnutih eritrocita, pri čemu se hemosiderin nagomilava u lokalnim makrofagima. Zatim, dolazi do formiranja gigantskih ćelija, precipitacije kristala holesterola i početka angioneogeneze na periferiji lezije. Poslednja značajna promena u evoluciji intraplakalne hemoragije, koja je karakteristična za period nakon šest nedelja od pojave erozije fibrozne kape, odnosi se na prisustvo amorfne materijala, koji kada se boji elastohromom, zadobija

tamno prebojenje. Pored toga, formiraju se i krupni depoziti holesterolskih kristala, koji mogu biti praćeni znacima okolne angioneogeneze. Ćelije monocitnog klirens sistema sa "pocepanim membranama", u stanju raspada i prosipanja lizozomskog i vakuolarnog sadržaja, su takođe, često prisutne (31). Prema tome, čini se sasvim izvesnim, da krvarenje u plaku, može da uslovi otpuštanje lizozomskih enzima makrofaga, na šta upućuje i statistički značajna pozitivna povezanost relativne vrednosti ANAE skora i karotidne stenoze ispitanika sa krvarenjem u plaku, koja je registrovana u našoj studiji.

Praćenjem citohemijske aktivnosti ANAE, u našem istraživanju je nađena statistički značajna pozitivna korelacija ( $p < 0.05$ ) između relativne vrednosti ANAE skora i karotidne stenoze ispitanika sa egzulcerisanim plakom (tabela 3 i grafikon 7). Ovakav naš nalaz potkrepljuju i ranija istraživanja značaja egzulceracije karotidnog plaka, koja su pokazala da u jednom trenutku razvoja plaka, makrofagi preopterećeni lipoproteinima gube sposobnost lizozomskih lipoproteinskih transformacija i postaju podložni autolizi. Oslobođanjem lizozomskih enzima u okolna tkiva, potom nastaje nekroza sa egzacerbacijom ateroskleroze i daljim oštećenjem bazalne membrane. Interesantno je napomenuti da je nekroza praćena padom nivoa adenozintrifosfata (ATP) i metaboličkom insuficijencijom ćelija intime, koje su zadužene za uklanjanje lipoproteina. Međutim, pokušaji bližeg definisanja metaboličkih uzroka za prelazak stabilnog u nestabilni plak su još uvek nerazjašnjeni (30, 32). Izgleda da lizozomski enzimi aktiviranih makrofaga imaju neposredan uticaj na nedovoljno istražena metabolička zbivanja u egzulcerisanom plakom. Na takav zaključak bi mogla da nas navede statistički značajna pozitivna korelacija između relativne vrednosti ANAE skora i karotidne stenoze ispitanika sa egzulcerisanim plakom, koja je dobijena kao rezultat našeg istraživanja.

Između relativne vrednosti ANAE skora i karotidne stenoze ispitanika sa kalcifikovanim plakom u našoj studiji je registrovana statistički značajna pozitivna korelacija ( $p < 0.05$ ) (tabele 4, grafikon 8). Pojava kalcijumskih depozita u zidu karotidnog krvnog suda sa izmenjenim morfološkim i mehaničkim osobinama dovodi do značajnih hemodinamskih poremećaja, usled smanjenja elastičnosti i promena kinetike krvne struje u tako izmenjenom krvnom sudu (16, 33). U tim uslovima, nije isključeno da funkcijsko stanje lizozomskog enzimskeg sistema arterijskog zida biva narušeno usled mehaničkog stresa, tj. sila tenzije između rigidnog plaka i znatno elastičnijeg zdravog dela arterijskog tkiva. Ovakvo razmišljanje je u saglasnosti sa našim rezultatom i podacima iz literature, koji se odnose na porast broja lizozoma u fagocitno aktivnim makrofagima u uslovima hipertenzije (34).

**Zaključak**

Registrovane pozitivne linearne korelacije ANAE esteraznog skora i različitog stepena suženja karotidne arterije kod pacijenata sa aterosklerozno promenjenim tkivom ovog krvnog suda mogle bi da

ukažu na značaj aktivnosti ANAE u aterogenezi. One takođe upućuju na potrebu detaljnijeg ispitivanja uloge ovog enzima u tkivu aterosklerozno izmenjenih arterija.

**Literatura**

- Ross R. Atherosclerosis – an inflammatory disease. *N Engl J Med* 1999;340(2):115-26.
- Libby P. Inflammation in atherosclerosis. *Nature* 2002;420(19/26):868-74.
- Hansson GK. Inflammation, atherosclerosis and coronary artery disease. *N Engl J Med* 2005;352:1685-95.
- Vučević D, Radak Đ, Radosavljević T, Mladenović D, Milovanović I. Zapaljenski proces u aterogenezi: nove činjenice o starom plamenu. *Med Pregl* 2012;65(9-10):388-95.
- Hayhoe FGJ, Quagliano D. *Haematological cytochemistry*, Churchill & Livingstone, Edinburgh, London, 1990.
- Rabe KF, Hurd S, Anzueto A. Global strategy for the diagnosis, management and prevention of COPD: GOLD executive summary. *Am J Respir Crit Care Med* 2007;176:532-55.
- Vučević D, Radak Đ, Milovanović I, Radosavljević T, Mladenović D, Stanković M, i sar. Citohemijske karakteristike i uloga ćelijskih nespecifičnih esteraza u aterogenezi. *Med Istraživ* 2012;46(3):24-34.
- Uphoff CC, Drexler HG. Biology of monocyte-specific esterase. *Leukemia and Lymphoma* 2000;39(3-4):257-70.
- Vučević D, Radak Đ, Kovačević D, Milovanović I, Radosavljević T, Mladenović D, i sar. Citohemijska analiza alfa naftil acetat esteraze u ateroskleroznim lezijama humane karotidne arterije. *Med Istraživ* 2012;46(2):33-43.
- Wachstein M, Wolf G. The histochemical demonstration of esterase activity in human blood and bone marrow smears. *J Histochem Cytochem* 1958;6:457.
- Mueller J, Del Re GB, Buerki H, Keller HU, Hess MW, Cottier H. Nonspecific acid esterase activity: a criterion for differentiation of T and B lymphocytes in mouse lymph nodes. *Eur J Immunol* 1975;5:270.
- Đorđević-Denić G, Radak Đ, Cvetković P, Perović M. Cytochemical examination of the amount of lipids in alveolar macrophages during experimental atherosclerosis. *Yugoslav Physiol et Pharmacol Acta* 1987;23(1):105-6.
- Đurić D. Ateroskleroza: epidemiologija, faktori rizika i globalno uspešne intervencije. U: Đurić MD (ur.). *Ateroskleroza: faktori rizika, patogeneza, terapija, prevencija: sa međunarodno prihvaćenim preporukama za prevenciju ateroskleroze*. Društvo fiziologa Srbije (Kragujevac: Grafičar), Beograd, 2005, 7-13.
- Oostrom O. Age-related changes in plaque composition. A study in patients suffering from carotid artery stenosis. *Cardiovasc Pathol* 2005;14:126-34.
- Rapp JH, Owens CD, Johnson MD. Blood vessel and lymphatic disorders. In: Mc Phee SJ, Papadakis MA, editors. *Current Medical Diagnosis and Treatment*. New York, Chicago, London: Mc Graw Hill Companies, Inc; 2011. p. 446-69.
- Rattazzi M, Bennett BJ, Bea F, Kirk EA, Ricks JL, Speer M. Calcification of advanced atherosclerotic lesions in innominate arteries of apoE-deficient mice. Potential role of chondrocyte-like cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2005;25:1420-5.
- Hunter R, Chun Y, Vasily L, Baocheng C, Minako O, Nayak L, et al. Arterial remodeling in the subclinical carotid artery disease. *JACC: Cardiovascular Imaging* 2009;2:1381-9.
- Velkovski S. Bazična istraživanja ateroskleroze i eksperimentalni modeli. U: Đurić MD (ur.). *Ateroskleroza: faktori rizika, patogeneza, terapija, prevencija: sa međunarodno prihvaćenim preporukama za prevenciju ateroskleroze*. Društvo fiziologa Srbije (Kragujevac: Grafičar), Beograd, 2005, 73-78.
- Porth MC. Cellular adaptation, injury and death. In: Porth MC (ed.). *Pathophysiology. Concepts of altered health states*. Lippincott Williams&Wilkins, Philadelphia, 2005, 103-17.
- Lawlor DA. Sex differences in body fat distribution and carotid intima media thickness: cross sectional survey using data from the British regional heart study. *J Epidemiol Community Health* 2004;58:700-4.
- Togay-Isikay C. Carotid artery tortuosity, kinking, coiling: stroke risk factor, marker or curiosity? *Acta Neurol Belg* 2005;105(2):68-72.
- Fujii K, Abe I, Ohya Y, Ohta Y. Risk factors for the progression of early carotid atherosclerosis in a male working population. *Hypertens Res* 2003;26:465-71.
- Sutton-Tyrrell K. Carotid atherosclerosis in premenopausal and postmenopausal women and

- its association with risk factors measured after menopause. *Stroke* 1998;29:1116-21.
24. Makinen J. Increased carotid atherosclerosis in andropausal middle-aged men. *JACC* 2005;45(10):1603-8.
  25. Radovanović N, Ilić T. Korelacija kliničke ekspresije karotidne bolesti sa verifikovanim stepenom suženja karotidnih krvnih sudova. *Med Podmladak* 2011;(1-2):73-7.
  26. Grogan JK. B-mode ultrasonographic characterization of carotid atherosclerotic plaques in symptomatic and asymptomatic patients. *J Vasc Surg* 2005;42:435-41.
  27. Kostić VS, Raičević R i sar. Karotidna bolest-etiologija, patofiziologija, dijagnostika i terapija. Medicinski fakultet u Beogradu/Vojnomedicinska akademija Beograd, Beograd, 2004.
  28. Vučević D, Radak Đ, Radosavljević T, Mladenović D, Milovanović I. Fibrozni plak kao metabolički stadijum aterogeneze. *Med Istraživ* 2009;43(1):35-47.
  29. Sandikci M, Eren U, Kum S. Alpha-naphthyl acetate esterase activity in the spleen, lymph nodes and conjunctiva associated lymphoid tissues of camels (*Camelus dromedarius*). *Revue Méd Vét* 2005;156(2):99-103.
  30. Aikawa M, Libby P. The vulnerable atherosclerotic plaque. Pathogenesis and therapeutic approach. *Cardiovasc Pathol* 2004;13:125-38.
  31. Michel JB, Virmani R, Arbustini E, Pasterkamp G. Intraplaque haemorrhages as the trigger of plaque vulnerability. *Eur Heart J* 2011;32:1977-85.
  32. Stoger JL, Goossens P, de Winther MP. Macrophage heterogeneity: relevance and functional implications in atherosclerosis. *Curr Vasc Pharmacol* 2010;8:233-48.
  33. Allison MA, Hsi S, Wassel CL, Morgan C, Ix JH, Wright CM, et al. Calcified atherosclerosis in different vascular beds and the risk of mortality. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2012;32:140-6.
  34. Cunningham KS, Gotlieb AL. The role of shear stress in the pathogenesis of atherosclerosis. *Lab Invest* 2005;85:9-23.



<sup>1</sup>Vascular surgery Clinic, "Dedinje" Cardiovascular Institute

<sup>2</sup>Belgrade University School of Medicine, Belgrade, Serbia

## SURGICAL TREATMENT OF PORTAL HYPERTENSION

### HIRURŠKO LEČENJE PORTNE HIPERTENZIJE

S. Babić<sup>1</sup>, S. Tanasković<sup>1</sup>, V. Sotirović<sup>1</sup>, Đ. Radak<sup>1,2</sup>

#### Summary

Portal hypertension (PHT) is one of the main causes of morbidity and mortality in patients with severe liver diseases. The most serious complication of PHT is haemorrhage due to rupture of the gastric and esophageal varices and requires primary prophylaxis, acute bleeding management and secondary prophylaxis of re-bleeding. Surgical treatment of PHT developed from invasive total shunt surgery to recent minimal-invasive procedures, but the best therapeutic solution is still a subject of many clinical studies.

In this review, we investigated positives and downsides of current surgical solutions for dealing with portal hypertension.

**Key words:** portal hypertension; surgical treatment; non-invasive procedures

#### Sažetak

Portna hipertenzija (PHT) predstavlja jedan od glavnih uroka mortaliteta i morbiditeta kod pacijenata sa teškim oboljenjem jetre. Najozbiljnija komplikacija PHT je krvarenje, koje nastaje kao poslednica rupture gastričnih i ezofagijalnih varikoziteta i zahteva primarnu profilaksu, zaustavljnje aktivnog krvarenja i sekundarnu profilaksu ponovnog krvarenja. Hirurški tretman PHT se razvijao od invazivne hirurgije da minimalno invazivnih tehnika, ali najbolji terapijski izbor je i dalje predmet velikog broja kliničkih studija. U ovom prikazu literature smo istraživali pozitivne i negativne strane trenutnih hirurških tehnika u lečenje portne hipertenzije.

**Ključne reči:** portna hipertenzija; hirurško lečenje; minimalno invazivne tehnike.

#### Introduction

Portal hypertension (PHT) is one of the complications of liver diseases that most frequently requires surgical treatment, in up to 15% of patients. In a healthy subject at rest, portal pressures range from 60 to 140 mm saline (4 to 10 mmHg), while inferior vena caval (IVC) pressures range from 7-55 mm saline (0.5 to 4 mmHg). Clinically meaningful PHT exists when the difference between portal and IVC pressure (corrected portal pressure) exceeds 150 mm saline (11 mmHg) [1]. The elevated portal vein

pressure leads to an enlargement of all the collateral venous connections between the portal and systemic circulation and to development of varicosities and splenomegaly.

#### Classification of portal hypertension

Based on the anatomic location of the resistance flow, PHT could be classified as presinusoidal or postsinusoidal [2].

Extrahepatic obstruction of the portal vein is responsible for less than 5% of the cases of PH, whereas intrahepatic obstructive disease accounts for more than 95% of cases of PH. Intrahepatic blockages occur in cirrhosis, inborn errors of metabolism, and schistosomiasis. Alcoholic cirrhosis is the most common cause of PHT and produces resistance that is primarily intrasinusoidal or postsinusoidal, while schistosomiasis and biliary cirrhosis produces a presinusoidal blockage. On the other hand, prehepatic obstruction of the portal vein results from congenital atresia, thrombosis, or extrinsic compression. Posthepatic portal hypertension is associated with the rare Budd-Chiari syndrome (thrombosis of the hepatic veins or obstruction of the retrohepatic vena cava). The underlying cause of portal hypertension influences the options for therapy. The most common causes of PHT are shown in Table 1.

#### Treatment options for portal hypertension

The management of PHT includes two methods: operative or non-operative method. Application of the surgical shunts in the 1940s has significantly improved the treatment results of PHT and became gradually the major modality in the treatment. In recent years, the investigation of mechanism of PHT and the development of modern endoscopy have improved the results of medication and endoscopic treatment. At present, shunt and disconnection are commonly used for the treatment of PHT.

The most urgent indication for the surgical treatment of portal hypertension is hemorrhage. Life-threatening hemorrhage results from the rupture of submucosal esophageal varices as a consequence of increased portal pressure and flow. Other causes of upper gastrointestinal tract bleeding are portal hypertensive gastropathy, gastritis, peptic ulcer and

Mallory-Weiss syndrome. However, the severity of varices or the probability of the varices ruptures are not directly related to the measured portal pressure. Each episode of hemorrhage carries a mortality of about 50%. After bleeding stops, the likelihood of recurrent bleeding without specific therapy to reduce portal pressure is about 75% [2]. In recently published meta-analysis [3], the portosystemic shunting procedures were compared with the endoscopic therapy (ET) of variceal haemorrhage. Researchers found that shunt therapy compared with ET demonstrated significantly less re-bleeding (OR 0.24, 95% CI 0.18 to 0.30) at the cost of significantly increased acute hepatic encephalopathy (OR 2.07, 95% CI 1.59 to 2.69) and chronic encephalopathy (OR 2.09, 95% CI 1.20 to 3.62). Also, differences regarding mortality were not significant, while the proportion of the patients with shunt occlusion or dysfunction was 3.1% (95% CI 0.4 to 10.7%) for total shunt, 7.8% (95% CI 3.8 to 13.9%) for distal splenorenal shunt, and 59% (range 18% to 72%) for TIPS.

Table 1. The common causes of PHT

Extrahepatic Disease	Intrahepatic Obstructive Disease
Portal vein obstruction	Alcoholic cirrhosis
Thrombosis due to infection or trauma	Posthepatic cirrhosis
Cavernomatous transformation	Biliary cirrhosis (primary and secondary)
Congenital atresia or stenosis	Toxic (chemical or drug) cirrhosis
Extrinsic compression	Metabolic (genetic) cirrhosis
Hepatic vein (outflow) obstruction	(hemochromatosis)
Budd-Chiari syndrome	Nutritional cirrhosis (after intestinal bypass)
Constrictive pericarditis	Other forms of cirrhosis (cryptogenic, congestive, etc.)
Excessive portal blood flow	Alcoholic hepatitis
Arteriovenous fistula between hepatic artery and portal vein	Neoplasms and granulomas
Arteriovenous fistula between splenic artery and vein	Schistosomiasis
	Venoocclusive disease
	Congenital hepatic fibrosis
	Hepatoportal sclerosis

PHT- Portal hypertension

The portal pressure can be reduced below the critical threshold by various operative techniques. All shunts are aimed to reduce variceal pressures sufficiently to arrest or prevent bleeding. Extrahepatic portal hypertension is one of the most common entities wherein shunt surgery is performed with success. Surgical shunts are classified as: 1. Total; 2. selective or; 3. partial shunts based on their specific hemodynamic properties. An angiographically placed

stent or transjugular intrahepatic portacaval shunt (TIPS), are also treatment options.

**1. Total shunts**

Total shunts completely divert portal blood flow into the systemic circulation and arrest hemorrhage in about 95% of cases, but with a 40% to 50% incidence of hepatic encephalopathy. In emergency situations, when bleeding cannot be controlled by less invasive means, total shunts may be lifesaving and encephalopathy becomes a secondary consideration. Another advantage of total shunts is that these shunts have a wider diameter with rare shunt thrombosis incidence. However, total shunts have several disadvantages: no portal vein flow to the liver results in diversion of hepatotropic factors and leading to deterioration of liver functions, and up to 40% of patients develop encephalopathy over the long time. Also, thrombosis of the shunt is frequent if graft is utilized and ascites does not get relieved after the shunt surgery. In four controlled trials in the United States that compared the use of total shunts with controls, three demonstrated poorer survival in shunted than in non-shunted patients, [4-6] and one showed no significant difference [7]. Whereas shunting decreased the risk of death from hemorrhage, deaths from liver failure overshadowed this advantage. For this reason, shunts are performed after (or sometimes during) the first episode of hemorrhage [8].

**1.1. Portacaval shunt**

The two different surgical techniques in portacaval shunts are the end to side portacaval shunt as first described by Eck [9] and the side to side shunt. Portal blood is completely redirected into the IVC below the liver and the hepatic end of the portal vein is oversewn in the end to side shunt. Another total shunt is the side-to-side portacaval shunt. The difference from the end-to-side shunt is that the portal vein is not transected in the side-to-side shunt. The side to side portacaval shunt allows blood from the intestine and the spleen to flow easily into the IVC. In addition, the hepatic end of the portal vein is changed into an outflow tract thus decreasing sinusoidal hypertension. Therefore it is the shunt of choice in Budd-Chiari post hepatic PHT, resulting in long term palliation of the disease with arrest or delay in the progression of hepatic fibrosis and ultimate failure [10].

In patients with an unsuitable splenic vein, a portocaval H-grafts shunts are preferred [11] over mesocaval shunts [12] since a shorter graft is needed, probably has a lower occlusion and postoperative ascites rate, and can easily be taken down during liver transplantation.

Collins et al. [11] reported 95% cumulative shunt patency over 7-years follow-up period and 65% survival after 5 years, with re-bleeding in 8% of the

patients. However, 30-day mortality in this cohort was 7.7%. Rosemurgy et al. [13] in a study group of 33 patients noted re-bleeding in 5.4 % of patients and 97% cumulative shunt patency during 4-years follow-up with de novo encephalopathy in 5% of their patients.

### 1.2. Mesocaval shunt

Mesocaval shunt is either constructed directly as a side to side anastomosis between the two veins or with the interposition of a short autologous vein graft - internal jugular vein or a prosthetic graft [14]. This shunt is indicated in patients with central thrombosis of portal vein. Vein graft is preferred as the incidence of thrombosis is particularly less. It has been used in children in a variety of settings and diseases with uniformly acceptable results [15]. This option is preferred by some surgeons as it allows an anastomosis between two large diameter vessels and because the length of the anastomosis can be increased to some extent to facilitate the creation of a large venous fistula. Splenectomy necessarily need not be done, except in cases with hypersplenism and so preventing post splenectomy sepsis [16]. A disadvantage of the mesocaval H graft is that the graft is relatively long, so there is a greater risk of graft occlusion by kinking or thrombosis.

Paquet et al. [12] reported 95% cumulative mesocaval H-graft shunt patency over 6-years follow-up period and 68% survival after 5 years. Also, Orozco and Mercado [17] reported 70% survival rate during 5-years follow-up period with 4.5% incidence of re-bleeding.

### 1.3. Proximal Splenorenal shunt (Linton)

It is valuable for the treatment of patients with severe hypersplenism and thrombocytopenia, because the spleen has been removed at the onset of the operation, facilitating thrombocytosis and coagulation. Extrahepatic portal hypertension in children, produced by the portal vein neonatal thrombosis, causing oesophageal variceal haemorrhage at any age from birth to adolescence can be relieved by a central splenorenal venous anastomosis, sometimes as small as 4 mm in diameter, with only an 8% chance of failure. The only issue is that children virtually never die from variceal bleeding, because their compensatory systems are so resilient.

Prasad et al. [18] performed 160 proximal splenorenal shunt surgery and reported overall operative mortality rate 1.9% (3/160); 0.7% (1/140) after elective operations and 10% (2/20) after emergency operations. Also, in this series, re-bleeding occurred in 17 patients (11%), but none of the patients developed encephalopathy. In addition, survival rate was good; 95% after 15 years follow-up.

### 2. Selective Shunts

The distal splenorenal shunt was developed to avoid the high rate of encephalopathy associated with

the use of total shunts [19]. Anastomosing the distal splenic vein to the left renal vein selectively decompresses the gastric and splenic veins, while maintaining relatively high pressures in the mesenteric and portal veins. Dividing the left gastric (coronary) vein and disconnecting the gastrosplenic and portomesenteric compartments by collateral ligation, remains an important part of the procedure [20,21].

Hepatopedal blood flow is preserved initially, with a low incidence of encephalopathy. In patients with alcoholism, collateral channels tend to dilate over time, eventually converting the selective shunt to a total one [22]. This shunt is rarely used in emergencies because portal decompression is selective, requiring time for bleeding to stop, and the procedure itself is time-consuming. A meta-analysis of four randomized trials that compared the use of the distal splenorenal shunt with that of sclerotherapy found that the Warren shunt reduced the risk of re-bleeding, did not worsen encephalopathy, and improved survival in nonalcoholic patients [23]. Patients with alcoholism did not have improved survival. As an elective procedure in patients with portal hypertension from causes other than alcoholic cirrhosis, the Warren shunt surgical procedure is an effective and durable operation with extensive application worldwide. In several series [24-26], control of hemorrhage is nearly equivalent to that for total shunts (> 89%) and the incidence of encephalopathy is less than 17%. Also, survival rate is similar as for total shunts; after 5 years follow-up is 60-85%. The Warren distal splenorenal shunt is particularly well suited for managing patients with extrahepatic portal vein thrombosis, of whom about 80% will have a patent splenic vein and thus be candidates for this procedure [27].

In children distal splenorenal shunting is used primarily in subject with extra hepatic portal vein thrombosis, stable Child class A or B cirrhosis or less common forms of intrahepatic portal hypertension such as congenital hepatic fibrosis with well preserved liver function but symptomatic variceal bleeding. It has also shown a lot of benefit in children with advanced hypersplenism [28].

### 3. Partial shunts

Partial shunts were first proposed by Bismuth and associates [29]. Variceal bleeding occurs above a corrected portal pressure threshold of 12 mm of mercury. Partial decompression of the portal vein to a pressure less than the critical threshold should stop variceal hemorrhage while preserving hepatopedal blood flow and preventing encephalopathy.

Sarfey and al. [30] reported a prospective, randomized trial comparing the use of large-diameter total shunts with that of small-diameter partial shunts interposed between the portal vein and vena cava. Both shunts were 100% effective in controlling hemorrhage

with long-term patency over 95%. Partial shunts preserved hepatopedal flow in 90% of patients and had a notably reduced incidence of encephalopathy.

The use of a small-diameter H graft is recommended for patients with Child class A or B alcoholic cirrhosis and at least one previous episode of variceal hemorrhage [31]. Although this procedure has succeeded in the emergency control of the bleeding and in patients with Child class C cirrhosis, the associated high mortality (around 50%) is unacceptable. In class C cirrhosis that could not be improved by medical treatment, a rational alternative is TIPS followed by liver transplantation.

### Non Shunt surgery – Devascularisation

Various esophagogastric devascularization procedures have been used as both emergency and elective treatment of bleeding esophageal varices. These devascularisation procedures, also known as portal non-decompressive procedures or porto-azygos disconnection include procedures which aim to control the gastroesophageal varices either by direct on varices (variceal ligation of esophageal varices or esophageal/gastric transection) or by disconnecting varices from their feeding vessels. The main steps of the procedure described by Siguira and Futagawa [32] involves transthoracic extensive devascularisation of lower esophagus from the level of the left inferior pulmonary vein up to the diaphragm, esophageal transection followed by end to end anastomosis, transabdominal devascularisation of upper half of the stomach, splenectomy, vagotomy and pyloroplasty. According to recommendations, indication for devascularization procedures are: idiopathic PTH, patients with Child class A or B cirrhosis, extrahepatic PTH, and patients who do not show shuntable venous vessels. Sugiura and Futagawa [32] in 1984 reported 4.3% operative mortality and 2.3% rebleeding rate, with 80% survival after 5 years follow-up. However, reported mortality rate of 16-60% and rebleeding rate of 20-64% [33], led the Siguira procedure into disrepute because of high mortality and high incidence of rebleeding.

Transjugular intrahepatic portosystemic shunt (TIPS)

In essence TIPS is a side-to-side portosystemic shunt with decompression in the portal system similar as surgical shunts. Depending on the shunt diameter various amounts of portal flow volume are diverted from high-resistance liver parenchyma into the systemic venous circulation. Hemodynamically, TIPS differs little from surgical shunt procedures [34]. Therefore the rate of postshunt encephalopathy does not differ considerably in comparable stages of liver function and shunt diameter [34-36].

Indications for TIPS placement are:

- Acute variceal bleeding that cannot be successfully controlled with medical treatment, including sclerotherapy
- Recurrent and refractory variceal bleeding or recurrent variceal bleeding in patients who cannot tolerate conventional medical treatment, including sclerotherapy and pharmacologic therapy
- Therapy for refractory ascites [37]
- Portal decompression in patients with hepatic venous outflow obstruction (Budd-Chiari syndrome), [38] hepatic hydrothorax, or hepatorenal syndrome
- Contraindications include the following:
- Right-sided heart failure with increased central venous pressure
- Polycystic liver disease
- Severe hepatic failure
- Active intrahepatic or systemic infection
- Severe hepatic encephalopathy poorly controlled with medical therapy
- Hypervascular hepatic tumors

There are both advantages and disadvantages of TIPS over surgical shunts. TIPS can be performed under local anesthesia with a low procedure-related morbidity and mortality (0.5–4%). Hence TIPS represents the better option for emergencies, ascites, poor liver function and high operative risk. TIPS can be calibrated or occluded at any time if liver failure occurs. However, a high rate of dysfunction caused by stenosis and occlusion is still the main drawback to TIPS.

A major concern of a newly placed TIPS is new-onset or worsened encephalopathy, which occurs in about 25% of treated patients [39,40]. Patients with preprocedural hepatic encephalopathy or Child class C cirrhosis are more likely to have this complication. In a retrospective case analysis of 136 patients post-TIPS by Masson et al, hepatic encephalopathy developed in 34.5% of patients, and the frequencies were similar with covered and uncovered stents. The most significant predicting factor was the presence of pre-TIPS hepatic encephalopathy. Minimal encephalopathy occurred in 49% of patients at 26-month follow-up; and 10.3% of patients developed post-TIPS encephalopathy that required liver transplantation or contributed to death. The authors concluded that although post-TIPS hepatic encephalopathy is rather common, it is usually short-lived and well managed if patients are carefully selected for the procedure [39].

This requires close surveillance by Doppler-ultrasound and interventional correction to maintain or to restore shunt patency. The incidence of TIPS stenosis or occlusion which requires at least one re-

intervention is reported to be 30–70% after 1 year [34, 35]. The problem of late TIPS stenosis and dysfunction may be overcome by polytetrafluoroethylene (PTFE) covered stents (stent grafts). By improving the patency rate TIPS may evolve from a multistage to a one-step procedure in the future [34]. On the other hand, the mortality rates of elective shunt surgery in good-risk patients can be kept near zero in experienced centers [41–43].

In conclusion, portal hypertension is one of the main causes of morbidity and mortality in patients with severe liver diseases. The most serious complication of PHT is haemorrhage due to rupture of gastric and

esophageal varices and requires primary prophylaxis, acute bleeding management and secondary prophylaxis of re-bleeding. In past decades, management of PHT developed from invasive total shunt surgery to recent minimal-invasive procedures. However, due to lack of clear evidences, procedure effectiveness and relatively high procedure and post-procedures complications, best therapeutic solution is still subject of many clinical studies. Furthermore, future investigations also need to give strong criteria for appropriate patient selection for surgical therapy in different stage of this life-threatening disease.

## References

1. Reynolds TB, Ito S, Iwatsuki S. Measurement of portal pressure and its clinical application. *Am J Med.* 1970 Nov;49:649-57.
2. Way LW: Portal hypertension, In *Current Surgical Diagnosis and Treatment*, 10th edition. Norwalk, Conn, Appleton & Lange, 1993, pp 521-527
3. Khan SA, Tudur Smith C, Williamson PR, Sutton R, Portosystemic shunts versus endoscopic therapy for variceal rebleeding in patients with cirrhosis (Review) 2009 The Cochrane Collaboration. Published by JohnWiley & Sons, Ltd.
4. Conn HO, Lindemuth WW: Prophylactic portacaval anastomosis in cirrhotic patients with esophageal varices-Interim results, with suggestions for subsequent investigations. *N Engl J Med* 1968; 279:725-732
5. Jackson FC, Penfin EB, Smith AG, Dagradi AE, Nadal HM: A clinical investigation of the portacaval shunt-II. Survival analysis of the prophylactic operation. *Am J Surg* 1968; 115:22-42
6. Resnick RH, Chalmers TC, Ishihara AM, et al: A controlled study of the prophylactic portacaval shunt-A final report. *Ann Intern Med* 1969; 70:675-688
7. Conn HO, Lindemuth WW, May CJ, Ramsby GR: Prophylactic portacaval anastomosis-A tale of two studies. *Medicine (Baltimore)* 1972; 51:27-40
8. Knechtle SJ: The place of Porta systemic shunting. Blumgart: *Surgery of liver and biliary tract* 3rd Edition 1927-43, 2000.
9. Eck: On the question of ligation of portal vein. *Voyenno med* 1973;130:1
10. Ahn et al: Selective surgical therapy of Budd Chiari syndrome. *J Vascular Surgery* 1987;2:183-88
11. Collins C, Ong J, Rypins EB, Sarfeh IJ (1998) Partial portacaval shunt for variceal hemorrhage. Longitudinal analysis of effectiveness. *Arch Surg* 133:590–593
12. Paquet KJ, Lazar A, Koussouris P, Hotzel B, Gad HA, Kuhn R, Kalk JF (1995) Mesocaval interposition shunt with small-diameter polytetrafluoroethylene grafts in sclerotherapy failure. *Br J Surg* 82:199–203
13. Rosemurgy AS, Serafini FM, Zweibel BR, Black TJ, Kudryk BT, Nord HJ, Goode SE (2000) Transjugular intrahepatic portosystemic shunt vs. small-diameter prosthetic H-graft portacaval shunt: extended follow-up of an expanded randomised prospective trial. *J Gastrointest Surg* 4:589–597
14. Drapanas et al: Interposition mesocaval shunt for the treatment of portal hypertension. *Ann Surg* 1972;176:435-48
15. Altman RP: Portal decompression by interposition mesocaval shunt in Biliary Atresia patients. *JPS*1976;11:809-14
16. Hay JM et al: Experience with internal jugular vein interposition graft. *Chir pediatric* 1982;23:211-213
17. Orozco H, Mercado MA (2000) The evolution of portal hypertension surgery. Lessons from 1000 operations and 50 years' experience. *Arch Surg* 135:1389–1393
18. Prasad SA, Gupta S, Kohli V, Pande GK, Sahni P, Nundy S (1994) Proximal splenorenal shunts for extrahepatic portal venous obstruction in children. *Ann Surg* 219:193–196
19. Warren WD, Zeppa R, Foman JS: Selective transsplenic decompression of gastroesophageal varices by distal splenorenal shunt. *Ann Surg* 1967; 166:437-455
20. Warren WD, Millikan WJ Jr, Henderson JM, et al: Splenopancreatic disconnection-Improved selectivity of distal splenorenal shunt. *Ann Surg* 1986; 204:346-355
21. Rikkers LF, Jin G: The distal splenorenal shunt. *Probl Gen Surg* 1992; 9:513-527

22. Henderson JM, Millikan WJ Jr, Wright-Bacon L, Kutner MH, Warren WD: Hemodynamic differences between alcoholic and nonalcoholic cirrhotics following distal splenorenal shunt-Effect on survival? *Ann Surg* 1983; 198:325-334
23. Spina GP, Henderson JM, Rikkers LF, et al: Distal splenorenal shunt versus endoscopic sclerotherapy in the prevention of variceal rebleeding-A meta-analysis of 4 randomized clinical trials. *J Hepatol* 1992; 16:338-345
24. Henderson JM, Nagle A, Curtas S, Geisinger M, Barnes D (2000) Surgical shunts and TIPS for variceal decompression in the 1990s. *Surgery* 128:540-547
25. Jenkins RL, Gedaly R, Pomposelli JJ, Pomfret EA, Gordon F, Lewis WD (1999) Distal splenorenal shunt. Role, indications, and utility in the era of liver transplantation. *Arch Surg* 134:416-420
26. Rikkers LF, Jin G, Langnas AN, Shaw BW Jr (1997) Shunt surgery in the era of liver transplantation. *Ann Surg* 226:51-57
27. Warren WD, Henderson JM, Millikan WJ, Galambos JT, Bryan FC: Management of variceal bleeding in patients with noncirrhotic portal vein thrombosis. *Ann Surg* 1988; 207:623-634
28. Shilyyansky J et al: Distal splenorenal shunt for the treatment of severe thrombocytopenia. *J Gastro Surg* 1999;3,167-72
29. Bismuth H, Franco D, Hepp J: Portal-systemic shunt in hepatic cirrhosis- Does the type of shunt decisively influence the clinical result? *Ann Surg* 1974; 179:209-218
30. Sarfeh IJ, Rypins EB: Partial versus total portacaval shunt in alcoholic cirrhosis-Results of a prospective, randomized clinical trial. *Ann Surg* 1994; 219:353-361
31. Collins JC, Rypins EB, Sarfeh IJ: Narrow-diameter portacaval shunts for management of variceal bleeding. *World J Surg* 1994; 18:211-215
32. Sugiura M, Futagawa S. Esophageal transection with paraesophagogastric devascularizations (the Sugiura procedure) in the treatment of esophageal varices. *World J Surg*. 1984 Oct;8(5):673-9.
33. Orloff MJ, Orloff MS, Girard B, Orloff SL (2002) Bleeding esophagogastric varices from extrahepatic portal hypertension: 40 years' experience with portal- systemic shunt. *J Am Coll Surg* 194:717-730
34. Roesch J, Keller FS (2001) Transjugular intrahepatic portosystemic shunt: present status, comparison with endoscopic therapy and shunt surgery, and future prospectives. *World J Surg* 25:337-346
35. DeFranchis R (2001) Portal hypertension III. Proceedings of the third Baveno International Consensus Workshop. Blackwell, Oxford
36. Burroughs AK, Vangeli M (2002) Transjugular intrahepatic portosystemic shunt versus endoscopic therapy: randomized trials for secondary prophylaxis of variceal bleeding: an updated meta-analysis. *Scand J Gastroenterol* 37:249-252
37. Salerno F, Cammà C, Enea M, Rössle M, Wong F. Transjugular intrahepatic portosystemic shunt for refractory ascites: a meta-analysis of individual patient data. *Gastroenterology*. Sep 2007;133(3):825-34
38. Olliff SP. Transjugular intrahepatic portosystemic shunt in the management of Budd Chiari syndrome. *Eur J Gastroenterol Hepatol*. Nov 2006;18(11):1151-4.
39. Sanyal AJ, Freedman AM, Luketic VA. Transjugular intrahepatic portosystemic shunts compared with endoscopic sclerotherapy for the prevention of recurrent variceal hemorrhage. A randomized, controlled trial. *Ann Intern Med*. Jun 1 1997;126(11):849-57.
40. Sanyal AJ, Freedman AM, Shiffman ML. Portosystemic encephalopathy after transjugular intrahepatic portosystemic shunt: results of a prospective controlled study. *Hepatology*. Jul 1994;20(1 Pt 1):46-55
41. Orozco H, Mercado MA (2000) The evolution of portal hypertension surgery. Lessons from 1000 operations and 50 years' experience. *Arch Surg* 135:1389-1393
42. Henderson JM, Nagle A, Curtas S, Geisinger M, Barnes D (2000) Surgical shunts and TIPS for variceal decompression in the 1990s. *Surgery* 128:540-547
43. Hillebrand DJ, Kojouri K, Cao S, Runyon BA, Ojogho O, Conception W (2000) Small-diameter portacaval Hgraft shunt: a paradigm shift back to surgical shunting in the management of variceal bleeding in patients with preserved liver function. *Liver Transpl* 6:459-465

<sup>1</sup>General hospital Doboj

<sup>2</sup>Health center «ORS Hospital» Belgrade

<sup>3</sup>Center for Burns, Plastic and Reconstructive Surgery, Belgrade

<sup>4</sup>FZORS Banja Luka

<sup>5</sup>General hospital Prijedor

## INFLUENCE OF RADICALITY SURGICAL EXCISION ON RESULTS IN THE TREATMENT OF BASOCELLULAR SKIN CARCINOMA (BCC)

### UTICAJ RADIKALNOSTI HIRURŠKE EKSCIZIJE NA REZULTATE LEČENJA BAZOCELULARNOG KARCINOMA KOŽE (BCC)

D. Lukić<sup>1</sup>, P. Lazić<sup>1</sup>, J. Bandić<sup>2</sup>, Z. Tačević<sup>3</sup>, N. Babić<sup>4</sup>, D. Ivić<sup>5</sup>

#### Summary

With the prospective study, from June 2003 to January 2013, were compared the results of treatment of basocellular carcinomas (BCC) of the skin in 210 respondents. The respondents were divided into 3 groups. The first group, group A (61 respondents) consisted of respondents treated for BCC with surgical excision, with distance incision of 1 cm from the tumor. In the second group, group B (79 respondents) were classified respondents treated for BCC with surgical excision, at distance incision 2 cm from the tumor, while the third group, group C (70 respondents) was classified by respondents treated with surgical excision of BCC, at distance incision approximately 3cm from the tumor.

The parameters for comparison of treatment results were: the method (radicality) of treatment, number of the relapse, elapsed time from surgery to relapse and subsequent disfigurement.

The aim of this study was to determine the optimal radicality in the treatment of BCC, i.e., the number of relapses in relation to the radicalism of the BCC excisions.

In most of the respondents, intraoperative skin defect was closed by direct suture. Spare distance, from the edge of the BCC, which amounts to 1 cm in group A, results in significantly lower percentage of disfigurement. At the same time, in group A was recorded the highest number of recurrences of BCC. Radical surgeries of BCC, which were performed with the resection margin of 3 cm from the BCC, resulted in the lowest number of relapses, but statistically significant percentage of postoperative disfigurement. The most optimal excisional distance from the edge of the BCC is about 2 cm. Due to the significantly smaller number of disfigurement, resections distance of 2 cm from the BCC and direct suture of postoperative defect

take precedence, regardless of the localization of the tumor.

**Key words:** skin, tumors, treatment

#### Sažetak

Prospektivnom studijom, u periodu od juna 2003. januara 2013. godine, upoređivani su rezultati liječenja bazocelularnog karcinoma (BCC) kože kod 210 ispitanika. Ispitanici su podijeljeni u 3 grupe. Prvu, grupu A (61 ispitanika), činili su ispitanici liječeni od BCC hirurškom ekscizijom sa distancom incizije od tumora od 1cm. U drugu, grupu B (79 ispitanika), svrstani su ispitanici liječeni od BCC hirurškom ekscizijom sa distancom incizije od tumora 2 cm., dok su u treću, grupu C (70 ispitanika), svrstani ispitanici liječeni od BCC hirurškom ekscizijom, sa distancom incizije od tumora prosječno 3cm.

Parametri za poređenje rezultata liječenja bili su: metod (radikalnost) liječenja, broj recidiva, vrijeme proteklo od operacije do recidiva i posljedično unakaženje.

Cilj rada bio je da se utvrdi, optimalna radikalnost u liječenju BCC, odnosno, broj recidiva u odnosu na radikalnost pri ekscizijama BCC.

Kod najvećeg broja ispitanika, intraoperativni defekt kože zatvoren je direktnom suturom. Poštedna distanca od ruba BCC koja iznosi 1cm u grupi A, rezultuje statistički značajno manjim procentom unakaženja. Istovremeno, u grupi A zabilježen je najveći broj recidiva BCC.

Radikalne operacije BCC koje su ivedene sa resekcijom ivicom od 3 cm od BCC rezultovale su najmanjim brojem recidiva ali i statistički značajnim procentom postoperativnog unakaženja.

Najoptimalnija ekscizionna distanca od ruba BCC je oko 2 cm. Zbog statistički značajno manjeg broja unakaženja, resekcijona distanca 2 cm od BCC i

*direktna sutura postoperativnog defekta imaju prednost, bez obzira na lokalizaciju tumora.*

**Ključne riječi:** koža, tumori, liječenje

## Introduction

Basocellular carcinoma (BCC) is the most common cause of postoperative disfigurement on the face in people who had not promptly identified and removed this malignant disease.<sup>1</sup> This type of skin cancer usually appears as a harmless erosion of the epidermis, accompanied by a slight arborization of blood vessels and discrete ulcers that bleed occasionally. Crust that covers the focus of BCC occasionally falls off and makes a new form, giving a harmless appearance of lesion for a long time.<sup>2</sup>

Frequent bleedings are the most common reason of sending the patient to the dermatologist. Dermatologic examination that involves Dermascopy will precisely confirm that it is BCC.<sup>3</sup>

When BCC is diagnosed in time, it requires less sufficient surgical excision, which will usually lead to cure. Any post excisional defect of minor BCC lesion, can be reconstructed by direct suture and usually without disfigurement.<sup>1-3</sup> This is particularly important when the BCC is positioned on the face of the patient.

On the contrary, when locally advanced BCC is neglected, radical excision is required, which inevitably leads to a certain degree of disfigurement. Regardless of the extent of the lesion, there is the question of optimal radicality of surgical excision of BCC. Ideal radicalism would be the one that eradicates the tumor without any traces, which might disfigure the patient in any percentage.<sup>4</sup>

As there is no perfect solution, the optimal radicalism implies the distance of excisional cut of BCC, which will mean local sterilization and prevent the growth/recurrence of BCC. At the same time, it is necessary to choose the method for the reconstruction post excisional defect that will cause less damage to the patient's appearance, considering the size of previously removed lesions.<sup>5</sup>

There is no universal formula for both these problems. Rather, the scope of radicalism and reconstruction of the postoperative defect are in the zone of surgeon's estimate that must have measure, knowledge and resolve to do the best for his patient.

## Goal

The aim of this study was to determine the optimal radicalism in the treatment of BCC, i.e., the number of relapses in relation to the radicalism of the BCC excisions. At the same time, the aim of this study was the analysis of the frequency of disfigurement as the consequence of the surgical treatment of BCC.

## Respondents and methods

A prospective clinical study, which lasted from June 2003 to January 2013, included respondents treated for BCC of the skin. Respondents were divided into 3 groups.

The first group, group A (61 respondents) consisted of respondents treated for BCC with surgical excision with distance incision of 1 cm from the tumor. In the second group, group B (79 respondents) were classified respondents treated for BCC with surgical excision, distance incision of 2 cm from the tumor, while the third group, group C (70 respondents) was classified by respondents treated for BCC with surgical excision, distance of incision approximately 3cm from the tumor. For diagnosis were used: medical history, clinical examination and computerized dermoscopy, and after excision the definitive pathohistological analysis.

Tables 1, 2 and 3 show the distribution of respondents by gender, age and anatomic position of the BCC whereas Table 4 shows clinical finding of BCC, or the degree of lesions progression.

*Table 1. Respondents by gender*

Gender	Group A	Group B	Group C
Male	34(55.7%)	43(%)	38(54.3)
Female	27(44.3%)	36(%)	32(45.7%)
Total	61(100%)	79(100%)	70(100%)

*Table 2. Respondents by age*

Age	Group A	Group B	Group C
20-30	2(3.3%)	1(1.2%)	4(5.7%)
30-40	3(4.9%)	1(1.2%)	3(4.2%)
40-50	11(18.1%)	16(20.3%)	12(17.2%)
50-60	18(29.5%)	26(32.9%)	18(25.8%)
Over 60	27(44.2%)	35(44.4%)	33(47.1%)
Total	61(100%)	79(100%)	70(100%)

*Table 3. The distribution of respondents according to anatomic position of the BCC*

Position	Group A	Group B	Group C
Head	35(57.3%)	33(41.8%)	41(%)
Neck	5(8.3%)	4(5.1%)	6(%)
Chest and abdomen	13(21.4%)	19(24.1%)	5(%)
Back	4(6.6%)	15(18.9%)	6(%)
Upper extremities	2(3.2%)	6(7.5%)	5(%)
Lower extremities	2(3.2%)	2(2.6%)	7(%)
Total	61(100%)	79(100%)	70(100%)



Table 4. Local finding

Condition of lesion	Group A	Group B	Group C
Small, limited lesion	51(83.6%)	58(73.5%)	40(57.2%)
Progressed lesion	10(16.3%)	21(26.5%)	30(42.8%)
Total	61(100%)	79(100%)	70 (100%)

**Results**

Results of the treatment of BCC in the investigated groups are shown in Tables 4-7 and Figure 1- 2. Parameters for comparison were: the method of reconstruction on post excision defect, number of relapses, the time elapsed from excision of tumor to relapse and postoperative disfigurement.

Table 4. Result- the method of reconstruction post excision defect

Method	Group A	Group B	Group C
Direct suture	51(83.7%)	63(79.7%)	13(18.6%)
Skin transplant	0(0%)	0(%)	30(42.8%)
Flap	10(16.3%)	16(20.3%)	27(38.6%)
Total	61(100%)	79(100%)	70(100%)

Table 5. Result – relapse

Relapse	Group A	Group B	Group C
Yes	14(22.9%)	6(7.6%)	6(8.5%)
No	47(77.1%)	73(92.4%)	64(91.5%)
Total	61(100%)	79(100%)	70(100%)

Figure 1. Result – relapse

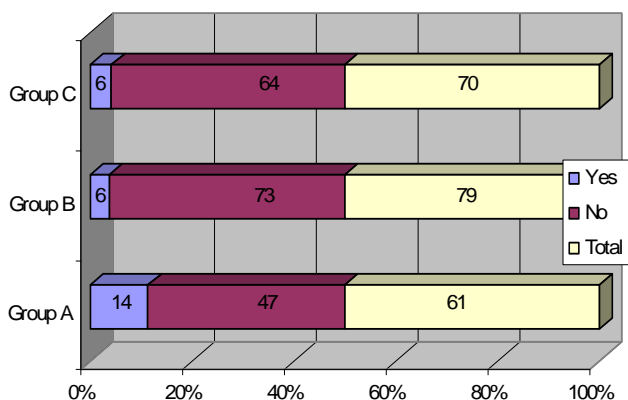


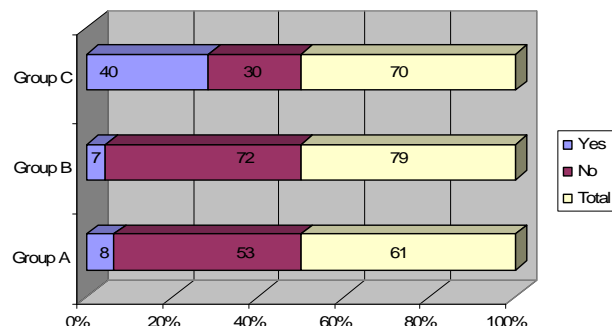
Table 6. Result-time from surgery until relapse

Time (months)	Group A	Group B	Group C
16x2	14	11	
24x2	22	14	
27x2	26	23	
33x3	22	26	
35x3	26	33	
40x2	40	36	
Total	14	6	6

Table 7. Result - postoperative disfigurement

Disfigurement	Group A	Group B	Group C
Yes	8(13.2%)	7(8.8%)	40(%)
No	53(86.8%)	72(%)	30(%)
Total	61(100%)	79(100%)	70(100%)

Figure 2. Result - postoperative disfigurement



Statistical analysis determined the difference between individual groups of respondents in the following characteristics:

- Between groups A and C in terms of the characteristics of the method of reconstruction post excision defect (p <0.01, 99% confidence), Z = 2.33542
- Between groups B and C in terms of the characteristics of the method of reconstruction post excision defect (p <0.01, 99% confidence), Z = 3.99274
- Between groups A and B in terms of the characteristics of relapse (p <0.05 - not highly significant)
- Between groups A and C in terms of the characteristics of relapse (p <0.05 - not highly significant)
- Between groups A and C in terms of the characteristics of postoperatively disfigurement (p <0.01, 99% confidence), Z = 3.6926
- Between groups B and C in terms of the characteristics of postoperatively disfigurement (p <0.01, 99% confidence), Z = 2.1023

## Discussion

Basocellular carcinoma (BCC) of the skin is the most common non-melanoma cancer. For the BCC is true that it more often occurs in males and older age, but recent analyses show increasing incidence of skin cancer among younger people. They can also be seen in children.<sup>6</sup>

Of our 210 respondents with skin cancer, 95(45, 3%) were female and 115 (34, 7%) male. The youngest respondent was 22 years old and the oldest 75 years.

BCC begins as a small, waxy node, which often shows several small telangiectasias (chronic dilated blood vessels on the surface of the skin). A node typically increases slowly and often goes through a specific ulceration. The typical lesion is then made by successive ulcer enlargement surrounded by pearly curved edge.<sup>7</sup>

Our research has shown that the majority of patients underwent surgery at the stage of tumor development that can be characterized as "small, well circumscribed lesion". By this characteristic, there were no statistical differences between groups A, B and C.

Basocellular carcinomas usually appear as single lesions, but can often appear more foci of BCC, and at the same time or one after the. Bleeding from the tumor foci usually comes in the later stage of BCC development. This sporadic bleeding in nearly all respondents led to a visit to the doctor.

Most BCC have limited potential for growth, however, they may occasionally be infiltrative and aggressive and then reach a significant size and penetrate deeply. On the face, it can ruin the eyes and nose, or it can penetrate the skull and attack meninx. In this form, this tumor can be fatal.<sup>8</sup>

Quick diagnosis, especially of the initial lesion, is possible before surgery by applying computer (digital) Dermoscopy. This diagnosis allows timely detection of the character of the lesion and radical removal of BCC, which reduces the risk of relapse and improves the prognosis of treatment.

A small number of our respondents had the tumor in locally advanced stage of BCC and without significant statistical difference between the observed groups. A number of locally advanced BCC in our respondents, was recorded on the scalp (within group C), probably due to the position of the BCC. In one patient in group C, the tumor was in an extreme phase when scalp and Calvary were destroyed, with the lesion invasion in meninx.

The basic postulate of plastic and reconstructive surgery is the removal of the tumor with optimal radicalism, and that the operating defects are closed by simplest method.<sup>1,6</sup> It is primarily important enough to radically remove tumor.<sup>9</sup> Direct suture is the best solution whenever it is possible to apply.<sup>9</sup> However,

direct suture is often not possible, so it is necessary to use cutaneous transplant or some of cutaneous flaps.<sup>10</sup> We closed most of excisional defects in our respondents in group A by direct suture, because the distance of the excision line from the edge of the tumor (1cm) allowed this type of suturing of the skin without significant tension and disfigurement.

Most of skin transplantations were done in group C. The reason for this is the increasing number of advanced lesions in this group and wider excision distance from the edge of the tumor (3 cm), which resulted in postoperative defects.

About 40% of patients with basocellular carcinoma will have one or more basocellular carcinoma within 10 years.<sup>11</sup>

BCC of the skin of the nose more often recur than at other areas on the head and face. It seems that the reason is avoiding radical incision during the surgery.<sup>12</sup> There have been persistent recurrences of BCC on scalp, despite the radical excisions.<sup>12</sup>

Various studies have determined the certain parameters and risk factors that lead to relapse and progression of disease. These are macroscopic parameters (size, shape and multiplicity of tumors) and microscopic parameters (the degree of cell differentiation).<sup>11</sup>

In group A were found 14 relapses of skin BCC. Relapse occurred in 6 patients in group B while in group C the number of relapses was also six. The average time from tumor excision to recurrence did not differ from the date from the literature and was on average 24.7 months.

Frequent recurrences of BCC in group A were especially recorded after excisions of the face. This can be explained by attempting to avoid the radicalism that leads to disfigurement. In contrast, in group C, where there were the highest number of respondents with locally advanced lesions and the highest radicalism of excision, there was proportionally lower number of relapses. The greatest radicalism had been applied to treat tumors that were higher locally and in advanced phase.

Rarer are BCC surgeries on the head, which does not leave traces behind.<sup>2</sup> On the contrary, the more radical surgery for operations BCC on the head usually causes a certain degree of disfigurement.<sup>6-9</sup> When it comes to treatment and removal of BCC from head skin, aesthetics is a second plan, but still taken into account that the optimal excision are not left behind degree of disfigurement, which will later present mental burden for the patient.<sup>10</sup>

BCC surgery on the nose, especially at the advanced stage, will usually lead to the obvious scar, which is seen as a certain degree of disfigurement. Direct suture zone on the nose often leads to displacement of tissue, so it is more or less damaging pre-existing architecture of the nose. Local rotational

or transpositional flaps often leave traces, by which it can be known that the nose has been operated. 3

Direct suture is probably the most applicable option for BCC surgeries on the face, because usually there is enough skin, which can cover an operating defect directly. The possibility of closing surgical defect after excision of BCC on the scalp is very limited already for the defects of 1.5 cm in diameter. 3 In advanced BCC on scalp, direct suture is practically out of the question. Cutaneous transplantation, the thickness of the skin ruptured is the most common surgical method of closing post excision defect in the treatment of BCC scalp. This method, however, leaves behind sharply demarcated areas without hair, and if it is impossible to disguise them surrounding hair there are visible disfigurements, which attract attention. 3,4 In our respondents, in group C, in most cases there is a certain degree of disfigurement, as a consequence of the reconstruction of post excision defect by skin graft. Areas that appeared smooth and without hair, were more or less conspicuous and are characterized as disfigurement, which is the cost of treatment for specifically advanced BCC.

Disfigurements in respondents in groups A and B, therefore, on the nose and other facial parts, mostly consisted of visible scars from surgery. Scar size and degree of such disfigurement, is directly proportional to the size of the tumor that was removed.

There is a belief that basocellular carcinoma (BCC), generally do not metastasize, however, there are exceptions.6

Depending on the source of data in literature, the occurrence of metastasis varies from 0.01% (according to the pathologist reports), to 0.028% (according to the reports dermatologists) to 0.1% (according to data from surgical centers). A report published in 1984, described 175 cases with histopathological proven BCC metastases. 3-5

Typical history of basocellular carcinoma (BCC) with metastases is usually associated to large, ulcer, locally Invasive and destructive primary lesion, which appeared again in spite of repeated surgical interventions or radiotherapy.7-10

However, massive size, ulceration, or occurrence of multiple relapses is not absolute prerequisites for metastasis. Most researches have not established a

specific histologic type of BCC that is more prone to metastasis than others. Also, there is no evidence that the immune defense of the host was significantly affected. However, some authors argue that metatypical or (basosquamous) basocellular type of cancer is most likely to metastases.

Unlike metastatic squamous cell carcinoma of the skin (PCC), which show lymphogenously metastases in 80% to 90% of cases, the metastatic BCC, hematogenous and lymphatic spread shows almost uniform distribution.4,8,11

Thus, about 50% of patients with metastatic BCC develop metastases into the lymph nodes. Meanwhile, in the first line of the spread of haematogenic BCC are the lungs and bones. There was the appearance of metastases in the liver and other abdominal organs as well as skin or subcutaneous tissue.4,8,12

The average duration of life after metastasis to the lungs, bones or other organs is about 10 months. 4,8,12,13,14

During our research, we did not encounter a single case of metastases of BCC.

### Conclusion

In most of the respondents, intraoperative skin defect was closed by direct suture. Sparing incision distance from the edge of the BCC, which is 1 cm in group A, results in significantly lower percentage of disfigurement. Meanwhile in group A was recorded the highest number of relapses of BCC.

Radical surgeries of BCC that were undertake with surgical margin of 3 cm from the BCC resulted in fewer relapses, but statistically significant percentage of postoperative disfigurement.

The most optimal excisional distance from the edge of the BCC is about 2 cm. Due to the significantly smaller number of disfigurement, resections distance of 2 cm from the BCC and direct suture of postoperative defect take precedence, regardless of the tumor localization.

Local adverse effect of treatment of BCC, the consequently disfigurement was significantly more frequent in respondents who had post excision defect closed by cutaneous graft.

### References

1. Rogers H.W., Weinstock M.A., Harris A.R. Incidence estimate of nonmelanoma skin cancer in the United States, (2006) Arch Dermatol,2010; 283:287.
2. Oprić M., Babić M., Granić V. Tumori mekih tkiva i kože, Elit Medica, Beograd, 1999.
3. Lukić D. Tumori kože, Medicinski fakultet Banja Luka, 2010;45-48.
4. Lukić D., Bandić J., Ivić D. Rezultati lečenja planocelularnog i bazocelularnog kercinoma kože glave i vrata i drugih anatomskih regija, Medicinska istraživanja, 2006;40(1): 29-35.
5. Anwar U., Ghazal A.S.K., Ahmad M., Sharpe D.T. Horrifying basal cell carcinoma forearm lesion leading to shoulder disarticulation. Plast Reconstr Surg, 2006; 117-9

6. Asilian A., Tamizifar B. Aggressive and neglected basal cell carcinoma. *Dermatologic Surgery*, 2005;31(11):1468-1471
7. Braun-Falco O., Plewig G., Wolff H.H., Winkeimann R.K. Malignant epithelial tumors. in: Braun Falco O., Plewig G. Wolff H.H., Winkeimann R.K. (ur.) *Dermatology*, Berlin: Springer-Verlag, 1991;1018-35
8. Deo S.V., Hazarika S., Shukla N.K., Kumar S., Kar M., Samaiya A. Surgical management of skin cancers. Experience from a regional cancer centre in North India. *Indian journal of cancer*, 2005;42(3) 145-50.
9. Eisner J.M., Russell M. Cartilage hair hypoplasia and multiple basal cell carcinomas. *J Am Acad Dermatol*, 2006;54-8
10. Hutcheson A.C., Fisher A.H., Lang P.G. Basal cell carcinomas with unusual histologic patterns. *Journal of the American Academy of Dermatology*, 2005;53(5): 833
11. McCutcheon B., White K., Kotwall C., Germolic D., Reboloso Y., Hamann M.S., Stiles A. A preliminary study of imiquimod treatment in variants of basal cell carcinoma. *Am Surg*, 2005;71(8): 662-5
12. Pennington B.E., Leffe D.J. Mohs micrographic surgery. Established uses and emerging trends. *Oncology*, Willston Park, Aug. 2005;19(9):1165-71
13. Rončević R., Aleksić V., Stojičić M., Jovanović M., Rončević D. Invasive, aggressive basal cell carcinoma. *Carcinoma basocellulare terebrans*. *European Journal of Plastic Surgery*, 2006;(23): 379-384
14. Padgett JK, Hendrix JD Jr. Cutaneous malignancies and their management. *Otolaryngol Clin North Am*, 2001;34:523–553
15. Lukić D., Karabeg R., Bandić J. The Results of Treatment of Basocellular Carcinomas of the Head Skin. *Medical Archives*, 2012;66(3):72-78.

<sup>1</sup>Health center «ORS Hospital» Belgrade

<sup>2</sup>General hospital Doboj

<sup>3</sup>IKVB «Dedinje» Belgrade

<sup>4</sup>FZORS Banja Luka

<sup>5</sup>General hospital Prijedor

## THE ANALYSIS OF INFLUENCE OF TUMOR LOCALIZATION ON LATE DIAGNOSIS AND TREATMENT IN PATIENTS WITH SKIN MELANOMA

### ANALIZA UTUCAJA LOKALIZACIJE TUMORA NA KASNU DIJAGNOZU I LEČENJE PACIJENATA SA MELANOM KOŽE

D. Lukić<sup>1</sup>, P. Lazić<sup>2</sup>, J. Bandić<sup>1</sup>, Đ. Radak<sup>3</sup>, N. Babić<sup>4</sup>, D. Ivić<sup>5</sup>

#### Summary

With the prospective study, from June 2004 to June 2012, were compared the results of the influence of tumor position on late diagnosis and treatment of skin melanoma. Respondents were classified according to clinical appearance in 2 equal groups. The first group, group A (32 respondents) consisted of respondents that underwent radical wide excision of the primary tumor at an early stage of the disease. In the second group, group B (32 respondents) were classified respondents with melanoma that underwent radical excision of melanoma at a later stage of the disease.

The aim of this study was to analyze the influence of tumor localization on late diagnosis and treatment of skin melanoma.

In 25 respondents (78.1%) who were operated at an early stage, melanoma was located on the face, chest, abdomen and extremities, while in 7 (21.9%) respondents, melanoma was localized on the back. In the group of late operated respondents, melanoma was positioned on the face, chest, abdomen and extremities in 9 (28.1%) respondents, while in 23 (71.9%) respondents, tumor was localized on the back.

It has been shown that tumor localization essentially determines the time of visits of respondents for examination.

Melanoma on the back remains unnoticed for a long time, i.e. unrecognized changes in lesions compared to lesions of other anatomical regions, which is probably the reason for the bigger waste of time and late diagnosis.

Respondents in group B consulted the doctor 4-5 months later, because of melanoma position than the group A, which is proved to be statistically significant.

There was found a statistically significant difference in terms of recurrence of the disease. Relapse was observed in group B 3 times higher than in group A.

Localization of melanoma significantly affects the outcome of the treatment of the disease. There was a statistically significant difference in survival of respondents in groups, because the mortality rate in group B was almost three times higher.

**Key words:** skin, melanoma, late diagnosis

#### Sažetak

Prospektivnom studijom u periodu od juna 2004.do juna 2012. godine, upoređivani su rezultati uticaja pozicije tumora na kasnu dijagnozu i lečenje melanoma kože. Ispitanici su prema kliničkom izgledu svrstani u 2 jednake grupe. Prvu, grupu A (32 ispitanika), činili su ispitanici kojima je urađena radikalna široka ekscizija primarnog tumora u ranoj fazi oboljenja. U drugu, grupu B (32 ispitanika), svrstani su ispitanici sa melanomom kojim je rađena radikalna ekscizija melanoma u kasnijoj fazi oboljenja. Cilj rada bio je analiza uticaja lokalizacije tumora na kasnu dijagnozu i liječenje melanoma kože.

Kod 25 (78,1%) rano operisanih ispitanika melanom je bio lokalizovan na licu, grudima, trbuhu i ekstremitetima dok je kod 7 (21,9%) melanom bio lokalizovan na leđima. U grupi kasno operisanih ispitanika melanom je bio pozicioniran na na licu, grudima, trbuhu i ekstremitetima kod 9 (28,1%) ispitanika, dok je kod 23 (71,9%) tumor bio lokalizovan na leđima.

Pokazalo se da lokalizacija tumora bitno određuje vrijeme javljanja ispitanika na pregled.

Melanom na leđima duže vrijeme ostaje nezapažen, odnosno, ostanu nezapažene promjene na leziji u odnosu na lezije drugih anatomskih regija, što je

vjerovatno razlog za veći gubitak vremena i kasnu dijagnozu.

Ispitanici grupe B su se radi pozicije melanoma javljali na pregled 4-5 mjeseci kasnije od ispitanika grupe A što se pokazalo statistički značajnim.

Promadena je značajna statistička razlika u pogledu recidiva oboljenja. Recidiv je u grupi B zabilježen 3 puta češće u odnosu na grupu A.

Lokalizacija melanoma značajno utiče na ishod liječenja oboljenja. Utvrđena je značajna statistička razlika u preživljavanju ispitanika po grupama jer je smrtnost u grupi B bila skoro 3 puta češća.

**Ključne riječi:** koža, melanom, kasna dijagnoza

## Introduction

Regardless of the fact whether melanoma arises from alteration of moles or is a primary malignant form, timely diagnosis is of the utmost importance. 1,2 Melanoma may, if it is congenital, for years remain idle and so offers possibility of timely diagnosis. 3 During the phase 'in situ', when the skin melanoma is thinner than 1 mm, there is a real possibility to cure this disease. 4,5

So far, there were published several studies that evaluated the accuracy of the clinical diagnosis in the diagnostics of malignant melanocytic skin lesions and, depending on the author, the percentage ranges from 65-80%. 1-4

Until the advent of dermoscopy, melanoma was diagnosed by chance or on the basis of histopathological analysis after removing some of the pigmented skin lesions, or on the basis of the clinical examination. 5-8

Successful treatment of melanoma is based on early diagnosis and radical surgical excision. Radical surgical removal is a sacrosanct basis for successful treatment. In melanomas with great possibilities for metastasis, after surgical treatment, adjuvant therapy is applied. 5-9,10

There are a number of medicaments used in the treatment of melanoma ranging from biologic therapy, activator of macrophages, chemotherapy, and biochemotherapy and melanoma vaccines. The introduction of these drugs into therapy is defined by a protocol for treatment of melanoma after radical surgical removal. 5-9,11

## Goal

The aim of this study was analysis of the influence of tumor localization on late diagnosis and treatment of skin melanoma.

## Materials and methods

With the prospective study, from June 2004 to June 2012, were compared the results of the diagnosis and treatment of skin melanoma. Respondents were

classified according to clinical appearance in 2 equal groups. The first group, group A (32 respondents) consisted of respondents that underwent radical wide excision of the primary tumor at an early stage of the disease. In the second group, group B (32 respondents) were classified respondents with melanoma that underwent radical excision of melanoma at later stage of the disease.

There was analyzed the time distance from the occurrence of changes in pigmented lesions (changes in color, edge, diameter, symmetry) until coming to the computer dermoscopy, i.e., the time from the appearance of symptoms in a suspicious change (pain, itching, bleeding) until coming to examination.

At the same time, the period of recurrence and 5-year survival in patients in both groups was measured.

They were followed postoperatively by clinical examination, blood analysis (LDH) and EHO of abdomen and regional lymphatics every 6 months for 3 years, then annually for 4 and 5 years.

Table 1. Respondents by gender

Gender	Group A	Group B
Male	15(46.8%)	19(59.3%)
Female	17(53.2%)	13(49.7%)
Total	32(100%)	32(100%)

Table 2. Respondents by age

Age	Group A	Group B
20-30	3(9.4%)	2(6.3%)
30-40	8(26%)	5(15.6%)
40-50	7(21.8%)	11(34.3%)
50-60	6(18.7%)	10(31.3%)
Over 60	8(25%)	4(12.5%)
Total	32(100%)	32(100%)

Table 3. The distribution of respondents according to thickness of melanoma (Breslow)

Thickness of melanoma Breslow	Group A	Group B
<1.2mm	0(0%)	2(6.3%)
1.2-2mm	11(34.3%)	5(15.5%)
2-3mm	13(40.7%)	12(37.5%)
3-4mm	8(25%)	13(49.7%)
Total	32 (100%)	32(100%)

## Results

The research results are presented in Tables 4-7 and Figure 1-2. Parameters for comparison of the

results were: time elapsed from occurrence of change in lesion until examination, localization of melanoma, melanoma relapse and survival.

Table 4. Time elapsed from occurrence of change in lesion until examination

Time/months	Group A	Group B
1-2	19 (59.3%)	2(6.3%)
3-4	7(21.8%)	6(18.7%)
5- 6	4(12.5%)	13(40.7%)
7-12	1(3.2%)	8(25%)
Over 12	1(3.2%)	3(9.3%)
Total	32 (100%)	32(100%)

Table 5. Localization of melanoma

Localization	Group A	Group B
Head, chest, abdomen, extremities	25(78.1%)	10 (31.3%)
Back	7 (21.9 %)	22 (68.1%)
Total	32 (100%)	32(100%)

Table 6. Relapse of melanoma

Relapse	Group A	Group B
Yes	4(12.5%)	13(40.7%)
No	28(87.5%)	19(59.3%)
Total	32 (100%)	32(100%)

Figure 1. Relapse of melanoma

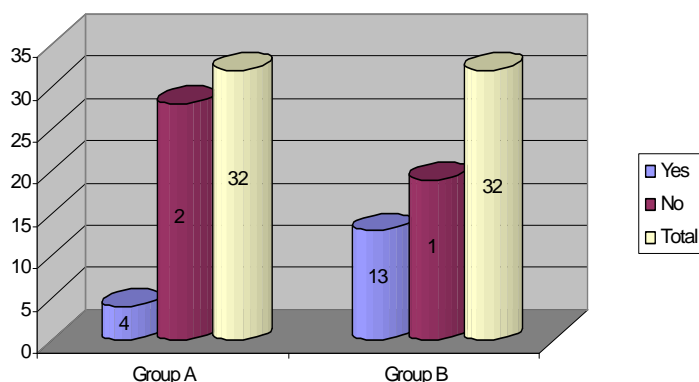
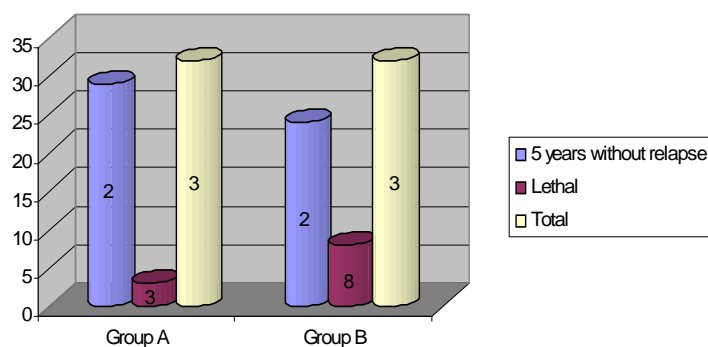


Table 7. Survival

Survival	Group A	Group B
5 years without relapse	29(90.6%)	24(75%)
Lethal	3(9.3%)	8(25%)
Total	32 (100%)	32(100%)

Figure 2. Survival



Statistical analysis of differences between groups A and B reveals the following:

There is a statistically significant difference between group A and group B, in terms of characteristics of the time of arrival at the examination ( $p < 0.01$ , 99% confidence),  $Z = 2.22351$

There is a statistically significant difference between group A and group B, in terms of localization ( $p < 0.01$ , 99% confidence),  $Z = 3.72911$

There is a statistically significant difference between group A and group B, in terms of characteristics of relapse ( $p < 0.01$ , 99% confidence),  $Z = 2.02883$

There is a statistically significant difference between group A and group B, in terms of characteristics of a lethal outcome ( $p < 0.01$ , 99% confidence),  $Z = 2.648265$

### Discussion

In 1838, Norris described melanoma as a change in the skin, mostly black, but more often colorful, with asymmetrical edges, sometimes with local satellites. He concluded that the melanoma tends to spread in visceral organs, and that in the case of delayed diagnosis, the stage of disseminated disease, there is no effective therapy.<sup>2</sup>

Melanomas are tumors, whose behavior is difficult to predict. Some melanomas may often be able to remain "idle" for many years. Some of them are highly malignant with the worst prognosis, while others, with similar histology can behave relatively benign. There are many disagreements about the mutual relation of pigmented nevi and melanomas.<sup>4,5</sup> Congenital melanocytic changes or those that are remembered from childhood often are places where malignant alteration longer remains underdiagnosed. The changes that have occurred "de novo" draw more attention to it.<sup>6</sup>

Despite the fact that the pigment changes in the skin are usually obvious, the diagnosis of melanoma is often very difficult. Timely, accurate diagnosis is the only chance to cure melanoma. Wrong clinical evaluation of malignant pigmented lesion that is

benign, resulting in a situation where the patient loses valuable time and a chance for cure. The main problem lies in the mimicry character of melanoma that for long can make it look like a harmless nevus.

Although melanoma can be amelanotic, the most common diagnostic problem is the differentiation dysplasia moles from melanoma. 2-7,8,9,10

Introduction of dermoscopy into the diagnostics of skin cancer, there is a possibility, not only of precise clinical diagnosis, but also of differentiation of melanocytic from nonmelanocytic skin lesions and then to differentiate benign from malignant melanocytic skin lesions. 4-7

Most of our respondents 39 (60.1%) stated that suspected pigmented lesion (melanoma), they had since birth, which is less likely. This claim seems to be the result of the rationalization of the problem in the area of prejudice, that the changes existing from birth are harmless.

In our respondents in group A, the most common period for arrival to examination was a period of 1-2 months, after the change had been noticed in pigmented lesion, while in group B it was a period of 5-6 months. Respondents in group B, because of frequent localization of melanoma on the back, a lesion simply not noticed, i.e., they noticed it later or not noticed a change in the lesion.

Our respondents from group A most often came to examination when they noticed a change in color, size and shape of pigmented lesions. Respondents from group B most often came to examination after noticing bleeding from pigmented lesion.

Predilection sites for the development of melanoma are debatable. Patients of African descent tend to have melanoma on feet and legs. In north Europe (e.g. Denmark) women have melanoma three times more in the lumbar region than men, and five times greater incidence of melanoma on the lower legs, while the incidence of melanoma on foot is the same in both gender. Localization of melanoma in people of Japanese islands is more common on the feet and covered parts of body. 11-16

Most of the analyses in our region confirm the frequent localization of malignant melanoma on the skin back and chests in men, and on extremities in women, but the global analysis of positioning melanoma suggesting that virtually there is no anatomical region that is "safe", regardless of whether they are covered or uncovered parts of the body. 5

We recorded in our respondents a dominant position of melanoma on back and that in 30 (46.8%) respondents in both groups. In all other regions together (head, chest, limbs), melanoma was positioned in 34 (53.1%) respondents of groups A and B.

In our respondents in group A, melanoma was often positioned on the anterior anatomical regions. Only 7 (21.9%) respondents in group A had a

melanoma on back, which was statistically significant different in terms of the number of melanoma of back skin in group B.

According to Breslow, the percentage of patients with relapses or metastasis in postoperative period of five years, in stage I of disease (melanoma <0.76 mm) is 0%, in stage II (0.76 to 1.5 mm) is 33%, in stage III (1.5 to 2.25 mm) is 32%, in stage IV (2.26 to 3 mm) is 69% and in stage V (> 3 mm) disease is 84%.<sup>5</sup>

According to Clark, the percentage of patients with relapses or metastasis in postoperative period of five years, in stage I of disease is 0%, in stage II is 4%, in stage III is 33%, in stage IV is 61% and in stage V of disease is 78%.<sup>5</sup>

In a five-year period from surgery in 4 (12.5%) of our respondents in group A had recurrent of disease, and all were operated for melanoma with approximate thickness of 2 mm (stage III of disease).

In group B, during the five-year period there were 13 (40.7%) of disease recurrent and majority after surgery of melanoma, thickness about 3 mm (IV and V disease stages).

We operated one respondent for melanoma on the back in group B, with radical axillary dissection. PH findings showed the stage of melanoma: Clark V, Breslow V. This respondent has no signs of relapse of the disease, even after 7 years from operation.

Some of malignant pigmented lesions on the skin remain on surface and are relatively less aggressive. In fact, by the surface shape we can describe melanomas which tend to expand very little into epidermis with habit to remain high in corium, i.e., not expand into the more important layers below the intrapapillary extensions. Melanoma invasion of subcutaneous tissues usually means poor prognosis. Surgical excision of these lesions is not successful, as it is regularly delayed. 17-22

Surgical treatment of melanoma involves radical excision of 3-5 cm from lesion.<sup>23</sup> However, since melanoma is extremely prone to dissemination<sup>6</sup> local radical excision alone is not sufficient or it is "half the job".<sup>24-16</sup>

Our research has shown that the basic and imperative method of treating melanoma and further surgical local eradication of tumor, which include radical excision, an ex-tempore diagnosis, sentinel diagnosis and, if necessary dissection of related lymphatics. This of course applies to patients who are deemed operable in preoperative treatment.

From a total of 64 (100%) of our respondents, during the five-year period 11 of them died (17.2%), that can be considered as a relatively small percentage of mortality compared to the data from the recent literature.



### Conclusion

Localization of tumors essentially determines the time when the respondents come to examination.

Melanoma on the back remains unnoticed for a long time, i.e. unrecognized changes in lesions compared to lesions on other anatomical regions, which is probably the reason for the greater waste of time and late diagnosis.

The most common location of melanoma in both groups is at the back therewith in group B position of melanoma on back is dominant.

Respondents in group B consulted the doctor 4-5 months later, because of melanoma position than the group A, which proved to be statistically significant.

There was found a statistically significant difference in terms of recurrence of the disease. Relapse was observed 3 times higher in group B.

Localization of melanoma significantly affects the outcome of treatment of disease. There was a statistically significant difference in survival of respondents per groups because the mortality rate in group B was almost 3 times higher.

### References

- Grin CM., Kopf AW., Welkovich B., Bart RS., Levenstein MJ. Accuracy in the clinical diagnosis of malignant melanoma. *Arch Dermatol* 1990;126:763-766.
- Miller M., Ackerman AB. How accurate are dermatologists in the diagnosis of melanoma? Degree of accuracy and implications. *Arch Dermatol* 1992;128:559-560.
- Wolf IH., Smolle J., Soyer HP., Kerl H. Sensitivity in the clinical diagnosis of malignant melanoma. *Melanoma Res* 1998;8:425-429.
- Mayer J., Systematic review of the diagnostic accuracy of dermatoscopy in detecting malignant melanoma. *Med J Aust* 1997;167:206-210.
- Lukić D. Tumori kože, Medicinski fakultet Banja Luka, 2010; 45-48.
- Stolz W., Riemann A., Cagnetta AB., et al. ABCD-rule of dermatoscopy: a new practical method for early recognition of malignant melanoma. *Eur J Dermatol* 1994;7:521-528.
- Menzies SW., Ingvar C., McCarthy WH. A sensitivity and specificity analysis of the surface microscopy features of invasive melanoma. *Melanoma Res* 1996; 6:55-62.
- Starz H., De Donno A., Balda B. The Augsburg experience: histological aspects and patient outcomes. *Ann. Surg. Oncol.* 2001; 8( 9), 48–51.
- Andersen BL., Shapiro CL., Farrar WB., Crespini T., Wells-Digregorio S. Psychological responses to cancer recurrence. *Cancer* 2005;104:1540-7.
- Pehamberger H., Steiner A., Wolff K. In vivo epiluminescence microscopy of pigmented skin lesions. I. Pattern analysis of pigmented skin lesions. *J Am Acad Dermatol* 1987;17:571-583.
- Nowecki ZI., Rutlowski P., Nasierowska-Guttmejer A., Ruka W. Sentinel lymph node biopsy in melanoma patients with clinically negative regional lymph nodes—one institutions experience. *Melanoma Res.* 2003; 13, 35–43.
- Essner R., Bostick PJ., Glass EC., et al. Standardized probe-directed sentinel node dissection in melanoma. *Surgery*, 2000;127(1), 26–31.
- Morton DL., Thompson JF., Cochran AJ. et al. ASCO annual meeting proceedings. *J. Clin.Oncol.* 2005;23, (16 Suppl. Part I of II).
- Balch CM., Soong SJ., Atkins MB., Buzaid AC., Cascinelli N., Coit DG., et al. An evidence-based staging system for cutaneous melanoma. *CA Cancer J Clin* 2004;54: 131–149.
- Kalady MF., White RR., Johnson JL., Tyler DS., Steigler HF. Thin melanomas: predictive lethal characteristics from a 30-year clinical experience. *Ann Surg* 2003;238: 528–537.
- Pawlik TM., Ross MI., Thompson FJ., Eggermont AMM., Gershenwald JE. The risk of in-transit melanoma metastases depends on tumor biology and not the surgical approach to regional lymph nodes. *J Clin Oncol* 2005;23: 4588– 4590.
- Kang JC., Wanek LA., Essner R., Faries MB., Foshag LJ., Morton DL. Sentinel lymphadenectomy does not increase the incidence of in-transit metastases in primary melanoma. *J Clin Oncol* 2005;23:4764-70.
- Essner R., Cochran AJ. Sentinel node biopsy: not only a staging tool? *Recent Results Cancer Res.* 2002;160, 133–148.
- Balch CM., Buzaid AC., Soong SJ., et al. Final version of the American Joint Committee on Cancer staging system for cutaneous melanoma. *J Clin Oncol* 2001;19: 3635-48.
- Morton DL., Wen DR., Wong JH. et al. Technical details of intraoperative lymphatic mapping for early stage melanoma. *Arch. Surg.* 1992;127(4), 392–399 .
- McMasters KM., Noyes RD., Reintgen DS. et al. Lessons learned from the sunbelt melanoma trial. *J. Surg. Oncol.* 2004; 86, 212–223.
- Padgett JK., Hendrix JD Jr. Cutaneous malignancies and their management. *Otolaryngol Clin North Am*, 2001;34:523–553.
- Morton DL., Cochran AJ., Thompson JF. et al. Sentinel node biopsy for early-stage melanoma accuracy and morbidity in MSLT-1, an international multicenter trial. *Ann. Surg.* 2005;242(3), 302–313.

24. Pennington B.E., Leffe,D.J. Mohs micrographic surgery: Established uses and emerging trends. *Oncology*, Willston Park, Aug. 2005;19(9),1165-71.
25. Deo S.V., Hazarika S., Shukla N.K., Kumar S., Kar M., Samaiya A. Surgical management of skin cancers: Experience from a regional cancer centre in North India. *Indian journal of cancer*, 2005;42,(3),145-50.
26. Kammula US., Ghossein R., Bhattacharya S., Coit DG. Serial follow-up and the prognostic significance of reverse transcriptase-polymerase chain reaction-staged sentinel lymph nodes from melanoma patients. *J. Clin. Oncol.* 2004;22(19), 3989–3996.

<sup>1</sup>U.O.C. Ortopedia e Traumatologia Universitaria, A.O.U.S. Santa Maria alle Scotte, Siena, Italy

<sup>2</sup>Ind Università degli Studi di Napoli, Italy

<sup>3</sup>Orthopaedics and Traumatology Clinic Banja Luka, Republic of Srpska, Bosnia and Herzegovina

## FLAT-BACK SYNDROME AS POST TRAUMATIC OR POST SCOLIOSIS TREATMENT DISORDER OF THE SPINE

### SINDROM RAVNIH LEĐA – POST TRAUMATOLOŠKI I POST SKOLIOZNI POREMEĆAJ KIČME

Luigi Meccariello<sup>1</sup>, Sara Cioffi<sup>2</sup>, Predrag Grubor<sup>3</sup>, Raffaele Franzese<sup>2</sup>, Raffaele Cioffi<sup>2</sup>, Salvatore Di Giacinto<sup>1</sup>

#### Summary

The term flat-back syndrome has been used to describe symptoms resulting from distraction instrumentation into the lower lumbar spine or sacrum and other factors that may aggravate the loss of lumbar lordosis include thoracolumbar kyphosis, fixed thoracic kyphosis, hip flexion contractures, and pseudarthrosis, although loss of lumbar lordosis may occur with modern segmental implant systems if precautions to preserve lumbar lordosis are not taken loss of lumbar lordosis with forward inclination of the trunk, inability to stand upright, and back pain. The aim of this paper is to review the literature to determinate causes and clinical presentation of Flat-Back Syndrome.

**Key words:** Flat-Back Syndrome

#### Sažetak

Termin sindrom ravnih leđa se koristi prilikom opisivanja simptoma koji su nastali upotrebom distrakcionih instrumenata u donjem lumbalnom području ili sakrumu kao i drugih faktora koji dovode do gubitka lumbalne lordoze uključujući torakolumbarnu kifozu, fiksiranu torakalnu kifozu, fleksione kontrakture kuka, i pseudoartroza. Gubitak lumbarne lordoze može da nastane korištenjem modernih segmentiranih implantata ako se ne preduzmu mjere koje će spriječiti pojavu lumbarne lordoze. Lumbarna lordoza se javlja i kod prednje inklinacije trupa, gdje dolazi do nemogućnosti stajanja uspravno, pojavljuje se bol u leđima.

Cilj rada je da se pregledom literature utvrde uzorci i kiliničko pojavljivanje sindroma ravnih leđa.

**Ključne reči:** Sindrom ravnih leđa

#### Introduction

The “sagittal disequilibrium” of human spine has been poorly studied in literature due to the lower

incidence of the deformities of this anatomic plane respect to those of the axial one. These deformities are represented by the more common scoliosis.

In 1976, Moe and Denis [1] reported on 16 patients with a thoracolumbar fusion presenting the loss of lumbar lordosis and the rise of back pain. They introduced the term flat-back syndrome (FBS). In the past, FBS was considered mainly an iatrogenic complication in the treatment of scoliosis with the Harrington distraction instrumentation [2]. In the last few years other conditions that influence vertebral curves and cause FBS [3] have been identified. The fixed positive sagittal spine imbalance correlated to these states of health changes the patient posture. It has repercussions on the gait causing severe damages not only at the back, but also at the hips and at the knees [4]. The understanding of the FB causes, which are related to surgery, is very important for the planning of a correct rehabilitation program.

The purpose of this paper is to identify all the several different etiologic factors that modify the static and dynamic biomechanical equilibrium of the spine, causing the FB.

#### Definition and etiology

Physiological status of the spine has a perfect biomechanical equilibrium on both the sagittal and the frontal plane. In an ideal posture, the body mass center, which is also the centre of gravity, is aligned to the spine axis. The spine axis is represented by a line which passes through the center of C7, located ahead of the dorsal kyphosis, and passes through the center of L3. This is also named the Barrè line. The extension of this ideal line passes through the cranial apex, the acoustic meatus, the shoulder, the great trochanter, the knee, the external perimalleolar region and finishes to the centre of the supporting podalic polygon, which is situated behind the line connecting the femoral heads. The physiological angles of the sagittal curves, the

pelvic and lumbosacral inclination angles maintain this biomechanical balance.

A reduction of the lumbar lordosis angle (<math><45^\circ</math> at adulthood and <math><20^\circ</math> at teen-aged, measured with Cobb's method on x-ray in axial projection) causes a biomechanical imbalance of the spine which could sometimes lead to a reduction of the dorsal kyphosis (<math><25^\circ</math> at adulthood and <math><15^\circ</math> at teen-age). This dorsal reduction is a biomechanical compensation that could lead to FBS. In same condition the reduction of the reduction of the thoracic kyphosis can be the "primum movens" of FB. By reviewing the literature, we have recognized 9 causes of FB. We have divided these causes in two groups (**Table 1**).

Table 1: Causes of Flat Back Syndrome

1.1 Iatrogenic Post-Surgery FB (Kostuik) [4-6,14,15,20-27]
1.2 FB due to Orthestic [16-19]
1.3 Squatting-Posture Degenerative FB [13,29]
1.4 Degenerative Senile FB [30-33]
1.5 Juvenile Astenic FB [34-36]
1.6 FB in female puberty[37-41]
1.7 Spondilitic FB [42]
1.8 FB due to contracted muscular chains
1.9. FB due to Congenital, Metabolic and Genetic Diseases:
• Marfan Syndrome
• Morquio Disease
• Achondroplasia

**1.1. Iatrogenic Post-Surgery FB**

The most frequent condition described by literature is the iatrogenic loss of lordosis as a complication following the placement of thoracolumbar instrumentation, especially with distraction instrumentation spanning the lumbar spine, like the Harrington distraction instrumentation (**Figure 1**). In 1973, Doherty [5] was the first to describe, in patients treated for scoliosis with the Harrington device on the dorso-lumbar junction, an alteration of the posture. After the studies about the vertebral fusion at dorsolumbar level published by Kostuik and La Grone, nowadays many authors agree that FB appears in patients where the vertebral fusion is distal to L3 [6]. The symptoms included muscular pain in the upper back and lower cervical area, pain in the knees, and inability to stand up right. The distraction action of this surgical instrument has a therapeutic effect on the scoliosis but it lead to reduction of lumbar lordosis. Another etiologic factor is the pseudoarthrosis caused by the posterior spinal arthrodesis performed as a

surgical correction of FB [7]. Herkowitz and coll. have studied the degenerative and pseudoarthrotic complications of surgical treatment of the vertebral sagittal alterations[8]. They have demonstrated that the incidence of post-surgery pseudoarthrosis at lumbar level is 5-7%. The pseudoarthrotic complication is more frequent in distal arthrodesis of Spine.

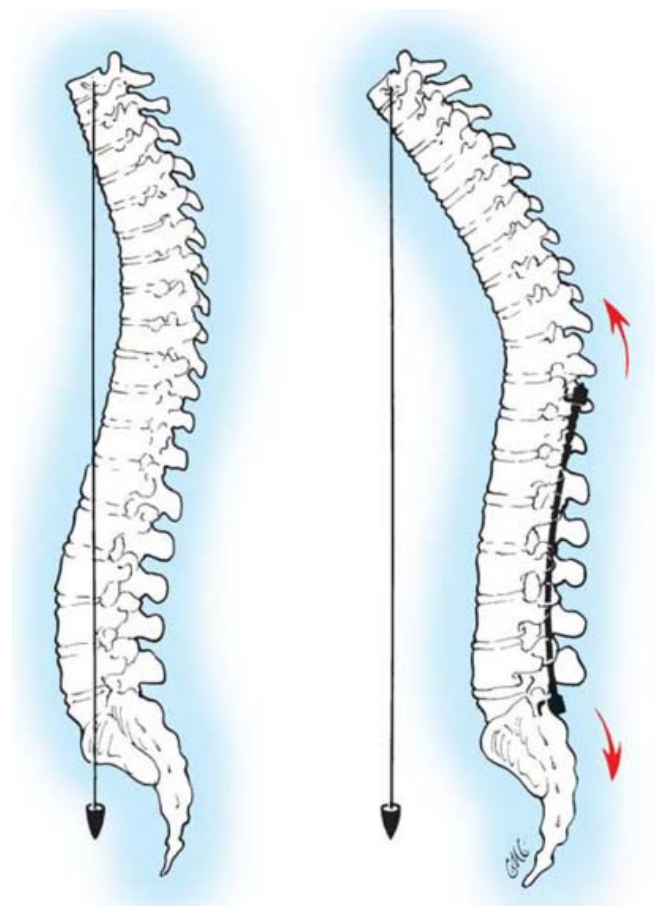
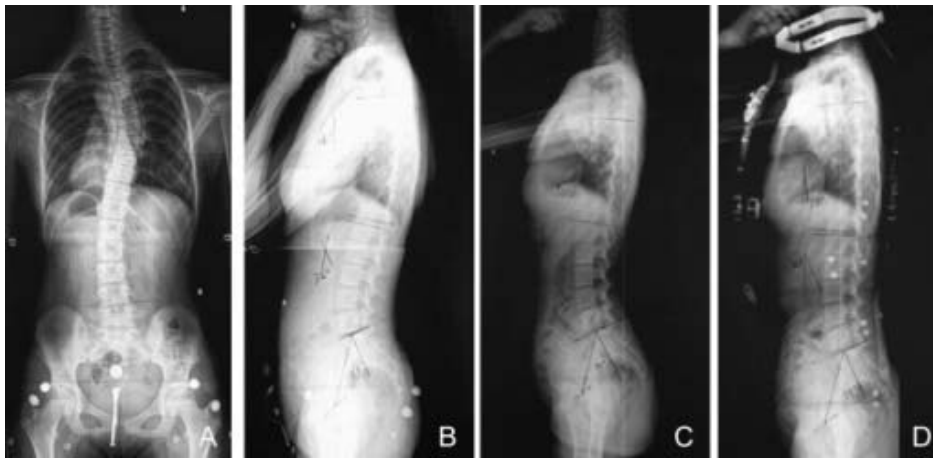


Figure1: Effects of distraction rod in lumbar spine. If contouring for lordosis is inadequate, lumbar spine can be flattened by distracting force. Also note kyphotic deformity just superior to distraction rod. (From Lagrone MO: Loss of lumbar lordosis: a complication of spinal fusion for scoliosis, Orthop Clin North Am 19:383, 1988.)

**1.2. FB due to Orthestic**

Another cause of FB is the use of Milwaukee corset, an orthesis used in the treatment of the dorsal and dorso-lumbar scoliosis in patients aged between 2 and 16. The traction and derotation applied by the corset have a therapeutic effect on the scoliosis but these forces lead to the reduction of the dorsal kyphosis and/or lumbar lordosis, causing FB (**Figure 2**). For this reason its use has been restricted to particular spinal deformities and other orthestic instruments which don't cause this complication, like the Chèneau corset [9], have become more popular.



*Figure 2: The radiographs of the above patient A: The patient had a major thoracic curve of 35°. The Risser sign is 3 degrees. The post-menarche age was 11 months. B: in natural standing posture, TK: 16°, LL: 32°, PI: 39°. C: with elastic orthotic belt, TK: 4°, LL: 32°, PI: 40°. D: with Milwaukee brace, TK: 10°, LL: 30°, PI: 39°. The D XR shows the Flat Back Syndrome by Milwaukee brace.*

*(From Jiang J, Qiu Y, Mao S, Zhao Q, Qian B, Zhu F: The influence of elastic orthotic belt on sagittal profile in adolescent idiopathic thoracic scoliosis: a comparative radiographic study with Milwaukee brace. BMC Musculoskeletal Disorders 2010, 11:219)*

### **1.3. Squatting-Posture Degenerative FB**

The FB can also have a degenerative etiology. One of the degenerative FB is considered to be a rare disease in Western countries, but in Asian countries it is one of the commonest spinal deformities. It is defined by Takemitsu as “lumbar degenerative kyphosis” [9]. Korean and Japanese screenings [9] show that this vertebral deformity has a greater incidence in female patients aged between 40 and 50 with distinctive life style and jobs. The principal risk factor seems to be working or simply staying in a squatting posture for long periods. This forced position causes a chronic compartment syndrome of lumbar extensor muscles. The pathophysiology of degenerative FB has not been explained yet. However, an extensive degeneration and weakness of lumbar extensor muscles are thought to be responsible for the FB condition in most patients.

### **1.4. Degenerative Senile FB**

FB is very common in senile age. The decrease of lumbar lordosis observed particularly in patients after 70 years old, is caused by the degeneration of vertebral disks. Nevertheless, not all the older patients present the FB at the end. Kobayashi et al. studied the postural effects of vertebral disk degeneration at lumbar level on a group of 100 patients, with age superior to 60 years and with a follow up of 10 years

[10]. They showed that patients affected by FB associated to vertebral disks degeneration present a reduction of the sacral angle. A sacral angle inferior than the physiological value (<30°) has a high possibility, over the 80%, to cause a decrease of the lumbar lordosis. Further, these patients are often affected by Schmorl's nodes, common spinal abnormalities regarded as incidental observations on MR images or plain X-rays of the thoracolumbar spine. They may occur in 38% to 75% of the population [11-12]. These patients often have back pain and other characteristics symptoms of FBS.

### **1.5. Juvenile Asthenic FB**

Also young people could present a FB. In the asthenic children [13], who have a thoracic kyphosis lower than a normal spine or a kyphosis of the superior lumbar tract or a thoraco-lumbar kyphosis, the spine produces a biomechanical compensation that causes FB. The inferior section of the lumbar spine is in a physiological conformation, with a good sacral orientation, while the middle and superior sections of the dorsal spine tend to lay flat. Between these two zones, exactly between D11-D12 and L3-L2, there is a posterior convexity. Children with these alterations have the thoracic kyphosis and lumbar lordosis abnormally flat when they are sitted. In orthostatic position, instead, the spine increases its curvatures. The primary cause of this condition is the ligaments laxity. Lesur reported that in children under 6 years old, a kyphotic attitude at this level is normal in sitting position. If this attitude continues over this age, it is caused by a ligaments laxity or/and a scarce trophism of the paravertebral muscles. During the growth age the spine has different conformations: just over the age of 6 it is nearly flat; between 8 and 10 the lumbar lordosis increases; at the age of 12-13 the dorsal spine tends to decrease the kyphosis. Spine has a definitive conformation at puberal age, when the characteristic curvature of the spine and plantar arcs are completed [14].

### **1.6. FB in female puberty**

Another form of FB can be identified in puberty, with great incidence in female patients. In this period of life, between the age of 7 and 15, the spine has some physiological modifications consisting in a decrease of the thoracic kyphosis, with a peak at the age 12. This is for female sex the period of maximum puberal development that predisposes some young patients to FB. At this age FB is often associated to scoliosis because the spine has a reduced capacity to support

axial load [15-16]. The FB alteration further affects this capacity worsening the scoliosis. In this case the reduced thoracic kyphosis is the “primum movens” of the pathology while the reduction of the lumbar lordosis angle represent a biomechanical compensation of spine.

**1.7. Spondilitic FB**

A well recognized FB is the one caused by ankylosing spondylitis, a pathology that affects the axial skeleton and consists of a progressive and diffused articular stiffness. The stiffness is the result of a chronic inflammatory process of the connective tissue that involves the tendon insertions (enthesitis) of the ligaments and articular capsules in which the characteristic process of ossifications (sindesmophytes) take place. These patients show a marked stiffness, pain at the hips and at the lumbo-sacral tract, with a progressive reduction of the lumbar lordosis, that evolves to a FB. The progression of the inflammatory process is upward, with a diffused stiffness in the final stage of the pathology. It involves hips, shoulders and all the spine. It can produce a limitation of the thoracic motility that affects the respiratory processes [17].

**1.8. FB due to contracted muscular chains**

The postural alterations on the axial plane of the spine in patients affected by FB is partially compensated by physiological mechanisms, such as: iperextension of hips, anteverting of pelvis and the flexion of knees. If these physiological mechanisms are compromised FB becomes uncovered. The causes can be: a contrattural state of the flexor muscles or an atrophic state of the extensor muscles. (Table 2).

Table 2: Muscles involved in the maintenance of posture

<i>Anteverting muscles</i>	<i>Retroverting muscles</i>
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Lumbars (Sacral-spinal, Ileo-costal of loins, Multibifidus of spine, Lumbar Trasversospinalis)</li> <li>• Rectus femoris</li> <li>• Tensor fasciae - latae</li> <li>• Sartorius</li> <li>• Ileo-psoas</li> <li>• Adductor medium and minimus</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Trasverse</li> <li>• Internal and external obliques</li> <li>• Rectus of abdomen</li> <li>• Gluteus maximus</li> <li>• Bicipitis femoris</li> <li>• Semitendinosus</li> <li>• Semimembranosus</li> <li>• Adductor maximum</li> </ul>

**1.9. FB due to Congenital, Metabolic and Genetic Diseases**

- Marfan Syndrome
- Morquio Disease
- Achondroplasia

**Clinical presentation**

The clinical presentation of FBS is strictly correlated to the loss lumbar lordosis and/or loss thoracic kyphosis. The patients affected by FBS refer: pain and stiffness of the spine, pain of the anterior portion of the thigh, hips and knees pain. Often they also have difficulty in standing up and walk in flexed posture. Flexion contractures of the hips are frequent on examination, and the pelvic tilt may be abnormal [9,13,17]. Some female refer to feel pain during the sexual activity. The dyspareunia is caused by the alteration of the physiological anteversion of the uterine angle, wich can be present in patients affected by FB. Physical examination reliably demonstrates the obligatory flattening of the lumbar region and forward tilting of the trunk. By trying to compensate this fixed sagittal imbalance, the patient flexes the knees and hyperextend the cervical spine and any remaining mobile vertebral segments in the thoracic and lumbar spine. Furthermore, his/her attempts to compensate the imbalance and maintain a horizontal gaze may cause in increased strain, pain, and degenerative changes within the cervical spine. Degenerative cervical changes have been documented in >50% of the patients with long-term follow-up after a surgical fusion for adolescent idiopathic scoliosis [18]. Sarwahi et al. [19] performed gait analysis on twentyone patients with FBS and found decreased step and stride length as well as gait velocity. Cadence was maintained compared with that of normal controls, whereas the stance phase and hip and knee flexion were increased. In addition, these patients have a particular malocclusion, the mandibular prognathism [19]. All this confirms the physiopathologic link between posture alteration an stomatognathic apparat . Over time this unnatural posture induces muscle fatigue and pain outlining the FBS.

During the clinical examination the patient’s back has to be inspected nude, in indifferent orthostatic position. In the static analysis we have to consider: the position of foots, the alignment of inferior limbs, the pelvis position, the symmetry of the hips, abdomen and spine. In the dynamic evaluation we have to consider: the deambulation, any possible equilibrium alteration, osteo-tendineous reflexes, abdomen and paravertebral muscles trophism, knees flexion-extension, anteversion and retroversion of the pelvis in iperextension and in prone position, pain on the spinous apophysis. The most sensible clinical test is the evaluation of the sagittal arrows in relation to orthostatic position. This test allows to calculate sagittal deviations (Figure 3).

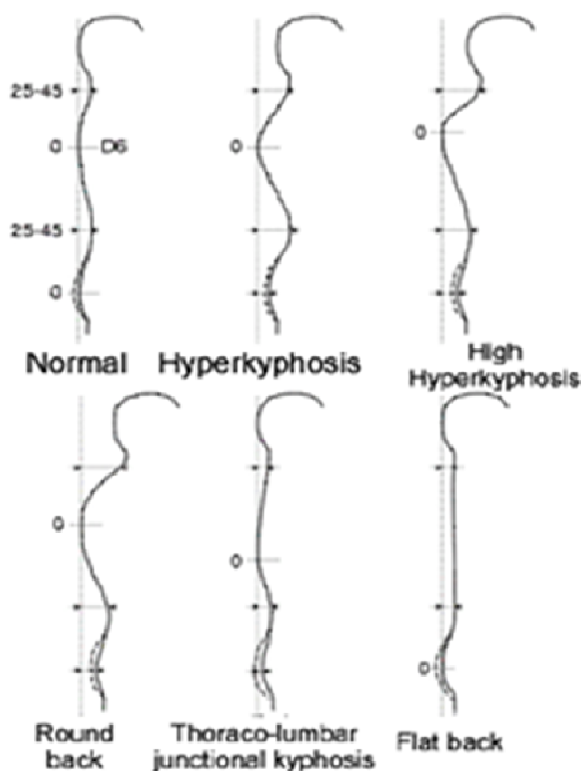


Figure 3: The evaluation of the sagittal arrows in relation to orthostatic position in different Type of Spine deformity.

The patient has to stay in an orthostatic position, with the head, back and buttock leaned on a posterior rigid plane; in this position it is possible to estimate the distance between spine curves and the plane. In the patient affected by FB some typical alterations can be observed. The distance can be decreased at cervical level and/or, very decreased at dorsal and lumbar level (<20mm). It is possible to have an equivalent evaluation by utilizing the plumb-line. At the inspection a patient affected by FB can have all or some of these signs:

- head in an hyperextension attitude
- flat or kyphotic cervical spine
- thoracic anterior-posterior diameter decreased, “sole chest” (sometimes alteration of respiratory function for decrease of pulmonary capacity)
- anterior inclination of trunk
- wide shoulders and shoulder blade wings
- lumbar and/or dorsal spine flat
- spine profile flat (rarely)
- hips in hyperextension and pelvis anteverted
- knees in flexion
- slight club-feet
- equilibrium alterations (valuation with Barany test, Romberg test, Babinski-Weil test).

### Discussions

We have analyzed the FB pathology in its complexity. We reviewed the literature by detecting every cause as possible. We have explained the biomechanical and fisiopatological alterations correlated to every recognized causes.

FB is not much dealt in literature because it is often asymptomatic. The difficulty to early identify the FB is that often the patients affected by this pathology do not present a clear symptomatology. They present the typical FBS symptoms only when the pathology is in an advanced state. Exceptions are the iatrogenic FBs because these kind of condition is always correlated to high level of pain. This is the reason why most of the literature we have analyzed focused on this cause.

The young and the astenic FBs are often asymptomatic. Patients don't have pain and there aren't evident postural alterations. In this cases a primary prevention and a more accurate clinical control are necessary. Perhaps elderly patients with the characteristic clinical presentation of FB were already affected by this pathology at teen age but they were asymptomatic. An early diagnosis allows to start a rehabilitation program as soon as possible preventing the evolution of the pathology and the development of its painful symptomatology and dangerous pathologic posture.

The early diagnosis could be possible by the identification of patients with risk factors. Very probably the incidence of FB in the population is higher than normal should be inserted in a screening program of prevention. These categories include: all the subjects treated with Harrington distraction instrumentation; subjects aged between 7-15 years, in particular female subjects; professional categories that support particular axial stress on the spine (builders, workers that use pneumatic drill, escavatings) or assume particular work position (cobblers); athletes who experience axial stress on the spine (drivers, bodybuilders); subjects with a sacral inclination angle 10° minor than the physiological value.

FB can be considered the expression of a pathologic morphotype of the spine, an important spine pathology, that can cause an important spine degeneration and marked posture alteration, which ought to have more attention in the future.

### Conflict of interest statement

All authors disclose any financial and personal relationships with other people or organisations that could inappropriately have influenced (bias) this work.

## References

1. Moe J. H., Denis F.: The iatrogenic loss of lumbar lordosis. 1977
2. J. L. Cummine, J. E. Lonstein, J. H. Moe, R. B. Winter, D. S. Bradford: Reconstructive surgery in the adult for failed scoliosis fusion. 1979
3. JC de Mauroy, J Sengler, P Fender, JJ Lalain, B Tato, P Lucenti, M Goss, G Ferracane: Deviazioni antero posteriori del rachide. Enciclopedia Medico-Chirurgicale. 2001
4. Choon-Sung Lee, Choon-Ki Lee, Yung-Tae Kim, Young-Mi Hong, Jeong-Hyun Yoo, Dynamic sagittal imbalance of the spine in degenerative flat back. SPINE. 2001, Lippincott Williams & Wilkins, Inc..
5. Doherty J. H.: Complications of fusion in lumbar scoliosis. 1973
6. J. P. Kostuik , G. R. Maurais , W. J. Richardson , et al: Combined single stage anterior and posterior osteotomy for correction of iatrogenic lumbar kyphosis. Spine. 1988
7. De Giorgi G, Gentile A. et al.: "Analyse par ordinateur des possibilités de correction par le corset de Milwaukee et de Boston ". Réunion du GES, 1986
8. Herkowitz, Harry N.; Dvorak, Jiri; Bell, Gordon R.; Nordin, Margareta; Grob, Dieter: Lumbar Spine, The Official Publication of the International Society for the Study of the Lumbar Spine, 3rd Edition. Principles of Spinal Instrumentation in Degenerative Disorders of the Lumbar Spine. 2004 Lippincott Williams & Wilkins
9. Takemitsu Y, Harada Y, Iwahara T, et al. Lumbar degenerative kyphosis: clinical, radiological and epidemiological studies. Spine 1988
10. T. Kobayashi, Y. Atusa, T. Matsuno, et al. A longitudinal study of congruent sagittal spinal alignment in an adult cohort. Spine, 2004
11. Andrew L. Wagner, F. Reed Murtagh, John A. Arrington, and Dexter Stallworth: Relationship of Schmorl's Nodes to Vertebral Body Endplate Fractures and Acute Endplate Disk Extrusions. AJNR Am J Neuroradiol 21:276-281, February 2000
12. Hilton RC, Ball J, Benn RT. Vertebral end plate lesions (Schmorl's nodes) in the dorsolumbar spine. Ann Rheum Dis 1976;35:127-132
13. Resnick D, Niwayama G. Intravertebral disc herniations: cartilaginous (Schmorl's) nodes. Radiology 1978;126:57-6
14. S. Pivetta, M. Pivetta: Tecnica della ginnastica medica - Cinesiterapia dei vizi posturali e dei dimorfismi. 2002
15. Lesur J.: Manuel de gymnastique médicale. Decima edizione (prima edizione 1956)
16. Kapandji: Fisiologia articolare, 2006
17. C. Formica: Sviluppo fisiologico del profilo sagittale del rachide e insorgenza della Scoliosi. - Spine Group-Genova. 2007
18. Kajska Kelly Duke: The Design of Instrumentation for Force Measurement During Scoliosis Surgery. Spring 2001.
19. Sarwahi V, Boachie-Adjei O, Backus SI, Taira G. Characterization of gait function in patients with postsurgical sagittal (flatback) deformity: a prospective study of 21 patients. Spine. 2002;27:2328-37



JZU Opšta Bolnica "Borka Taleski" - Prilep, R. Makedonija

## JAVNO-ZDRAVSTVENI I BIOMEDICINSKI ASPEKTI SKOLIOZE KOD ŠKOLSKE POPULACIJE OD 7-14 GODINA U REPUBLICI MAKEDONIJI

### PUBLIC HEALTH AND BIOMEDICAL ASPECTS OF SCOLIOSIS AMONG SCHOOL POPULATION AT THE AGE OF 7-14 IN THE REPUBLIC OF MACEDONIA

G. Antuleska – Belčeska

#### **Sažetak**

*Uvod:* Skolioza je trodimenzionalan deformitet kičmenog stuba, koja je kao patološko stanje poznata i tretirana još u vreme Hipokrita. Skolioza je problem svih zemalja sveta, pogotovo u zemljama u razvoju. U RM skolioza je kod školske dece uzrasta od 7-14 godina zastupljena sa 7,5%.

*Cilj:* utvrditi zastupljenost radiološki dijagnostikovane skolioze kod školske populacije u RM, određenih vrsta skolioze u odnosu na uzrast, lokalizaciju, stepen skolioze prema uglu devijacije kičmenog stuba, kao i da se definišu faktori rizika kod pojave iste.

*Dizajn studije:* anamnestička case - control studija incidentne vrste sprovedena kod dece od 7-14 godina.

*Metodi:* za ostvarivanje cilja istraživanja formirane su dve grupe: ispitna i kontrolna grupa. Deca su bila podeljena u 3 grupe prema uzrastu: deca na uzrast od 7-9, 10-12 i 13-14 godina. Bio je pripremljen i upitnik prilagođen SRS. Isti se sastojao od 15 pitanja i bio je namenjen roditeljima. Statistička obrada je napravljena u Statistica for Windows 8,0.

*Rezultati:* Prema spolnoj distribuciji, skolioza se češće javlja kod ženske dece 64,49% u odnosu na mušku decu. Distribucija prema uzrastu je pokazala najčešću zastupljenost skolioze kod uzrasta od 10-12 godina, 58,7%. I juvenilna i adolescentna skolioza češće je zastupljena kod ženske dece. Bila je potvrđena i povezanost socioekonomskog statusa i skolioze. Naime, 52,9% dece sa srednjim socioekonomskim stanjem prema FAS-skali imaju 2,18 puta signifikirano veći rizik za oboljenje od skolioze. Odnos skolioze prema mestu stanovanja (urbana i ruralna sredina) iznosi 52,9%: 47,1%. Sedenje pred kompjuterom, fizička neaktivnost kao i visoki BMI su visoki faktor rizika za pojavu skolioze. U ispitivanoj grupi dece, podela je napravljena prema stupnju skolioze: laki, srednji i težak stupanj. Najviše je

zastupljena dvostrana skolioza 66,87%, u odnosu na jednostranu torakalnu 12,32% i lumbalnu 21,02% devijaciju. Ugao devijacije (Cobb) kreće se u intervalu od 9-78 stupnjeva, sa prosečnom vrednošću 15,76+-8,5.

*Zaključak:* prvo istraživanje ovakve vrste u zemlji, koje daje podatke od suštinskog značaja za unapredjenje i promociju zdravlja, kao i unapredjenje primarne prevencije, sa ciljem zaštite zdravlja dece, a time i stvaranje zdravog društva kao i realizaciju Deklaracije WHO „Zdravlje svih u 21-om veku“.

**Gljučne reči:** skolioza, faktori rizika, devijacije kičmenog stuba, Cobb-ov ugao, skrining

#### **Summary**

*Introduction:* Scoliosis is a three-dimensional deformity of the spine, which as a pathological condition was known and treated at the time of Hypocrites. Scoliosis is a problem which exists in all countries around the world, especially in the developing ones. In RM, scoliosis among school children at the age of 7-14 is represented by 7.5 %.

*Objective:* To certify the representation of radiologically diagnosed scoliosis among school children in RM, the specific types of scoliosis in relation to age, location, degree of scoliosis according to the angle of deviation of the spine, as well as to define the risk factors for the occurrence.

*Study Design:* Case- control study from casual type conducted on children at the age of 7-14.

*Methods:* In order to fulfil the purposes of the research, two groups were formed: examined and control group. Children were divided into three groups according to age: the age of 7-9, 10-12 and 13-14. A questionnaire was also prepared on the basis of recommendations given by SRS. The questionnaire consisted of 15 rules and was intended for parents. Statistical processing was done in Statistics for Windows 8.0.

*Results: According to gender distribution, scoliosis is more likely to be found in females, 64.49% in comparison to male children. Distribution according to age illustrates that scoliosis is most likely to appear among age groups of 10-12, 58.7%. Juvenile and adolescent scoliosis is much more likely to appear in female children. The connection between the socio-economical status and scoliosis was also confirmed. Namely, 52.9% of children from average socio-economical status according to FAS-scale have 2.18 times significantly greater risk of developing scoliosis. Ratio of scoliosis according to the place of living (urban and rural area) is 52.9% : 47.1%. Sitting in front of the computer, physical inactivity, as well as high BMI is a great risk factor for development of scoliosis. The questionnaire also confirmed low level of education among parents regarding this problem, 15.9%. Symmetrical sports prevent scoliosis from developing. Within the examined group of children, the division is made according to the level of scoliosis: mild, medium and severe scoliosis. Most often developed is the double scoliosis 66.87% in comparison to single thoracic 12.32% and lumbar 21.02% deviation. The angle of deviation (Cobb) moves in intervals of 9-78 degrees, with average value of 15.76+8.5.*

*Conclusion: The first research of this type in the country, which gives information of essential significance for improvement and promotion of health, as well as improvement of primary prevention, all aiming to protect child health, and thus creating a healthy society and realization of the Declaration of WHO "Health for everyone in the 21st century".*

**Key words:** scoliosis, risk factors, deviation of the spine, Cobb's angle, screening.

## Uvod

Svako doba ima svoje specifične zdravstvene probleme. Javno zdravstvo i klinička medicina trebali bi uzeti u obzir zasebne zdravstvene potrebe svakog člana porodice kao osnovna društvena jedinica, pružajući adekvatnu promociju - promovisanjem zdravlja, prevencije bolesti i odgovarajuću medicinsku brigu.

Deca su naša budućnost i terapijske odluke uvek se trebaju temeljiti na toj činjenici. Prevencija bi trebala biti najvažniji prioritet u zaštiti njihovog zdravlja. (1)

## Anatomija kičmenjaka

Kičmeni stub treba shvatiti kao jedan savitljiv stub, sastavljen od više elemenata (columna vertebrales). U normalnim okolnostima kičmenjak gledan straga je ravan zbog toga što su tela simetrična i kvadratasta, dok zglobne čaure i ligamenti održavaju njihov položaj. Paravertebralna muskulatura

predstavlja dodatni oslonac i pomoć pri pokretima. Tako povezani, oni su čvrsta i elastična os tela, koja ima statičku, mehaničku i protektivnu ulogu. Gornji deo ovog stuba nosi glavu, dok je donji kraj slobodan, a završava se s trtičnom kosti. (2)

Kada neki od tih elemenata popusti nastaje devijacija, čije uzroke treba tražiti u promeni forme jednog ili više tjelašca, u popuštanju ili skraćanju jednog dela kapsuloligamentarnog aparata te u asimetriji mišića. Kod strukturne skolioze nalazimo najčešće klinasti deformitet, rotaciju i torziju te u najtežim slučajevima i sublukaciju.

Pravilan razvoj i formiranje kičmenjaka zavisi od nekoliko uzroka:

- Slabost koštane strukture;
- Interakcija mišićnog aparata;
- Djelovanje spoljnih i drugih faktora: ishrana, način života, bolest, fizička aktivnost, mikrotrauma, rano opterećenje i sl. (3).

## Definicija skolioze

Scoliosis je grčka reč i znači zaokret. Prvi put predstavljen u medicini od Galena (131-201), zajedno s kiphozom i lordozom, termini koji označuju deformitet u sagitalnoj ravnini. (4)

Skolioza počinje najčešće jednim strukturnim (primarnim) zavojem kičme. Taj zavoj ne ostaje samostalan nego se razvija sekundarni (kompenzatorni) zavoj, koji služi u svrhu "balansiranja" tijela. Primarni zavoji pokazuju sve strukturne fenomene (klinasta tela, torzija-rotacija i sublukacija). Sekundarni zavoj uvek ima konveksitet zakrivljenosti usmeren u suprotnoj strani od primarnog zavoja.

Zakrivljenost kičme pojavljuje se u različitim razdobljima tokom života. Skolioza koja se javlja u prve tri godine života nazivamo infantilnom, onu između treće godine i početka puberteta nazivamo juvenilnom. Adolescentne skolioze javljaju se početkom puberteta, pre dostizanja koštane zrelosti, dok su adultne skolioze prisutne i nakon dostizanja koštane zrelosti.

## Tipovi skolioze

U pogledu strukture skeleta skolioze su podeljene na:

- a. funkcionalne (reduktibilne) i
- b. strukturne (ireparabilne).

Strukturna skolioza, međutim, može biti:

- Kongenitalna (urođena) i
- Akvirirana (stečena) (5).

Stečene skolioze su one koje se javljaju tokom života. U većini slučajeva (60-80%) uzrok nije poznat, pa se nazivaju idiopatskim. Oni se javljaju tokom rasta i mogu se pogoršati kasnije.

Po lokalizaciji, prema Ponseti i Friedmana (6), oni se dele na:

- Lumbarne, koje se javljaju u oko 24% slučajeva;
- Torakalne, javljaju se u oko 22% slučajeva;
- Cervikotorakalne koji se javljaju u 0,5 do 1 % slučajeva i
- U kombinaciji, javljaju se u oko 37% slučajeva.

U odnosu na životno doba u kome nastaju, skolioze se dele na: infantilne, juvenilne i adolescentne.

Najčešće skolioze su tzv. juvenilne skolioze (dijagnoza deformiteta je postavljena između 4 -10 godine života). Jako dobro reaguju na konzervativni tretman o kojem će biti reči kasnije. Većina skolioza (70-80%) nepoznatog je uzroka pa ih svrstavamo u tzv. idiopatske skolioze. Javljaju se najčešće kod djevojčica, dobi između 8-12 godina, uvek pre puberteta.(7)

Prema SRS (Scoliosis Research Society), postoje sedam grupa skolioza prema uglu odstupanja (zakrivljenosti):

1. 0 do 20 stupnjeva;
2. 21 do 30 stupnjeva;
3. 31 do 50 stupnjeva;
4. 51 do 75 stupnjeva;
5. 76 do 100 stupnjeva;
6. 101 do 125 stupnjeva;
7. 126 i više stupnjeva. (8)

Dijagnoza se temelji na kliničkom pregledu i radiološkim ispitivanjima. Anamneza bolesnika sa skoliozom ukazuje na bolove u leđjima, gegav hod zbog različite dužine donjih ekstremiteta, ali se može pojaviti asimetrija u visini ramena, vidljive deformacije u kičmi itd. Često je prvi znak asimetrija u odeći, koje posmatra roditelj ili dete. Funkcionalni testovi sastoje se od ispitivanja fizioloških pokreta kičme u celini te u segmentima, Adam's Forward Band - test savijanjem, u stojećem ili sedećem položaju (9) (Slika 1).

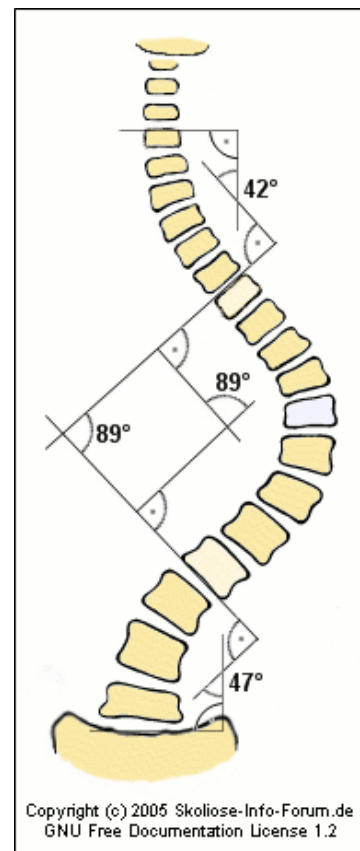


Slika 1 Adam's Forward Band – test  
(Izvor: <http://kinetornb.wordpress.com>)

Međutim, najbolji način, "zlatni standard" za dijagnostiku skolioze je panoramski radiogram u 2 smjera i merenje Cobb-ovog ugla. (10,11) (Sl. 2,3)



Slika 2 Rö prikaz skolioze  
(Izvor: <http://www.sportovniobuv.net>)



Slika 3 Merenje Cobb-ovog ugla  
(Izvor: <http://www.skolioza.com.hr>)

Od svih razdoblja rasta pojedinca: infantilnog, juvenilnog i razdoblje adolescenata, drugi se odlikuje najneujednačenim, promptnim rastom i neuravnoteženosti između kostiju, mišića i velikih promena u hormonalnom statusu. Očekuje se da u mladosti napredovanje krive bude najveće. (12,13,14)

Prognozi skolioze utiču nekoliko uzroka, uključujući: ugaone zakrivljenosti (devijacija kičme), rotacija pršljenova, klinasta asimetrija (Karaiković).

Skolioza je podijeljena na:

- Odstupanje do 30 stepena - blaga ili prvi stadijum skolioze;
- Odstupanje od 30 do 50 stepena - srednji ili drugi stadijum skolioze;
- Odstupanje veće od 50 stepena, težak ili treći stadijum skolioze (15).
- Na progresiju skolioze uveliko utječe nagli rast, BMI (Body Mass Index), kasna menarha. (16,17,18)

### Terapija skolioze

Uopšte govoreći, terapija skolioze sastoji se od:

- Konzervativnog i
- Operativnog tretmana.
- Po veličini ugla odstupanja i potrebi za lečenjem, podela je:
- Skolioza s uglom odstupanja od 0 do 20 stepeni: telesna aktivnost i simetrični sportovi (plivanje, odbojka, itd.) uz redovito praćenje deteta;
- Skolioza s uglom odstupanja od 20 do 40 stepeni: osim fizičke aktivnosti, potrebne su i korektivne vežbe i steznici; (19)
- Skolioza s uglom odstupanja veći od 40 stepeni: obično rešavaju se operativno (20,21).

### Skolioza na Balkanu

Idiopatska skolioza je problem u svim zemljama, iako je češća u zemljama u razvoju u poredjenju s razvijenim zemljama.

U Bugarskoj, prema podacima Ministarstva zdravlja, AIS (adolescentna idiopatska skolioza) je zastupljena sa 43,17 / 1000. (22)

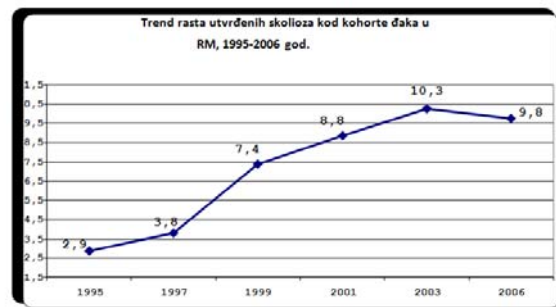
U Hrvatskoj (23) na AIS u školskoj populaciji pripada 3,49 %, ili 2,43 % na muškoj i 4,61% za žensku decu.

U Srbiji, prema podacima iz 2007 (24), skolioza je zastupljena sa 10,2 % u školskoj deci, te u poredjenju s podacima iz 1997 pokazuje trend rasta od 1,4 %.

U Sloveniji (25), ukupna prisutnost skolioze 8,3 % , deci školske dobi pripada 6,3 %.

U RM, prema podacima IJZ(Instituta Javnog Zdravlja), na temelju podataka iz godišnjih zbirnih izveštaja (Tabela 1) pokazalo se da skoliozi pripada 7,5 %, a ukupni broj deformiteta kičme iznosi 36,7%. (26,27)

*Grafikon 1. Trend rasta utvrđenih skolioza kod kohorte đaka u R.M., 1995 - 2006 god.*



### Skolioza u svetu

U populaciji deca u SAD-u skolioza je predstavljena sa 1,5 %, gdje je ugaon zakrivljenosti veći od 10 stupnjeva. Kod devojčice prisutna skolioza je 5 puta češća.

Prema SRS (Scoliosis Research Society), AAOS (American Academy of Orthopaedic Surgeons), POSNA (Pediatric Orthopaedic Society of North America) i AAP ( American Academy of Pediatrics), rana detekcija i odgovarajući tretman daju odlične rezultate. (28)

Cilj: utvrditi zastupljenost radiološki dijagnostikovane skolioze kod školske populacije u RM, određenih vrsta skolioze u odnosu na uzrast, lokalizaciju, stadijum skolioze prema uglu devijacije kičmenog stuba, kao i definisanje faktora rizika kod pojave iste.

Dizajn studije: anamnestička case-control studija incidentne vrste sprovedena kod dece od 7-14 godina. U toku istraživanja, korišćen je upitnik, koji se sastoji od 15 pitanja i bio je namenjen roditeljima. Statistička obrada podataka je u Statistica for Windows 8.

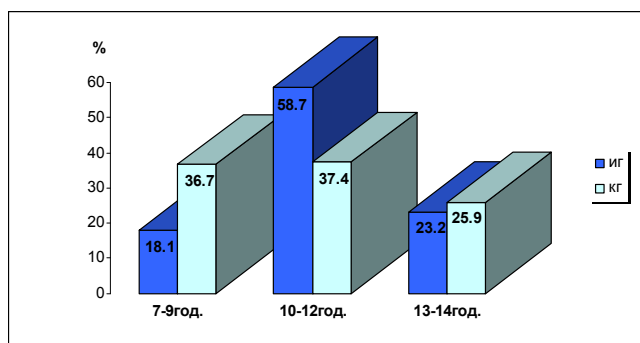
Rezultati: Rezultati obrade i statističke analize podataka dobijeni su od 416 ispitanika, školske populacije, u dobi od 7 do 14 godina. Oni su podeljeni u dve grupe: ispitivana grupa (IG) -138 dece s klinički dijagnostikovanom skoliozom i kontrolna grupa (KG) - 278 dece, bez skolioze. Ispitivana grupa predstavljena je sa 49 (35,5%) muških i 89 (64,5%) ženskih ispitanika, dok je kontrolna grupa 118 (42,14%) muškog pola i 160 (57,5 %) ispitanika bile su devojčice. Tabela 2. i Slika 4

Tabela 2. Polova distribucija – IG/KG

Chi-square 1,57 df=1, p=.2				
pol		IG	KG	Ukupno
broj	Ženski	89	160	249
%		64,49%	57,55%	
broj	Muški	49	118	167
%		35,51%	42,45%	
Ukupno		138	278	416

OR=1,34 95% CI (0,878-2,043)

Za postizanje ciljeva istraživanja, ispitanici su bili podjeljeni u tri uzrastne kategorije: od 7 do 9 godina, od 10 do 12 godina, od 13 do 14 godina. Više od polovine dece sa skoliozom, tj. 81 (58,7%) bilo je u dobi od 10 do 12 godina, dok je u najmladjoj kategoriji registrovan najveći broj pacijenata - 25 (18,1%). Među zdravim ispitanicima gotovo podjednako zastupljene su odrasle kategorije od 7 do 9 godina, od 10 do 12 godina (36,7%, 37,4%). Testirana razlika ispitanika iz IG i KG u pravcu pripadanja u jednoj od tri starosne grupe je statistički vrlo signifikantna ( $p < 0,001$ ).



Slika 4. Starosne grupe – IG/KG

Deca u dobi od 10 do 12 godina su sa znatno (3,3 puta) većim rizikom za skoliozom u odnosu na decu u dobi od 7 do 9 godina. Tabela 3 prikazuje podelu ispitanika iz IG i KG prema socio-ekonomskim standardima utvrđenim od strane FAS - lestvice. Predstavljena distribucija pokazuje da niski socio-ekonomski standard se retko nalazi u porodici dece koja imaju skoliozu (21% naspram 39,2%), dok su deca sa skoliozom s dobrim socio-ekonomskim standardom (26,1% naspram 16,5 %).

Tabela 3. Distribucija prema FAS- lestvici - socio-ekonomski standard – IG/KG

Pearson Chi-square: 14.92 df=2, p=.00057				
	FAS skor	IG	KG	Vk.re d
Count	1	29	109	138
Column Percent		21.01 %	39.21 %	
Count	2	73	123	196
Column Percent		52.90 %	44.24 %	
Count	3	36	46	82
Column Percent		26.09 %	16.55 %	
Ukupno		138	278	416

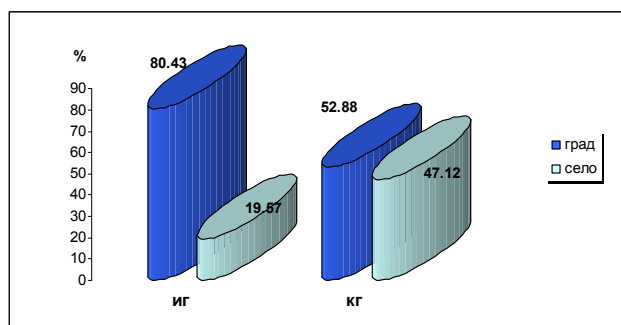
1. nizak socio – ekonomski standard
2. srednji socio - ekonomski standard
3. dobar socio – ekonomski standard

Nacionalna struktura dece iz obe grupe prikazana je u Tabeli 4. Makedonci predstavljaju najveću grupu ispitanika, 90 (65,2%) ispitanika u IG, te sa 235 (84,5%) u KG. U IG 23,2 % su Albanci, Turci 5,1%, 2,2% Cigani. U KG 8,3% su Albanci, Turci su 2,9%, a samo 1 dete je iz romske nacionalnosti. Obe grupe znatno se razlikuju po etničkoj pripadnosti ispitanika.

Tabela 4. Etnička struktura – IG/KG

Kolmogorov-Smirnov Test Dmax=0.19 p<0.05				
Nacionalnost		IG	KG	Ukupno
Broj	Makedonac	90	235	325
%		65,22%	84,53%	
Broj	Albanac	32	23	55
%		23,19%	8,27%	
Broj	Turčin	7	8	15
%		5,07%	2,88%	
Broj	Srbin	3	1	4
%		2,17%	0,36%	
Broj	Cigan	6	11	17
%		4,35%	3,96%	
Ukupno/Total		138	278	416

Deca koja žive u urbanim područjima su sa 3,6 puta znatno većim rizikom za skoliozu u poredjenju s decom iz ruralnih područja -. OR = 3,636 95% CI (2,245-5,889) Slika 5



OR=3,636 95% CI (2,245-5,889)

Slika 5. Distribucija prema mestu stanovanja – IG/KG

U IG dominiraju 111 (80,4) ispitanika, ili deca sa skoliozom koja žive u gradu, samo 27 (19,6%) među njima su iz seoske sredine. U KG gotovo podjednako učestvuju deca iz grada i sela (52,9%, 47,1%).

Pitanje iz upitnika "Koristite li računar" je odgovorilo potvrdno 129 (93,5%) ispitanika iz IG, a 229 (82,1%), ispitanika iz KG. Analiza pokazuje da deca koja koriste kompjuter u svakodnevnom životu imaju 3.03 puta znatno veće šanse za razvoj skolioze (OR = 3,03 95% CI 1,44 - 6,369). Tabela 5

Tabela 5. Kompjuter i skolioza – IG/KG

Yates chi-square=10.9 df=1 p=0.00				
kompjuter		IG	KG	Vk.red
broj	да	129	229	358
	procent	93,48%	82,08%	
broj	не	9	50	58
	procent	6,52%	17,92%	
Vкупно kol.		138	279	416

**Ispitivana grupa**

U ovom delu istraživanja prikazani se rezultati odnose samo na decu koji su bili s dijagnozom skolioze, ili pripadaju IG.

U pogledu ugla zakrivljenosti, koristi se podela skolioze u tri stupnjeva. U našoj ispitivanoj grupi dominira lakši oblik skolioze, dijagnostikovana u 124 (89,8%) dece. Tabela 6

Tabela 6. Stupanj razvoja skolioza – IG

	Count	Percent
Laki	124	89,85
Srednji	11	7,97
Težak	3	2,17
Uкупно	138	100

U odnosu na lokalizaciju skolioze, u torakolumbalni dio kičme - 99 (66,7%) ispitanika; skolioza u lumbalnom području kod 29 (21%) ispitanika, a samo u torakalnom u 17 (12,3%)

ispitanika. Prisutnost kifoskolioze kao deformitet postoji u 60 (43,48%) ispitanika.

Dob ispitanika znatno utiče na skoliozu.

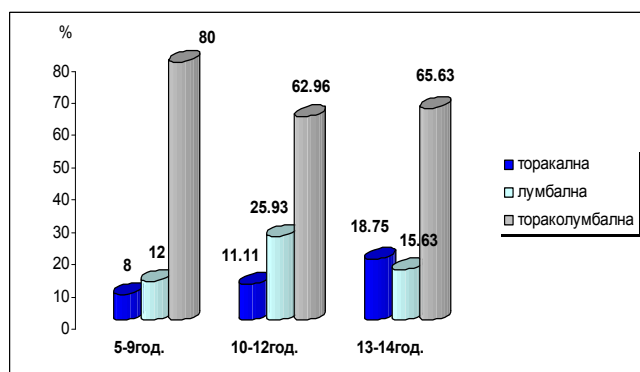
Među ispitanicima s juvenilnom skoliozom i adolescenata registriuje se statistički znatna razlika u pravcu odstupanja. Dvojna skolioza dominira u 80% ispitanika s juvenilnom i 62,8% ispitanika u adolescenatnoj dobi. Tabela 7

Tabela 7. Distribucija prema tipovima skolioze – IG

	devijacija	Juvenilna	Adolescentna	Ukupno
Count	Jednostrana	5	42	47
Column Percent		20,00%	37,17%	
Count	Dvojna	20	71	91
Column Percent		80,00%	62,83%	
Uкупно		25	113	138

Lokalizacija torakalne skolioze je češća u adolescenata (8% u odnosu na 13,3 %). I lumbalna skolioza je češće evidentirana kod adolescenata (12% vs 23%). Slika 7

Torakolumbalna lokalizacija skolioze je češća kod dece od 10-12 godina (80% vs 63,7 %).



Slika 7. Distribucija po uzrast i lokalizaciji skolioze-IG

Dobijeni rezultati su potvrdili: Zaposlenost roditelja i život na selu deluju kao protektivni faktor koji smanjuje šanse za nastanak skolioze, a trening asimetričnim sportovima povećava rizik (3,15 puta) za dobijanje skolioze. Uzrast dece od 10 do 12 godina je sa 2,9 puta znatno većim rizikom za skoliozu u odnosu na decu u dobi od 7 do 9 godina, dok su deca u dobi od 13 do 14 godina sa 1.9 puta signifikantno sa većim rizikom za skoliozu u poredjenju sa onim od 7 do 9 godina.

**Zaključak**

Ovo je prvo istraživanje ovakve vrste u zemlji, koje daje podatke od bitnog značaja za unapređenje i promociju zdravlja, kao i unapređenje primarne

prevencije, sa ciljem zaštite zdravlja deteta, a sa tim i stvaranje zdravog društva. Polazeći od ciljeva u studiji, na bazi dobijenih rezultata, dobili smo uvid o prisutnosti skolioze, njenih različitih tipova, demografske i biomedicinske karakteristike skolioze, hereditet i uticaj fizičke aktivnosti i njene progresije. Na temelju toga, mogu se napraviti sljedeći zaključci:

1. Prisutnost radiološki dijagnostikovane skolioze u Makedoniji je 0,018 / 100.000 godišnje.

2. Distribucija skolioze po polovima pokazala je da je skolioza češća među devojkama, 64,49% u odnosu na 57,55 % mušku decu.

Za ostvarivanje ciljeva istraživanja, imali smo tri uzrasne grupe: deca od 7-9 godina, deca u dobi od 10-12 godina, i deca u dobi od 13-14 godina. Utvrđeno je da većina dece sa skoliozom pripada grupi od 10-12 godina, odnosno 58,7%. Deca u dobi od 13-14 godina su sa 1,5 puta većim rizikom za skoliozu od onih od 7-9 godina.

3. Radni status roditelja znatno utiče na pojavu skolioze.

4. Socio-ekonomski status je određen prema Fas-lestvici. Deca koja žive u porodicama s dobrim socio-ekonomskim položajem imaju 2.942 puta veći rizik za pojavu skolioze u poredjenju s drugima.

5. Život u urbanoj sredini nosi 3,6 puta veći rizik za skoliozu u poredjenju s onim u ruralnim sredinama.

6. Bol u leđima kao simptom prisutan je u 7,2% ispitanika u IG i bitan je pokazatelj za pojavu skolioze.

7. Što se tiče redovnih sistematskih pregleda u obe grupe ispitanika, rezultati su pokazali da su oni manji u IG (94,2%) u odnosu na KG (97,5%), što neznatno povećava rizik za skoliozu.

8. Statistička analiza je potvrdila povezanost ili asociiranost nasledjenog faktora i pojavi skolioze. Hereditet daje 3,08 puta veće šanse za razvoj skolioze.

9. Kvantificiranje povezanosti izmedju skolioze i rad na kompjuteru pokazala je da je računar uslov za 3.03 puta veći rizik za skoliozu.

10. Telesna aktivnost se neznatno razlikuje kod dece iz IG i KG. U obe grupe preovladava fizička neaktivnost; sportom se bave samo 26,1% dece u IG i 28.06% deca iz KG. Što se tiče tipa sporta koji deca radije preferišu, dominira rukomet u IG zastupljen sa 19,4%.

11. Podaci o visini i težini deteta iz obe grupe izračunatim BMI za svako dete i upoređeno sa zadatim vrednostima BMI prema uzrastu i polu: statistička obrada podataka pokazala je da je normalan BMI indeks u većini ispitanika 51,4% i 61,5% IG. U 43,5% dece iz IG i 32,4 % KG indeks BMI je iznad normalnih vrednosti za uzrast.

12. Rezultati koji se odnose na tip skolioze, veličini ugla odstupanja: skolioza je obično predstavljena kao laki deformitet, u 89.85 % ispitanika, srednje u 7.97 % i težak u 2,17%.

13. Engleska izreka kaže: " bolest osetimo, zdravlje ne. " I doista se potvrdila u ovoj studiji. Postavlja se pitanje jesu li roditelji primetili deformitet kod svoje dece. Podaci ukazuju da je samo 15,9% roditelja dalo pozitivan odgovor. To, sa druge strane govori o niskoj svesti zdravstvenog vaspitanja i obrazovanja roditelja.

15. Ugao odstupanja je u intervalu od 10 do 78 stupnjeva s prosečno  $15,76 \pm 8,5$  stupnjeva.

16. Ugao kyphoze je u većini ispitanika, odnosno 56,52 % u normalni, dok kod preostalih 43,47% je povećan i vodi do kyphoscolioze. Blaga kyphoscolioza, gr.1 javlja u 34.78 %, a teška, gr. 2 se javlja u 8.69 % ispitanika.

17. Pozitivna prediktivna vrijednost (PPV) Adam's Forward Band-ovog testa upoređenog sa radiološkim nalazima je visoka i iznosi 0,927%, što je dobar pokazatelj valjanosti za korišćenje X-zraka u dijagnostici skolioze. Takođe, pokazuje visoku specifičnost i osetljivost ovog testa. Uz to, mi dajemo jedan opšti zaključak da su podaci u ovom istraživanju potvrdile sve postavljene hipoteze, a na temelju dobijenih rezultata mogu se izvesti i preporuke koji će doprineti u poboljšanju promovisanja i prevencije zdravlja deteta

### Diskusija

Incidenca skolioze kreće se između 0,4-13%, u odnosu na definisanost i veličinu Cobb-a.(Brux et al.,1975; Bunnell, 1986; Goldberg et al.,1995). Brazilska studija(29) ukazuje da je prevalenca 1,4%, dok je 5-togodišnja epidemiološka studija u Japanu (30) pokazala da je prevalenca skolioze od 0,87%, češća kod devojčica od 11-12 godina za 2,51%, dok je Cobb- ov ugao pokazao varijaciju od 10-19 stepena. Studija u Kragujevcu (31), 2005/2006 godini ukazuje da više od 60% dece školskog uzrasta imaju deformitet kičme.

U Nizozemskoj, prospektivna studija (32) daje podatke da 3-5% dece školske dobi imaju skoliozu, više ženskog pola.

Više studija analizuju PPV Adam's Forward Band-ovog testa, kako bi utvrdile njegovu specifičnost i senzitivnost. Australiska studija(33) govori da PPV testa iznosi 78% za devijacije veće od 5 stepeni, dok je Kanadska studija(34) utvrdila da PPV iznosi 18% za devijacije veće od 20 stupnjeva.

Retrospektivna studija u Francuskoj, ukazuje da je prevalenca skolioze 1,7% i potvrđuje da su pol, uzrast, kao i veličina Cobb-ovog ugla faktori rizika.(35)

Korelacija ove studije je uradjena i sa studijom u Kini(36) u vezi mesta stanovanja; studijom u Grčkoj(37) u vezi uticaja BMI na napretku skolioze; o uticaju skrininga -studija u Minesoti(38); uticaja fizičke aktivnosti za pravilan razvoj deteta (39,40,41,42,43) itd.

Primarna prevencija je samo jedan segment primarne zdravstvene zaštite.

U tom kontekstu, za izgradnju novih strategija potreban je:

- Trening zdravstvenih radnika;
- Motivisanost i svest učesnika u zdravstvenim programima;
- Reorganizacija zdravstvene zaštite na svim nivoima;
- Jasnije definisanje interdisciplinarnih i intersektorskih funkcija;
- Ispitivanje zdravstvenog stanja stanovništva;
- Stvaranje mogućnosti otvorenog dijaloga između korisnika zdravstvene zaštite i onih koji odlučuju o tome kako je treba sprovesti;
- Obuka pojedinaca, porodice i grupe za identifikaciju njihovih potreba i učešće u određivanju prioriteta za njihovu implementaciju;
- Konverzija resursa iz sekundarne i tercijarne na nivou primarne zdravstvene zaštite.

Multisektorski pristup izgradnji strategije za zaštitu zdravlja deteta u tom kontekstu uključuje ne samo zdravstvene radnike, već i saradnike i obrazovanje. Cela zajednica treba sprovoditi zdravstvenu promociju.

Sport, obrazovanje i zdravlje su važna pokretačka snaga u razvoju svakog društva. U tom kontekstu, WHO naglašava potrebu za prilagođavanje sistema obrazovanja naspram potrebama primarne zdravstvene zaštite i obrazovanja i obuka nastavnika u školama.

Naš zakon obrazovanja, uz reforme koji su prethodili i koji su još u toku, ne poštuje temeljne postulate medicine. Školske torbe, neusklađene visine školskih stolica, nedostatak sportskih objekata, su faktori koji negativno utiču na rast i razvoj deteta školske dobi.

Stara latinska poslovice kaže: "Mens sana in corpore sano". Sport i obrazovanje kao svojevrsni most tela i duha, između prirode i čoveka danas su sastavni deo našeg svakodnevnog života. U tom kontekstu, telesna aktivnost je itekako bitna za pravilan rast i razvoj mladih osoba.

Uglavnom, loše navike dovode do lošeg držanja tela. Loše držanje može biti samo jedna faza rasta bez posledica, ako se na vreme otkrije nepravilnost te se pravovremeno reaguje. Inače, to može biti problem prvenstveno za decu, za roditelje i društva u celini, jer to zahteva istrajan i dugoročni rad, uz negativne ekonomske posledice za zdravstveni sistem zemlje.

Dobro uhranjena nacija je zdrava i produktivna nacija. U tom kontekstu, obrazovanje o zdravoj ishrani stanovništva u celini, detetu u rastu i razvoju je bitno, i treba se sprovoditi na više nivoa.

- Obrazovanje za optimalni dnevni unos hrane osoblja koji se brinu za decu: nastavnici, zdravstveni radnici i sama deca;
- Promovisanje programa za optimalne potrebe za hranom niske masnoće, šećera i soli, te velike količine voća i povrća;
- Praćenje težine i visine deteta prema međunarodnim standardima i BMI;
- Aktivno uključivanje dece i omladine u učenju o spremanju hrane, higijeni hrane i kuhanja, u kontekstu zdrave ishrane.

Školski uzrast je pravi trenutak za obrazovanje deteta o značaju zdrave hrane, zdravlja i telesne aktivnosti. To je vreme kada dete počinje aktivan društveni život, i vreme kako bi sebi utvrdilo sopstveni stil života. Deca u tom uzrastu uče brzo prihvatati negativne životne trendove. Detetu treba svestrana, ali uravnotežena ishrana. Fizička aktivnost kao dnevna doza je takodje bitna za pravilan psihički razvoj i očuvanje energije.

Rana detekcija je ključ prevencije s pozitivnim ishodom bilo kog zdravstvenog problema.

Scriming bez obzira ko ga obavlja daje priliku za povećanje prevencije. Cost-benefit omogućenog scriminga je veliki a troškovi niski, upoređeno sa rezultatima koji su postignuti.

Zdravlje kao osnovni preduslov zdravog društva je u središtu pažnje, politici svake zemlje, osnovni predujam za osiguranje, najvažniji faktor za razvoj države i čoveka. U tom kontekstu, uloga javnog zdravlja je značajna. Već je sada jasno da je ulaganje u vrlo skupim metodama lečenja, broj bolničkih dana samo "djak bez dna", ukoliko se ne bi preduzele odgovarajuće specifične i javnozdravstvene mere i aktivnosti. Osim toga, pristup informacijama, komunikacija i intersektorski pristup je bazični i neporecivi faktor uspeha.

Da sumiramo: sprovođenje svih javnih zdravstvenih mera, promovisanje zdravlja, edukacija i prevencija je dugotrajan proces koji traži obuhvatan multidisciplinarni pristup, ali su efekti toga trajni doprinos u stvaranju zdravog društva, a time se realizuju i napor WHO-a za "Zdravlje svih u 21-om veku."



## Literatura

1. Beka A, Dermitzaki I, Christodoulou A, Kapetanios G, Markovitis M, Pournaras J, Children and adolescents with idiopathic scoliosis: emotional reactions, coping mechanisms, and self-esteem, *Psychol Rep.*, 2006 Apr;98(2):477-85
2. Kargovska-Klisarova A., Djordjevic-Hristova N., Tasovska-Lazarova D: Anatomija na čovekot, Osteologija, Prosvetno delo 1995.; 3-15
3. Zec.Z.: Osnovi kineziologije, Beograd, 1986.;92-6
4. Ristić V., Kamnar J., Veterovski K.: Deformiteti kičmenog stuba kod školske dece, Leskovac, 1986.; 15-7;
5. Adams J.C., Hamllan D.L., Outline of Orthopedics, 13-th edition, Churchill Livingstone, 2001.; 178-84
6. Ponseti I.V.: Health and function of patients with untreated idiopathic scoliosis: a 50-year natural history study, *Jama*, 2003, 289:559-67
7. Hitesh N et al: Observer reliability between juvenile and adolescent idiopathic scoliosis in measurement of stable Cobb's angle, *Eur Spine J*, 2009, 18:52-8
8. Kleim A.H., Scoliosis, CIBA, 1972, vol.24, 1:6-11
9. Adolescent Idiopathic Scoliosis, available from:
10. <http://www.scoliosisassociates.com/subject.php=practice1012>
11. Sutton D., Textbook of radiology, 7-th edition, Churchill Livingstone, 2006, vol.2., 1121-3
12. Oda M, Rauh S, Gregory P.B, Silverman F.N, Bleck E.E.: The significance of roentgenographic measurement in scoliosis. *J Pediatr Orthop*, 1982;2:378-82.
13. Weiss H.R, Negrini S, Rigo M, Kotwicki T, Hawes M.C, Grivas T.B, Maruyama T, Landauer F., Indications for conservative management of scoliosis (SOSORT guidelines). *Stud Health Technol Inform*.2008;135:164-70
14. Charles Y.P, Daures J.P, Rosa V, Diméglio A., Tan K.J, Moe M.M, Vaithinathan R, Wong H.K., Progression risk of idiopathic juvenile scoliosis during pubertal growth. 2006 Aug 1;31(17):1933-42.
15. Morais T, Bernier M, Turcotte F., Age and Sex-specific Prevalence of Scoliosis and the Value of School Screening Programs, *AJPH* 1985, December, 75(12): 1377-80.
16. Kineziterapija 9pdf – Microsoft Power Point, available from: <http://www.tims.edu.rs/sr/sadasnji-studenti/...centar/.../61-kineziterapija>
17. Guyatt G.H, Sinclair J, Cook D.J, Glasziou P: User's guide to the medical literature: XVI. How to use a treatment recommendation. Evidence-Based Medicine Working Group and the Cochrane Applicability Methods Working Group. *J Amer Med Assoc*, 1999, 281:1836-43.
18. Charles Y.P, Daures J.P, de Rosa V, Diméglio A., Progression risk of idiopathic juvenile scoliosis during pubertal growth. *Spine*, 2006 Aug 1;31(17):1933-42.
19. Parent S, Newton P.O, Wenger D.R., Adolescent idiopathic scoliosis: etiology, anatomy, natural history, and bracing., *Instr Course Lect*. 2005;54:529-36.
20. Rowe D.E, Bernstein S.M, Riddick M.F, Adler F, Emans J.B, Gardner-Bonneau D., A meta-analysis of the efficacy of non-operative treatments for idiopathic scoliosis, *J Bone Joint Surg Am* 1997;79:664-74
21. Tan KJ, Moe MM, Vaithinathan R, Wong HK. Curve progression in idiopathic scoliosis: follow-up study to skeletal maturity. *Spine*, 2009, Apr 1;34(7):697-00.
22. Sahlstrand, T., Listrom, J., Equilibrium factors as predictors of the prognosis in adolescent idiopathic scoliosis, *Clinical Orthopedics*, 1998, 152:232-8;
23. WHO Republic of Bulgaria 1996, Ministry of Health, Adolescent Report, available from: <http://www.euro.who.int/document/e69842.pdf>
24. Hrvatski zdravstveno-statistički ljetopis za 2008 god., available from: <http://www.pdfpile.com/pdf/zora-t20-pdf.html>
25. Institut za javno zdravlje Srbije "Dr Milan Jovanović Batut": Zdravlje stanovnika Srbije, analitička studija 1997-2007, Beograd, 2008, available from: <http://www.batut.org.rs/linkovi.html>
26. Zdravstveni statistični letopis, 2008, available from: <http://www.ivz.si/index.php>.
27. Zdravstvena strategija na Republika Makedonija 2020 - sigurne, efikasen i pravičen zdravstven sistem, Skopje, 2007, fev.
28. Informacija za sastojbata so ortopedskite deformiteti kaj učenicite vo RM, Republički zavod za zdravstvena zaštita, Skopje, 2007
29. Screening for idiopathic scoliosis in adolescents, available from: [http://www.scoliosis.org/resorce/medicalupdates/AAO-S-SRS-POSNA-AAP\\_Scoliosis\\_Information\\_Statement.pdf](http://www.scoliosis.org/resorce/medicalupdates/AAO-S-SRS-POSNA-AAP_Scoliosis_Information_Statement.pdf).
30. Nery LS, Halpern R, Nery PC, Nehme KP, Stein AT. Prevalence of scoliosis among school students in a town in southern Brazil. *Sao Paulo Med J*. 2010;128(2):69-73.
31. Ueno M, Takaso M, Nakazawa T, Imura T, Saito W, Shintani R, Uchida K, Fukuda M, Takahashi K, Ohtori S, Kotani T, Minami S. A 5-year epidemiological study on the prevalence rate of idiopathic scoliosis in Tokyo: school screening of more than 250,000 children. *J Orthop Sci*. 2011 Jan;16(1):1-6. Epub 2011 Feb 4.
32. NelaDonovic, Milena Ilic, Vlasta Damjanov, Skolioza kod skolske dece na teritoriji grada Kragujevca, IZJZ Srbije Dr Milan Jovanovic-Batut, M.C. 2008 1: 34-8

33. Busscher I, Wapstra FH, Veldhuizen AG. Predicting growth and curve progression in the individual patient with adolescent idiopathic scoliosis: design of a prospective longitudinal cohort study. *BMC Musculoskelet Disord.* 2010 May 17;11:93.
34. Chan A, Moller J, Vimpani G, Paterson D, Southwood R, Sutherland A. The case for scoliosis screening in Australian adolescents. *Clin Orthop Relat Res.* 2002 Aug;(401):27-31.
35. Purkiss SB, Driscoll B, Cole WG, Alman B. Idiopathic scoliosis in families of children with congenital scoliosis. *Clin Orthop Relat Res.* 2002 Aug;(401):27-31.
36. Grivas TB, Koukos K, Koukou UI, Maziotou C, Polyzois BD. The incidence of idiopathic scoliosis in Greece--analysis of domestic school screening programs. *Stud Health Technol Inform.* 2002;91:71-5.
37. Wang YP, Ye QB, Wu B. [Result on the screening of scoliosis among school students in Beijing area]. *Zhonghua Liu Xing Bing Xue Za Zhi.* 1996 Jun;17(3):160-83.
38. Grivas TB, Burwell RG, Mihos C, Vasiliadis ES, Triantafyllopoulos G, Kaspiris A. Relatively lower body mass index is associated with an excess of severe truncal asymmetry in healthy adolescents: Do white adipose tissue, leptin, hypothalamus and sympathetic nervous system influence truncal growth asymmetry? *Scoliosis* 2009, 4:13doi:10.1186/1748-7161-4-13
39. 2008 Scoliosis School Screening Workgroup: Revised Recommendations, available from: <http://www.health.state.mn.us/divs/fh/mch/scoliosis/workgroupmtgsum101308.html>
40. Screening for Idiopathic Scoliosis in Adolescents Brief Evidence Update, available from: <http://www.uspreventiveservicestaskforce.org/3rduspstf/scoliosis/scoliou.htm>
41. Wilczyński J. Lateral spinal curvature measured among children and teenagers as a health problem of future employees, *Med Pr.* 2007;58(5):419-22.
42. Tan KJ, Moe MM, Vaithinathan R, Wong HK. Curve progression in idiopathic scoliosis: follow-up study to skeletal maturity. *Spine (Phila Pa 1976).* 2009 Apr 1;34(7):697-700.
43. Delorme S, Labelle H, Aubin CE. Is Cobb angle progression a good indicator in adolescent idiopathic scoliosis? *Spine (Phila Pa 1976).* 2002 Mar 15;27(6):E145-51.
44. Meyer C, Haumont T, Gauchard GC, Leheup B, Lascombes P, Perrin PP. The practice of physical and sporting activity in teenagers with idiopathic scoliosis is related to the curve type. *Scand J Med Sci Sports.* 2008 Dec;18(6):751-5. Epub 2008 Feb 2.

*Katedra humanističkih nauka, Medicinski fakultet, Univerzitet u Beogradu*

## STAVOVI STUDENATA PREMA UČENJU ENGLESKOG JEZIKA MEDICINE I PRILAGODAVANJE NASTAVE POTREBAMA STUDENATA

### STUDENTS ATTITUDES ON LEARNING ENGLISH FOR MEDICAL ACADEMIC PURPOSES AND ADAPTING THE TEACHING PROCESS TO THEIR NEEDS

*S.Mićić, D. Sinadinović,*

#### **Sažetak**

*Kako Medicinski fakultet Univerziteta u Beogradu ima dugogodišnju tradiciju izučavanja i nastave engleskog jezika za medicinske svrhe, ovaj rad ima za cilj da ispita odnos studenata prema ovoj nastavi i nastavnom materijalu, a radi njihovog prilagođavanja stvarnim potrebama studenata.*

*U istraživanju su korišćena dva upitnika koje je popunilo 128 studenata I i II godine integriranih akademskih studija i 9 studenata engleske nastave, a koja su zasnovana na pitanjima otvorenog i zatvorenog tipa (prvi upitnik) i ocenjivanju stavova na Likertovoj skali (drugi upitnik). Rezultati dobijeni na ograničenom uzorku pokazuju da su studenti svesni potrebe poznavanja ovog specijalizovanog jezika, da ga većinom smatraju težim za savladavanje u odnosu na opšti engleski jezik, ali i šta im to u okviru časova engleskog jezika pomaže ili odmaže pri učenju engleskog jezika za medicinske svrhe, te da li bi nešto promenili u skladu sa svojim potrebama. Kada je reč o nastavnom materijalu koji se prilikom izvođenja nastave koristi, mišljenja ograničenog broja ispitanih studenata su veoma pozitivna i upućuju na dalje istraživanje širih razmera kako bi se dobili relevantniji rezultati.*

**Ključne reči:** *engleski jezik za medicinske akademske svrhe, stavovi studenata, upitnik, nastava jezika, nastavni materijal.*

#### **Summary**

*Since the Faculty of Medicine, University of Belgrade is the institution of long-term tradition of the study and teaching of EMP, the aim of this paper is to investigate the attitudes of students towards these teaching programmes and the teaching material in order to adapt them to the students' real needs.*

*Two questionnaires were used in the research and they were completed by 128 first and second year students of the integrated academic studies and 9*

*students of the English studies. These questionnaires consisted of open and close questions (the first research) and evaluating statements on Likert-type scale (the second research). The results we got in this small-scale research show that the students are aware of the need to learn this specialized language, that they consider it difficult to master as related to General English (GE), as well as what in their classes they find useful or useless for learning English for Medical Purposes and if they would change anything to their actual needs. As for the teaching material used in classes, the opinions of the limited number of surveyed students are mostly very positive, but a larger-scale research should be conducted to get more relevant results.*

**Key words:** *EMAP, students' attitudes, questionnaire, language teaching methodology, teaching material.*

#### **Uvod**

Danas se sa pravom može reći da engleski jezik za medicinske akademske svrhe predstavlja važnu i nadasve osobenu podgrupu engleskog jezika za posebne i akademske svrhe i da se kao takav sve više razvija i privlači sve veću pažnju, kako lingvističke, tako i medicinske javnosti. U svetu se ovom specijalizovanom jeziku posvećuje zaslužena pažnja, imajući u vidu činjenicu da je engleski jezik postao svojevrsni lingua franca kada je reč o nauci i tehnologiji (Mičić, 2009: 81 – 83). Naime, bezmalo sva važna otkrića i rezultati brojnih istraživanja u 21. veku se objavljuju upravo na engleskom jeziku, pri čemu je ovaj jezik toliko suveren, da su pojedini lingvisti ozbiljno zabrinuti za sudbinu ostalih, tzv. manjih jezika, za posebne svrhe (Hyland, 2006: 28). Engleskom jeziku za medicinske akademske i profesionalne svrhe se naročito velika pažnja posvećuje na engleskom govornom području, pri čemu Velika Britanija predstavlja centar za učenje i nastavu ovog specijalizovanog jezika. U ovoj zemlji se engleski jezik

medicine smatra veoma značajnim, te mu je posvećen i čitav niz radionica i kampanja koje imaju za cilj da ukažu na važnost izvođenja nastave ovog jezika za akademske i profesionalne potrebe (Wright, 2012: 39). Naime, smatra se da je dobro poznavanje engleskog jezika za medicinske potrebe zaslužno za postavljanje preciznijih dijagnoza, za bolji odnos i komunikaciju između lekara i pacijenta, pa čak i za smanjen broj kliničkih grešaka. Iako moramo imati na umu činjenicu da je reč o području gde se engleski jezik izučava kao maternji ili kao drugi jezik, a ne kao strani, ipak primećujemo da su navedeni razlozi veoma ozbiljni i da ih treba uzeti u obzir i u zemljama izvan engleskog govornog područja. Na taj način bi studentima u Srbiji koji pohađaju nastavu engleskog jezika za medicinske potrebe bila pružena mogućnost da uvide značaj poznavanja engleskog jezika kao *lingua franca*-e u slučaju odlaska na inostrane klinike radi posla ili usavršavanja.

Medicinski fakultet Univerziteta u Beogradu ima dugogodišnju tradiciju izučavanja i nastave engleskog jezika za medicinske svrhe, te tako spada među one fakultete u svetu koji svoje studente osposobljavaju za brojne akademske i profesionalne zadatke na koje nailaze tokom studija ili profesionalnog života. Zapažen broj studenata svake godine pohađa nastavu engleskog jezika na ovom fakultetu, kako u okviru obavezne nastave za studente I i II godine integrisanih akademskih studija, tako i u okviru nastave na engleskom jeziku i izborne nastave za studente starijih godina. Upravo imajući u vidu veliki broj studenata koji prate nastavu iz ovog predmeta kao i veliki značaj koji ona ima za njihov dalji profesionalni razvoj, sprovedeno je istraživanje među studentima I i II godine tokom školske 2011/2012. Cilj ovoga istraživanja bio je da ispita stavove studenata prema jeziku za medicinske svrhe, kao i prema nastavi ovoga jezika na Medicinskom fakultetu u Beogradu, a u svrhu eventualnog prilagođavanja nastave stvarnim potrebama studenata. Kako se nastava engleskog jezika u okviru integrisanih akademskih studija i studija na engleskom jeziku u najvećoj meri oslanja na udžbenik *English for Medical Academic Purposes* autora prof. dr Sofije Mičić, sprovedeno je i mini – istraživanje među studentima koji su školske 2006/2007 pohađali englesku nastavu. Navedeno istraživanje je imalo za cilj da ispita mišljenje studenata o udžbeniku, a sa ciljem unošenja izmena i poboljšanja u naredna izdanja, kao i prilagođavanja materijala u udžbeniku potrebama studenata.

## Metod

### *Stavovi studenata prema nastavi*

U istraživanju koje je sprovedeno među studentima I i II godine integrisanih akademskih studija, učestvovalo je 128 ispitanika, od toga podjednak broj studenata I i II godine, kao i podjednak

broj studenata i studentkinja. Iz ukupno osam grupa I godine i četiri grupe II godine školske 2011/2012, metodom slučajnog odabira je izdvojeno 128 ispitanika koji su učestvovali u istraživanju. Napominjemo da odabir nije vršen na osnovu postignutih rezultata, znanja engleskog jezika ili posebnog isticanja na časovima, već isključivo nasumično, a vodilo se računa jedino o tome da bude odabran podjednak broj ispitanika iz I i II godine, kao i da među njima postoji rodna ravnoteža.

Ispitanici su zamoljeni da popune upitnik koji je sadržao dva pitanja zatvorenog tipa i jedno pitanje otvorenog tipa. U okviru prvog pitanja, ispitanici su imali da se izjasne da li učenje engleskog jezika za akademske svrhe smatraju važnim, kao i da svoj pozitivan ili negativan odgovor obrazlože. U drugom pitanju se od ispitanika očekivalo da ocene engleski jezik za medicinske svrhe u odnosu na engleski jezik za opšte potrebe, tj. da procene koji od njih je teži za savladavanje i da svoje mišljenje potom obrazlože. Najzad, ispitanici su upitani šta misle o samoj nastavi engleskog jezika za medicinske svrhe koju pohađaju, tj. šta smatraju korisnim, a šta beskorisnim ili pogrešnim u okviru izvođenja nastave. Može se reći da su svi studenti koji su učestvovali u istraživanju zadatku pristupili veoma savesno, dajući iscrpne odgovore na postavljena pitanja, a kako se od njih nije zahtevalo da na upitniku napišu ime i prezime, već samo pol i godinu studija, pretpostavlja se da nije bilo razloga za ulepšavanje odgovora ili izbegavanje davanja negativnih komentara.

### *Stavovi studenata prema udžbeniku*

Kako je već navedeno, obavezna nastava na I i II godini integrisanih akademskih studija i engleska nastava su zasnovane na udžbeniku *English for Medical Academic Purposes*, koji je namenjen studentima na srednjem i višem nivou znanja engleskog jezika za opšte svrhe. Cilj udžbenika je da upozna studente sa autentičnim medicinskim tekstovima sa kojima će se kasnije susretati, da ih upozna sa najznačajnijim medicinskim temama, kao i da im pruži priliku da vežbaju veštine koje će im biti neophodne za obavljanje posla u budućnosti. Teme koje pokriva udžbenik i koje se obrađuju na času su raznovrsne: biologija, biofizika, biohemija, socijalna medicina, medicinska etika, anatomija, fiziologija, sistemi organa, kao i razne vrste bolesti. Svaka tema je praćena pitanjima za diskusiju, spiskom neophodne leksike, vežbanjima koja se odnose na datu leksiku i određenom gramatikom koja se smatra neophodnom za ovu vrstu specijalizovanog jezika. Pored toga, udžbenik nudi i veliki broj dodatnih tekstova za čitanje koji se odnose na odgovarajuće teme i koji se na času eksploatišu na različite načine.

Kako je udžbenik veoma složen i zahtevan i kako je izuzetno važno da tokom četvorosemestralne

nastave bude savladan, tokom školske 2006/2007 sprovedeno je mini-istraživanje među studentima engleske nastave koje je imalo za cilj da ispita mišljenje studenata o pomenutom udžbeniku. Istraživanje je zasnovano na anonimnom upitniku koji je popunilo svih 9 studenata koji su pohađali englesku nastavu te školske godine. Upitnik se sastoji iz dva dela, od kojih prvi deo čini osam iskaza o udžbeniku koje su ispitanici ocenjivali na skali od 1 (uopšte se ne slažem) do 5 (potpuno se slažem). Iskazi koje je trebalo oceniti su sledeći: (1) lekcije su stimulativne i motivišuće; (2) lekcije u udžbeniku se podudaraju sa nastavnim ciljevima; (3) nastavni materijal je valjano predstavljen; (4) vežbanja u udžbeniku su raznovrsna; (5) nastavni materijala je usredsređen na relevantne profesionalne sadržaje; (6) udžbenik predstavlja dobar izvor neophodne leksike; (7) udžbenik odgovara mojim ličnim ciljevima u učenju; (8) nastavni materijal se zasniva na čvrstom saznanju o jeziku koji se koristi, kada se koristi i sa kojim efektom. Drugi deo upitnika sadrži jedno pitanje otvorenog tipa u okviru koga se od studenata očekivalo da daju svoje mišljenje o udžbeniku, kao i nastavi uopšte.

## Rezultati

### *Stavovi studenata prema nastavi*

Na pitanje da li učenje engleskog jezika za akademske svrhe smatraju važnim, gotovo 100% ispitanika je dalo pozitivan odgovor, jer je samo jedan student odgovorio negativno (Tabela 1).

*Tabela 1 Stavovi studenata prema učenju engleskog jezika za akademske potrebe*

	Da li učenje engleskog jezika za akademske svrhe smatrate važnim?	
	DA	NE
ISPITANICI		
studenti I godine	100%	0%
studentkinje I godine	100%	0%
studenti II godine	97%	3%
studentkinje II godine	100%	0%

U obrazloženju svoga odgovora, oni studenti koji su odgovorili pozitivno naveli su da žele da nastave studije ili pronadu posao u inostranstvu, da čitaju bogatu literaturu na engleskom jeziku, kao i da učestvuju na simozijumima u zemlji i inostranstvu. Takođe su pokazali svest o engleskom jeziku kao lingua franca-i i nemogućnosti profesionalnog funkcionisanja bez poznavanja ovog jezika, ali i izrazili potrebu komuniciranja sa kolegama iz inostranstva i inostranim pacijentima sa kojima bi mogli doći u dodir tokom svog budućeg profesionalnog života. Većina ispitanika takođe smatra da će im poznavanje ovog specijalizovanog jezika pomoći da pronadu bolji posao,

ali i da vrše razna istraživanja u oblasti medicine ili se posvete daljem školovanju u cilju sticanja akademskih zvanja mastera ili doktora nauka. Jedini student koji je na postavljano pitanje odgovorio negativno, obrazložio je svoj odgovor činjenicom da mu na budućem radnom mestu engleski jezik uopšte neće biti potreban.

Između engleskog jezika za medicinske svrhe i engleskog jezika za opšte potrebe, većina ispitanika je procenila da su ove dve vrste engleskog jezika podjednako zahtevne, ali treba istaći da je među onima koji su dali ovaj odgovor više studenata II godine (ukupno 42 ispitanika) nego studenata I godine (ukupno 29). 18 studenata II godine smatra da je engleski jezik za medicinske svrhe teži od engleskog jezika za opšte potrebe, dok je broj studenata I godine koji dele njihovo mišljenje veći – 27 ispitanika. Zanimljivo je, međutim, da čak 8 studenata I godine smatra da je engleski jezik za medicinske potrebe lakši od opšteg engleskog, dok svega četvoro studenata II godine deli njihovo mišljenje. Rezultati su prikazani u Tabeli 2.

Oni studenti koji smatraju da je engleski jezik za medicinske svrhe teže savladati od opšteg engleskog imaju nekoliko razloga za svoje mišljenje: specifičnu stručnu terminologiju koju je nemoguće čuti u svakodnevnom govoru, veliki broj reči grčkog i latinskog porekla koje je kao takve teško izgovoriti na engleskom jeziku, postojanje velikog broja stručnih termina koji se koriste i u opštem engleskom jeziku ali sa drugačijim značenjem, kao i probleme u pisanju i izgovoru.

*Tabela 2 Stavovi studenata prema težini engleskog jezika za akademske svrhe*

ISPITANICI	Engleski jezik za medicinske svrhe je.....u odnosu na engleski jezik za opšte svrhe.		
	TEŽI	JEDNAKE TEŽINE	LAKŠI
studenti I godine	44%	41%	15%
studentkinje I godine	41%	50%	9%
studenti II godine	22%	72%	6%
studentkinje II godine	34%	60%	6%

Na pitanje šta misle o samo nastavi engleskog jezika koju pohađaju, studenti su mahom davali veoma iscrpne odgovore. Na primer, studenti I godine su navodili pomoć profesora kao veoma važnu i korisnu, pohvalivši zanimljiva i interaktivna predavanja, upotrebu asocijacija i ilustrativnih primera, uključivanje studenata u diskusiju i detaljan pristup nastavi. Oni su takođe pohvalili pozitivnu atmosferu na času, iscrpna objašnjenja koja dobijaju kao odgovore na svoja pitanja i stalnu vežbu izgovora, kao i

moгуćnost da govore engleski na času i tako vežbaju. Nije im promakla ni činjenica da se na času sve vreme koristi engleski jezik, što smatraju veoma pozitivnim, a primetili su i da je veliki broj lekcija predviđenih za I godinu sinhronizovan sa nastavom koju imaju u okviru anatomije, što im znatno olakšava savladavanje gradiva. Studenti II godine su mahom navodili slična mišljenja, ali su oni takođe podvukli vežbanje gramatike kao važno, kao i upotrebu udžbenika, stalno ponavljanje ključne terminologije, kao i mogućnost komuniciranja sa svojim kolegama u okviru nekog zajedničkog zadatka na času. Neki od njih su naveli i da su ih časovi engleskog inspirisali za dalji kontakt sa medicinskom terminologijom na engleskom te da u tu svrhu često gledaju televizijske serije sa medicinskom tematikom, poput House, M.D. ili Grey's Anatomy, ali i da se trude da čitaju razne članke na Internetu.

Kada je reč o negativnim komentarima, ispitanici su i ovoga puta imali veoma slična mišljenja. Studenti I godine su najčešće pominjali da je održavanje nastave engleskog jezika u tako velikom prostoru kao što je amfiteatar i sa tako velikim brojem studenata neodgovarajuće. Neki od njih su se žalili i na dužinu časa, smatrajući da je čas u trajanju od 90 minuta predug, te da usled toga često dolazi do pada koncentracije. Kritički su se osvrnuli na pojedine studente koji ne prate nastavu sa dovoljno pažnje, te tako ometaju i ostale, a neki su se požalili i na količinu gradiva koju je neophodno usvojiti tokom školske godine. Studenti II godine su uglavnom navodili slične zamerke, s tim što su se takođe žalili i na nedostatak vremena za učenje engleskog jezika usled obimnog i zahtevnog gradiva na drugim, stručnim, predmetima. Mali broj ispitanika se požalio na udžbenik, smatrajući da su tekstovi koji se u njemu nalaze previše teški, kao i da ne odgovaraju potrebama u praksi. Najzanimljiviji primer predstavlja komentar jedne studentkinje II godine koja se požalila na činjenicu da nisu svi časovi tokom semestra obavezni, jer smatra da bi, da to jeste slučaj, bili još motivisaniji da uče jezik. Neke studentkinje su navele nedostatak motivacije kao najveći problem, dok su pojedini ispitanici skrenuli pažnju na tzv. lažne prijatelje (eng. false friends) koji mogu da predstavljaju problem prilikom učenja leksike.

#### ***Stavovi studenata prema udžbeniku***

Kada je reč o anonimnoj anketi koju je popunilo devetoro studenata engleske nastave školske 2006/2007, najveći broj ispitanika se slaže sa iskazom (1) da su lekcije stimulativne i motivišuće, dok troje ispitanika imapodeljeno mišljenje. Svi ispitanici smatraju da se lekcije u udžbeniku podudaraju sa nastavnim ciljevima (2), kao i da je nastavni materijal valjano predstavljen (3). Ispitanici se takođe slažu da su vežbanja u udžbeniku raznovrsna (4), kao i da je nastavni materijal usredsređen na relevantne

profesionalne sadržaje (5). Većina ispitanika smatra da udžbenik predstavlja dobar izvor neophodne leksike (6), dok je samo jedan ispitanik bio uzdržan. Isti je slučaj i sa iskazom da udžbenik odgovara njihovim ličnim ciljevima u učenju (7), dok se svi ispitanici slažu sa iskazom da se nastavni materijal zasniva na čvrstom saznanju o jeziku koji se koristi, kada se koristi i sa kojim efektom (8). Svi rezultati su prikazani u Tabeli 3.

U okviru svojih komentara o udžbeniku i nastavi uopšte, u drugom delu upitnika, ispitanici su istakli da su časovi veoma motivišući i da nude zabavan način da se nauči medicinska terminologija. Takođe su pohvalili opuštenu atmosferu i smatraju da je dobro što je akcenat na engleskom jeziku za medicinske potrebe, jer je to nešto što će im biti potrebno u budućoj profesiji. Jedan ispitanik navodi da udžbenik nudi niz diskusija i situacija iz prakse zbog čega se oni na časovima osećaju i razmišljaju kao pravi lekari. Navodi se i da je udžbenik dobro napisan, da sadrži jasne instrukcije za vežbanja kao i zanimljive dijaloge. Jedan ispitanik navodi da bi trebalo da bude više pitanja i vežbanja nalik na ona koja dobijaju na završnom testu, kako ona ne bi predstavljala iznenađenje na samom ispitu. Nekoliko ispitanika je pomenulo da bi voleli da je udžbenik bolje opremljen i da ima slike u boji, a ne samo lepe roze korice. Navedeno je i da je udžbenik veoma dobar jer pokriva svu neophodnu gramatiku, a jedan ispitanik je pohvalio profesora rečima da joj glas nije monoton i da uspeva da održi pažnju studenata tokom celog časa.

#### **Diskusija**

Na osnovu odgovora koje su ispitanici dali na pitanja u okviru oba sprovedena istraživanja, moguće je izvući pojedine zaključke.

Pre svega, očigledno je da su ispitanici gotovo u potpunosti svesni potrebe za učenjem engleskog jezika za medicinske svrhe, jer su u stanju da navedu različite mogućnosti za njegovu primenu u svom budućem profesionalnom i akademskom životu. Upravo zbog prevladajućeg pozitivnog stava, pažnju posebno privlači jedan ispitanik muškog roda koji učenje engleskog jezika za akademske svrhe ne smatra važnim. Ukoliko mu namera nije bila da se našali, njegov odgovor bi bilo moguće obrazložiti time što još uvek nije svestan činjenice da čak i ukoliko ne planira da otputuje u inostranstvo i tamo se zaposli, postoji realna mogućnost da se na svom radnom mestu susretne sa pacijentima i kolegama koji ne govore njegovim maternjim jezikom.

Razlozi koje su ispitanici naveli za mišljenje da je engleski jezik za medicinske potrebe teže savladati od engleskog jezika za opšte svrhe objašnjavaju veći broj studenata I godine koji engleski jezik za medicinske svrhe smatraju težim za učenje. Naime, upravo se u okviru nastave za I godinu najviše

izučavaju termini latinskog i grčkog porekla, nepravilna množina imenica, te medicinski prefiksi i sufiksi koji po pravilu predstavljaju problem studentima. Studenti II godine su u određenoj meri već prevazišli navedene teškoće, te ih rede i navode.

Odgovori koje su ispitanici dali na pitanje o tome šta smatraju korisnim, a šta pogrešnim u izvođenju nastave, pomogli su nam da zaključimo da su svi studenti svesni onoga što rade i što bi trebalo da rade, kao i važnosti uloge nastavnika u procesu nastave. Naravno, navedeni su izvesni ključni problemi sa kojima se suočavamo, kao što je veliki broj studenata i neadekvatne učionice. Pored ovih problema koji se ne mogu tako jednostavno rešiti, postoje i neke potencijalno slabe tačke na koje su ispitanici ukazali svojim odgovorima, a koje je moguće ispraviti. Očigledna je potreba za interaktivnom i dinamičnom nastavom, gde metodika igra značajnu ulogu, a na šta su i sami studenti skrenuli pažnju svojim odgovorima.

Međutim, pored nastojanja da se nastava unapređuje u ovom pravcu, jasno je i da nastavnik treba da se potruži da pojednostavi i objasni sve problematične aspekte engleskog jezika za medicinske potrebe. Iz odgovora se takođe može videti da studenti imaju pozitivan stav prema učenju engleskog jezika za medicinske svrhe, kao i da su svesni njegove važnosti za svoju buduću profesionalnu i akademsku karijeru, te da bi voleli da imaju više vremena i mogućnosti da mu se posvete. Iz odgovora se takođe može izvući zaključak da nastava engleskog jezika u najvećoj meri odgovara potrebama studenata i njihovom budućem profesionalnom i akademskom životu, te da bi neke sitnije izmene, mahom tehničke prirode, još popravile konačan (pozitivan) utisak. Imajući u vidu sve navedeno, bilo bi uputno sprovesti isto istraživanje i na celom uzorku studenata I i II godine, te uporediti dobijene rezultate.

Tabela 3 Stavovi studenata prema udžbeniku koji se koristi u nastavi

ISKAZ	uopšte se ne slažem (1)	ne slažem se (2)	i slažem se i ne slažem se (3)	slažem se (4)	potpuno se slažem (5)	SREDNJA VREDNOST
lekcije su stimulativne i motivišuće	0	0	3	3	3	4.0
lekcije se podudaraju sa nastavnim ciljem	0	0	0	6	3	4.3
nastavni materijal je valjano predstavljen	0	0	2	1	6	4.4
vežbanja u udžbeniku su raznovrsna	0	0	1	6	2	4.1
nast. materijal je usredsređen na relevantne prof. sadržaje	0	0	0	3	6	4.6
udžbenik je dobar izvor neophodne leksike	0	0	1	3	5	4.4
nast. materijal se zasniva na čvrstom saznanju o jeziku koji se koristi...	0	0	0	2	7	4.7

Kada je reč o stavovima studenata prema udžbeniku, na osnovu odgovora iz anonimne ankete se može zaključiti da studenti udžbenik smatraju dobrim i adekvatnim za nastavu koja se na njemu zasniva, te da u njemu nalaze mnoštvo stvari korisnih za svoj buduć

posao i karijeru. Jedine zamerke se tiču tehničkog rešenja udžbenika, što je samo još jedna činjenica koja ide u prilog tezi o modernoj, interaktivnoj nastavi, tokom koje bi profesori izlazili u susret svim tipovima učenika (npr. vizuelnim i auditivnim tipovima).

Ostaje da se proveriti šta o udžbeniku misle studenti I i II godine integrisanih akademskih studija koji nastavu slušaju na srpskom jeziku. Naime, pretpostavlja se da bi oni mogli imati veće poteškoće sa samim nivoom znanja koji ovaj udžbenik podrazumeva, u poređenju sa stranim državljanima koji su tokom svoga dosadašnjeg života mnogo češće koristili engleski jezik. Upravo iz razloga što je u istraživanju učestvovao veoma mali broj studenata engleske nastave, moramo se zapitati da li bi dobijeni rezultati odgovarali rezultatima nekog šireg istraživanja, pre svega u okviru obavezne nastave engleskog jezika za studente I i II godine.

### Zaključak

Praksa je pokazala da je nastava engleskog jezika za akademske i profesionalne namene danas neophodna da bi budući naučnici i stručnjaci različitih profila uspešno obavljali svoj posao. Tako je engleski jezik nauke i struke postao *lingua franca*, jer se uglavnom naučna i stručna dostignuća objavljuju na ovom jeziku.

Engleski jezik za medicinske namene ima veliku tradiciju na Medicinskom fakultetu Univerziteta u Beogradu i izvodi se u redovnoj i izbornoj nastavi na studijama na srpskom i engleskom jeziku.

### Literatura

1. Hyland, K., ed. English for Academic Purposes. New York: Routledge, 2006.
2. Mičić, S. English for Medical Academic Purposes. Beograd: Zavodzaudžbenike, 2009.
3. Mičić, S. Studije o jeziku medicine u engleskomisrpskom. Beograd: Beogradskaknjiga, 2009.
4. Wright, R. Medical English debunked. IATEFL Professional and Academic English, vol. 39, 2012, p. 39

Anketa među studentima koji imaju obaveznu nastavu engleskog medicinskog jezika (I i II godine) i anketa među studentima na engleskoj nastavi pokazale su u najvećem broju slučajeva: da je nastava engleskog medicinskog jezika neophodna na studijama medicine i da je treba izvoditi i usavršavati; da je kvalitet nastave zadovoljavajući i da je program nastave usklađen s nastavom medicinskih predmeta, pa im znatno pomaže u studijama medicine; da su ispitanici veoma zadovoljni načinom na koji nastavnik engleskog jezika u medicini izvodi nastavu; da grupe za izvodjenje nastave treba da budu manje i da se prostorije adaptiraju prema potrebama za ovu nastavu; da je udžbenik sveobuhvatan i u potpunosti odgovara predviđenom programu nastave engleskog jezika u medicini, od osnovnih medicinskih do kliničkih predmeta. Posebno su zadovoljni vežbanjima u udžbeniku, i mišljenja su da ih treba proširiti. Manji broj ispitanika smatra da knjiga nije tehnički osavremenjena i da treba da bude ilustrovana primerima i slikama u boji.

Kako su rezultati navedenih istraživanja uglavnom pozitivni, ostaje da se vidi u kojoj meri bi bili potvrđeni u istraživanjima većeg obima, što je ujedno i predlog za dalje aktivnosti na polju istraživanja u ovoj oblasti.



## INDEX AUTORA

<b>A</b>		<b>L</b>	
Antuleska – Belčeska G.	57	Lazić P.	39, 45
<b>B</b>		Lukić D.	39, 45
Babić N.	39, 45	<b>M</b>	
Babic S.	33	Meccariello L.	51
Bandić J.	39,45	Mićić S.	67
<b>C</b>		Milovanović I.	21
Cioffi R.	51	Mladenović D.	21
Cioffi S.	51	<b>O</b>	
<b>D</b>		Obradović M.	5, 10
Di Giacinto S.	51	<b>P</b>	
<b>Đ</b>		Putniković B.	5
Đorđević J.	5	<b>R</b>	
<b>F</b>		Radak Đ.	21, 33, 45
Franzese R.	51	Radosavljević T.	21
<b>G</b>		Resanović I.	5, 10
Grubor P.	51	<b>S</b>	
<b>I</b>		Savić K.	5, 10
Isenović E.	5, 10	Sinadinović D.	67
Ivić D.	39, 45	Smiljanić K.	5, 10
<b>J</b>		Sotirović V.	33
Jovanović A.	10	<b>T</b>	
<b>K</b>		Tačević Z.	39
Kovačević D.	21	Tanasković S.	33
Kovačević S.	21	<b>V</b>	
<b>L</b>		Vučević D.	21
<b>M</b>		<b>Z</b>	
<b>N</b>		Zafirović S.	10
<b>O</b>			
<b>P</b>			
<b>R</b>			
<b>S</b>			
<b>T</b>			
<b>V</b>			
<b>Z</b>			

## Uputstvo našim saradnicima

"Medicinska istraživanja" je naučni Časopis Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu. Izlazi kao sveska tri puta godišnje. U sveskama se štampaju originalni radovi i opšti pregledi, po pozivu Redakcije i originalni radovi koji su prethodno referisani na redovnim godišnjim simpozijumima Medicinskog fakulteta "Stremljenja i novine u medicini" u okviru "DANA ŠKOLE", a koje odabere Uređivački odbor.

Budući da prvenstveno odražavaju naučnu aktivnost članova Medicinskog fakulteta i širokog kruga njihovih saradnika i drugih naučnih saradnika i drugih naučnih radnika "Medicinska istraživanja" štampa eksperimentalne radove fundamentalnih naučnih disciplina medicine i biologije, kao i radove kliničke i preventivne medicine.

Za recenziranje radova Uređivački odbor angažuje kompetentne recenzente (koji su anonimni). Časopis ima svoj Izdavački savet i odgovoran je Veću za naučno-istraživački rad Medicinskog fakulteta u Beogradu.

Uređivački odbor prima samo one radove koji do sada nisu objavljeni i zadržava pravo određivanja redosleda njihovog štampanja. Redosled kojim se radovi objavljuju ne odražava naučnu vrednost rada.

Rad treba da bude uredno pisan u nekom od tekst procesora (Word for Windows, Word Perfect for Windows i sl.). Margine treba da budu 2 cm (gornja i donja) odnosno 2,5 (leva i desna), dok je format papira A4. Prored između redova treba da bude uobičajen (single-spaced). Predaje se original rada, koji ne treba da pređe 10 stranica (odnosno 36000 slovnih mesta).

Rad mora da bude stilski doteran i pisan ili na engleskom ili na srpskom književnom jeziku, u duhu pravopisa i uz upotrebu pravilnih medicinskih termina. Treba izbegavati upotrebu stranih reči i skraćena. Imena pisana u tekstu rada moraju biti pisana izvorno.

Uvodni deo treba da sadrži ukratko izložene samo najvažnije istorijske podatke. Iz rada treba izostaviti opšte poznate činjenice, izneti samo one podatke koji su od bitnog značaja, a najveći deo rada treba posvetiti ličnim zapažanjima i zaključcima.

Rad treba da ima sažetak (summary) na engleskom jeziku, ako je pisan na srpskom jeziku. Sažetak treba da sadrži naslov, cilj rada (1-2 rečenice), bitne elemente metodologije, koncizno iznete rezultate sa detaljima iz kojih proizilazi zaključak.

Radovi pisani na engleskom jeziku treba da imaju sažetak na srpskom jeziku.

U vrhu rada treba ispisati tačan naziv ustanove, zatim naslov rada, a ispod njega puno ime i prezime autora i saradnika (bez akademskih i drugih zvanja).

Tekst rada (posebno citate i imena autora) treba povezati sa literaturom odgovarajućim brojevima (10, (10), <sup>10</sup>, [10]). Na posebnoj listi na kraju rada treba

ispisati literaturu na izvornom jeziku po abecednom redu.

Podaci o knjigama i monografijama treba da sadrže: prezime i početno slovo imena autora, naziv knjige, izdanje, izdavača, mesto izdavanja i godinu izdavanja.

Ukoliko nije korišćen originalni izvor, u literaturi se navodi izvorno delo.

U podatke o radovima iz časopisa i zbornika treba uneti prezime i početno slovo imena autora, skraćen (intemacionalni) naziv časopisa, godinu, godište ili volumen - broj sveske i stranu (od - do).

Treba nastojati da se što više podataka prikaže shemama, krivuljama i tabelama. Slike, ako je moguće, treba da budu "skenirane" (scanned) i pložene na disketi u nekom od poznatih formata (bmp, jpg, gif i sl.) ili na sjajnom papiru i treba da su jasne i pogodne za izradu klišeja, a tabele da su pregledne. Broj im treba svesti na neophodnu meru. Na njihovoj poledini treba ispisati prezime i ime autora, naslov rada i njihov redni broj. U tekstu rada treba označiti mesto slike, crteža i tabele (bez ostavljanja praznog prostora), a na posebnoj listi treba ispisati i tekstove koji dolaze iznad ili ispod njih, na srpskom i na engleskom jeziku.

Rad treba dostaviti odštampan na papiru i snimljen na disketi.

Uz svaki rad ili dopis treba dostaviti tačnu adresu autora (kućna i ustanove sa brojem telefona) i e-mail adresu.

Rukopisi se ne vraćaju.

GLAVNI I ODGOVORNI UREDNIK

Prof. dr Đorđe Radak

## Instructions for our contributors

Medical Investigations ("Medicinska istraživanja") is the scientific journal of the School of Medicine, University of Belgrade. The journal is published in volumes (numbers) three times a year. The volumes contain original articles and general surveys submitted upon the demand of the Editorial staff, as well as the original articles selected by the Editorial board that have previously appeared at regular annual symposiums of the School of Medicine, "Aims and Innovations in Medicine", organized for Day of the School.

Due to the fact that Medical Investigations mainly reflect scientific activity of the members of the School of Medicine and of a great number of their associates and other scientists the journal publishes articles on experimental work in fundamental scientific disciplines of medicine and biology, as well as the articles pertaining to clinical and preventive medicine.

Since all articles have to be reviewed, the Editorial Board engages competent reviewers who have to remain anonymous. The journal has its Publishing Council obliged to answer for its work to the Council for Scientific Research Activity of the School of Medicine, University of Belgrade.

The Editorial Board will only accept the articles that have not been published previously and retain the right to determine when they will be published. The order in which they are published has no reference as to the scientific value of the article.

The article should not have more than 10 pages (about 36 000 characters). It should be neatly typed in one of the text processors (Word for Windows, Word Perfect for Windows, or similar). Margins should be 2 cm (upper and lower), 2.5 (left and right) on paper size A4. Please use single-spacing when typing.

The article has to be written in the accepted style either in Standard English or Standard Serbian and correct medical terms should be used. Authors should avoid the use of foreign words and abbreviations. Names mentioned in the text have to be written in original.

Introductory part should contain only the most important historical data. The article should not contain the well-known facts; only those data, which are of the essential importance, and the main part of the article, should be devoted to personal observations and conclusions.

The article should have a summary in English, if written in Serbian. The summary should contain the title, the aim of the article (1 or 2 sentences) and basic elements of methodology, concisely presented results with details from which the conclusion is drawn.

Articles written in English should have a summary in Serbian.

On the top of the first page there should be the name of the institution, than the title of the article, under the title the author's full name and surname, as well as the names of the associates, if any (without academic or other titles).

The text of the article (especially citations and names of authors) should be connected to the references by corresponding superscript numerals (10, (10), <sup>10</sup>, [10]).

On a separate page, at the end of the article please write references in original language and in the alphabetical order.

The data on books and monographs should contain: surname and initial letter of the author's name, the title of the book, edition, editor, the place and year of publishing.

If an original source has not been used then in reference the original work should be cited.

Data on articles from journals and collections should have: surname, and the initial letter of the author's name, abbreviated (international) title of the journal, year, volume number, issue number and page (from -to).

The authors should try to show more data on graphs, curves (done in black ink) and tables (typed). Photos (on glossy paper and drawings on drawing paper) should be clear and suitable for the cliches to be made and the tables easy to scan. Their number should be reasonable. On the back of photos there should be written surname and name of the author, the title of the article and their ordinal numeral. The space for the photo, drawing or table should be marked in the text (however do not leave empty spaces), and on a separate page there should be given texts that precede or follow the original text, in Serbian and in English.

Please send the article both printed on paper and on a diskette.

Each article or letter should have exact address of the author (home and institution address with telephone numbers), as well as the e-mail address.

The manuscripts will not be returned.

EDITOR-IN-CHIEF  
Prof.dr Đorđe Radak

Glavni i odgovorni urednik:  
Prof. dr ĐORĐE RADAK

Urednik - editor:  
Prof. dr ALEKSANDAR LJUBIĆ

Sekretar - Secretary:  
Prof. dr ZVEZDANA KOJIĆ

Tehnički sekretar:  
VIKTORIJA JOKSIMOVIĆ

Izdavač i vlasnik:  
MEDICINSKI FAKULTET UNIVERZITETA U BEOGRADU

Uredništvo i administracija:  
11105 Beograd, Dr Subotića br. 8, soba 313

Realizacija:  
LEX PRINT d.o.o, Beograd

Tiraž:  
1000 primeraka